



HAL
open science

**Effets immunorégulateurs de la protéine GILZ
(Glucocorticoid-induced leucine Zipper) sur la fonction
des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire
allergique : étude clinique et expérimentale**

Soumaya Karaki

► **To cite this version:**

Soumaya Karaki. Effets immunorégulateurs de la protéine GILZ (Glucocorticoid-induced leucine Zipper) sur la fonction des cellules dendritiques dans la réponse immunitaire allergique : étude clinique et expérimentale. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114826 . tel-00923138

HAL Id: tel-00923138

<https://theses.hal.science/tel-00923138>

Submitted on 2 Jan 2014

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
Faculté de Médecine Paris-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : IMMUNOLOGIE ET BIOTHERAPIES

DISCIPLINE : Immunologie

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N° 1129

Thèse de Doctorat
Soutenue le 13 Octobre 2011

par

Soumaya KARAKI

**Effets immunorégulateurs de la protéine GILZ
(Glucocorticoid-induced leucine Zipper) sur la
fonction des cellules dendritiques dans la réponse
immunitaire allergique**

Etude Clinique et expérimentale

Directrice de thèse : Dr Véronique Godot

Composition du jury :

Pr Marc HUMBERT

Président du jury

Dr. Hans YSSEL

Rapporteur

Dr. Valérie JULIA

Rapporteur

Pr Michel DY

Examineur

Pr François LEMOINE

Examineur

Cette Thèse est dédiée :

A mon époux Achraf et à notre chère fille Rim

A ma maman Chadia

A mon Papa

A mes frères et sœur : Hussein, Chadi et Chirine

A la mémoire du professeur Dominique Emilie

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Marc Humbert de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse.

Je remercie Madame le Docteur Valérie Julia et Monsieur le Docteur Hans Yssel qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Merci surtout d'avoir accepté les délais proposés pour examiner mon travail de thèse.

Je remercie le Professeur Michel Dy et le Professeur François Lemoine qui m'ont fait l'honneur de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier très chaleureusement Madame le Docteur Véronique Godot, ma directrice de thèse. Je te suis profondément reconnaissante de m'avoir fait confiance dès le début de ma thèse. Merci pour tes conseils, ton soutien dans les moments difficiles et ta disponibilité. Malgré un emploi de temps chargé tu as toujours su être présente quand il le fallait.

Je remercie Mlle Thi tran pour son soutien technique, sa gentillesse, son dynamisme. Merci également à Francis Capel pour sa disponibilité, son sourire et sa bonne humeur.

Je remercie également Marie-christine Maillot pour sa gentillesse et son soutien moral et technique tout le long de ma thèse.

Merci également à Laurence Delbos pour toutes nos discussions sur les RT-PCR et la cytométrie en flux et surtout pour ta gentillesse et tes conseils toujours précieux et utiles.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité Inserm U996 et tous les étudiants que j'ai cotoyés pendant ces 4 ans de thèse pour leur gentillesse.

Merci à mes frères Hussein et Chadi et à ma sœur Chirine, et à tous mes proches, pour leurs encouragements.

Maman, ton soutien, ta tendresse immense, sont le moteur de mes avancées.

Mon cher époux Achraf, merci de m'avoir soutenu pendant les moments difficiles.

Tes encouragements, ton affection immense, ta patience, ta confiance en moi m'ont permis d'avancer dans ma carrière professionnelle. Sans ton aide et ta grande disponibilité, ce travail n'aurait jamais vu le jour, cette thèse est aussi la tienne.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	8
LISTE DES TABLEAUX.....	10
PRINCIPALES ABRÉVIATIONS.....	12
INTRODUCTION.....	16
CHAPITRE 1: L'ASTHME ALLERGIQUE	18
1.1. <i>Données épidémiologiques.....</i>	18
1.2. <i>Définition de l'asthme.....</i>	18
1.3. <i>Étiologie de l'asthme.....</i>	19
1.3.1. Facteurs de risque endogène.....	20
1.3.1.1 Le terrain génétique.....	20
1.3.1.2 Les facteurs psychologiques et hormonaux	22
1.3.2. Facteurs de risque exogène.....	22
1.3.2.1 Facteurs environnementaux	22
i. Exposition aux allergènes.....	22
ii. Asthme professionnel	23
iii. Le tabagisme	24
iv. La pollution atmosphérique	24
v. L'obésité.....	25
vi. L'allaitement.....	25
vii. Hypothèse hygiéniste	27
1.4. <i>Réaction inflammatoire asthmatique</i>	29
1.4.1. La phase de sensibilisation à l'allergène.....	29
1.4.2. La phase effectrice.....	30
CHAPITRE 2: LES CELLULES DENDRITIQUES	34
2.1. <i>Les CD_s pulmonaires humaines.....</i>	34
2.2. <i>Les CD_s pulmonaires murines.....</i>	35
2.3. <i>Principales fonctions des CD_s.....</i>	36
2.3.1. Capture et internalisation des antigènes par les CD _s immatures.....	36
2.3.2. Migration des CD _s vers les ganglions lymphatiques drainants.....	38
2.3.3. L'interaction CD/LT	39
2.3.4. L'orientation de la réponse immunitaire.....	40
2.4. <i>Rôles des CD_s humaines dans la réaction inflammatoire allergique.....</i>	42
2.5. <i>Rôle des CD_s dans les modèles murins d'asthme allergique.....</i>	44
2.6. <i>Principaux régulateurs de la fonction des cellules dendritiques pulmonaires.....</i>	45
2.6.1. Les cellules épithéliales.....	46
2.6.2. Les macrophages alvéolaires	49
2.6.3. Les macrophages interstitiels	51
2.6.4. Les mastocytes.....	53
CHAPITRE 3: LA BALANCE LT EFFECTEURS/LT REGULATEURS DANS L'ALLERGIE.....	56
3.1. <i>Les lymphocytes Th1 et Th2.....</i>	57
3.1.1. Les lymphocytes Th2.....	57
3.1.2. Les lymphocytes Th1.....	58
3.2. <i>Les lymphocytes Th17.....</i>	60
3.3. <i>Les lymphocytes Th9.....</i>	62
3.4. <i>Les Lymphocytes T CD8⁺.....</i>	63
3.5. <i>Les Lymphocytes NKT invariants (LiNKT).....</i>	65
3.6. <i>Les Lymphocytes T$\gamma\delta$.....</i>	68
3.7. <i>Les lymphocytes T régulateurs</i>	69
3.7.1. Les caractéristiques générales des Ltregs.....	69
3.7.1.1 Les Ltregs naturels.....	69
3.7.1.2 Les Ltregs CD4 ⁺ induits	70
3.7.2. Détection de Ltregs spécifiques de l'allergène chez les individus non atopiques.....	71
3.7.3. Les Ltregs et l'hypothèse hygiéniste	72

3.7.4.	Défaut de LTregs dans l'allergie et dans l'asthme allergique.....	73
3.7.4.1	Les LTregs et les réponses allergiques humaines	73
3.7.4.2	Les LTregs dans les modèles murins allergiques	75
3.7.5.	Les cibles cellulaires de LTregs dans la réaction allergique	76
3.7.6.	Les sous-populations de CD ^s inductrices de LTregs.....	77
CHAPITRE 4:	GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER (GILZ)	80
4.1.	<i>Organisation génomique et régulation de GILZ</i>	80
4.2.	<i>Les principaux inducteurs de GILZ</i>	84
4.3.	<i>Les principaux inhibiteurs de GILZ</i>	86
4.4.	<i>Rôle de GILZ dans le système hématopoïétique</i>	86
4.4.1.	Rôle de GILZ dans la génération de LTregs	86
4.4.2.	Rôle anti-inflammatoire de GILZ.....	87
4.4.3.	Rôle de GILZ dans l'apoptose cellulaire	88
4.4.4.	Rôle de GILZ dans la prolifération cellulaire	90
4.4.5.	GILZ et la différenciation vers les effecteurs LTh1 et LTh2	92
4.5.	<i>Rôle de GILZ dans le système non hématopoïétique</i>	92
4.5.1.	Rôle de GILZ dans l'adipogenèse	92
4.5.2.	Rôle de GILZ dans le transport de sodium	92
CHAPITRE 5:	LES NOUVELLES THERAPIES DANS LES MALADIES ALLERGIQUES.....	96
5.1.	<i>Les immunothérapies ciblant les cytokines</i>	97
5.2.	<i>Les immunothérapies ciblant les LTregs</i>	98
5.3.	<i>Les immunothérapies ciblant les CD^s</i>	99
5.4.	<i>Défis à venir</i>	100
RESULTATS	106
	PARTIE 1: ROLE DE GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) DANS L'INDUCTION DE CELLULES DENDRITIQUES REGULATRICES CHEZ LES PATIENTS ALLERGIQUES TRAITES PAR CORTICOTHERAPIE ORALE.	108
	PARTIE 2: L'HISTAMINE PUISSANT INHIBITEUR DE L'EXPRESSION DE GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) DANS LES CELLULES DENDRITIQUES HUMAINES.	142
	PARTIE 3: INDUCTION DE LA TOLERANCE IMMUNITAIRE PAR DES CELLULES DENDRITIQUES SUREXPRIMANT GILZ (GLUCOCORTICOID- INDUCED LEUCINE ZIPPER) DANS UN MODELE MURIN D'ASTHME ALLERGIQUE.....	182
ANNEXE 1	212
DISCUSSION	218
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	228
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	232

Liste des figures

Figure 1. Coupe schématique d'une bronche d'un patient asthmatique.....	19
Figure 2. Allergie: gènes et environnement.....	20
Figure 3. Possibilité d'une influence maternelle sur l'induction de la tolérance néonatale par le biais de l'allaitement.....	27
Figure 4. Hypothèse hygiéniste.....	29
Figure 5. Phase de sensibilisation aux allergènes.....	30
Figure 6. La réaction immédiate de la phase effectrice.....	32
Figure 7. La réaction retardée de la phase effectrice.....	33
Figure 8. Les sous-populations de CD4 et leurs fonctions.....	36
Figure 9. La migration des CD4 et des LT CD4 ⁺ durant les réponses immunes primaires et secondaires.....	38
Figure 10. La migration des CD4.....	39
Figure 11. Interaction entre la CD4 et le LT.....	40
Figure 12. Représentation schématique des différents types de réponse lymphocytaire en fonction des antigènes.....	41
Figure 13. Interactions entre les cellules épithéliales et les CD4 dans les voies respiratoires.....	49
Figure 14. Inhibition/activation des MA et contrôle de l'immunité pulmonaire.....	51
Figure 15. Les macrophages interstitiels induisent un état d'ignorance immunitaire en conditions physiologiques.....	53
Figure 16. Mécanismes par lesquels les MCs peuvent influencer les CD4.....	55
Figure 17. Les différentes sous-populations de LT impliquées dans le phénotype asthmatique.....	56
Figure 18. Différentiation et maturation des LTh17 chez l'homme et chez la souris.....	61
Figure 19. Modèle de remodelage pulmonaire via l'IL-17.....	61
Figure 20. Les réponses Th2 et Th9 pendant une inflammation pulmonaire aiguë et chronique.....	63
Figure 21. Les effets positifs et néfastes des LT CD8 ⁺ dans l'asthme.....	65
Figure 22. Les LTh2 et les LiNKT dans le développement de l'hyperréactivité bronchique et de l'inflammation pulmonaire.....	68
Figure 23. Les LTregs naturels et induits.....	71
Figure 24. Réduction de la régulation immunitaire et défaut de la déviation immunitaire dans les maladies allergiques.....	73
Figure 25. Les cibles cellulaires des LTregs dans les réactions allergiques.....	77
Figure 26. Localisation des séquences GREs et FHREs dans le promoteur du gène codant pour la protéine GILZ humaine.....	80
Figure 27. A) Séquence murine (m-GILZ) et humaine (h-GILZ) de GILZ.....	82
Figure 28. Représentation schématique de l'alignement des quatre différents isoformes de GILZ.....	83
Figure 29. Représentation schématique de GILZ murin et d'un nouvel isoforme L-GILZ.....	83
Figure 30. Les CD4 sur-exprimant GILZ présentent un phénotype tolérant.....	87
Figure 31. Les domaines d'interaction de GILZ.....	89
Figure 32. Facteurs de transcription régulés par GILZ dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2.....	90
Figure 33. Domaines d'interaction de GILZ avec Raf-1 et Ras.....	91
Figure 34. Représentation schématique des rôles de GILZ et des voies de signalisation impliquées.....	93

Figure 35. Les différentes cibles d'intervention thérapeutique au cours de la réaction allergique..... 96

Liste des tableaux

Tableau 1. Les principaux gènes de susceptibilité associés à l'asthme et à l'allergie.	21
Tableau 2. Expression des TLR par les CDs pulmonaires humaines.....	35
Tableau 3. Quelques exemples des récepteurs exprimés par les CDs et les cellules épithéliales pulmonaires.	37
Tableau 4. Les lymphocytes iNKT chez les patients asthmatiques.	67
Tableau 5. Les cytokines qui peuvent être des cibles thérapeutiques dans l'asthme et dans l'allergie.	98

Principales Abréviations

A

- α -galcer : α -galactosylcéramide
AICD : Activation-Induced Cell Death
AP-1 : Activator Protein-1

B

- BCR : B Cell Receptor
BDCA-1⁺ : Blood DC Antigen

C

- C/EBP- δ : CCAAT-enhancer-binding proteins- δ
CDs : Cellules Dendritiques
CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II
CTLA-4 : Cytotoxic T lymphocyte Associated antigen-4.

D

- DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern
DEX : Dexaméthasone

E

- ECP : Eosinophilic cationic protein
EDN : Eosinophil-Derived Neurotoxin
Egr : Early growth factor
EPO : Eosinophil Peroxydase

F

- FHREs : ForkHead Responsive Elements
FLIP : Flice Inhibitory Protein
Foxp3 : Forkhead-box protein 3

G

- G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GILZ : Glucocorticoid induced leucine zipper
GCs : Glucocorticoïdes
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GREs : Glucocorticoid-Responsive Element

I

IDO : Indolamine 2,3-Dioxygénase

IgE : Immunoglobulin E

IFN- γ : Interferon γ

IGF-1 : Insuline Like Growth Factor-1

iKDCs : Interferon killer Dendritic Cells

IL : Interleukin

IMC : Indice de Masse Corporelle

IPEX : Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked

L

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocytes T

LTregs : Lymphocytes T régulateurs

M

MA : Macrophages Alvéolaires

MBP : Major Basic protein

MC : Mastocytes

mDC : Myeloid dendritic cell

MI : Macrophages interstitiels

MMP-9 : Matrix Metalloproteinase- 9

N

NF-AT : Nucleor factor of activated T cell

NF κ B : Nucleor Factor- κ B

NGF : Nerve Growth Factor

NK : Natural killer

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé publique

OVA : Ovalbumine

P

PAF : Platelet-Activating factor

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PAR : Protease-Activated Receptor

PD-1 : Program Death One
pDC : Plasmacytoid-dendritic cell
PPAR- γ 2 : Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma-2
PRR : Pattern Recognition Receptor

R

RANTES : Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted

S

SH3 : Src Homology domain
SCF : Stem Cell Factor
SIRP- α : Receptor Signal Regulatory Protein- α
SNP : Single Nucleotide Polymorphism

T

TCR : T Cell receptor
TGF- β : Transforming-Growth factor β
TLR : Toll Like Receptor
TSLP : Thymic stromal lymphoid protein
TSC-22D : Transforming growth factor β 1-Stimulated Clone 22 Domain
TSC-box : Tuberous Sclerosis Complex

W

WRS : Water-immersion Restreint Stress

Introduction

Chapitre 1: L'asthme allergique

1.1. Données épidémiologiques

L'allergie est une réaction d'hypersensibilité de type I caractérisée par la production d'immunoglobulines de type IgE (*Immunoglobuline E*) contre les antigènes (appelés allergènes dans les maladies allergiques) qui peuvent entrer dans le corps via le tractus respiratoire, le tractus gastro-intestinal, la peau et par voie systémique. Les patients allergiques peuvent présenter une variété de manifestations cliniques en fonction de l'organe exposé à l'allergène comme l'asthme allergique, la rhinite allergique, les maladies allergiques cutanées, la rhinoconjonctivite, les allergies alimentaires et le choc anaphylactique.

Des études épidémiologiques estiment la prévalence cumulée des maladies allergiques à 25-30% dans les pays industrialisés. Parmi les maladies allergiques, l'OMS (*Organisation Mondiale de la Santé publique*) estime que l'asthme atteint 300 millions de personnes dans le monde, que sa fréquence augmente régulièrement depuis 40 ans et que la mortalité associée à l'asthme reste inquiétante, avec plus de 250 000 décès par an dans le monde (1).

Bien que les connaissances concernant la maladie aient progressé ces dernières décennies grâce aux études cliniques, pharmaceutiques et à la recherche expérimentale, plusieurs aspects de la physiopathologie de cette maladie ne sont pas encore connus précisément et plusieurs questions restent posées. De même les traitements actuellement disponibles sont efficaces dans un nombre limité de cas ce qui exige le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

1.2. Définition de l'asthme

Anciennement caractérisé comme une maladie causée par le spasme des muscles lisses des bronches, l'asthme est maintenant défini comme une pathologie inflammatoire complexe qui résulte d'une activation inappropriée du système immunitaire. L'infiltrat inflammatoire de la muqueuse bronchique est polymorphe comprenant des éosinophiles, mais également des lymphocytes T à prédominance CD4⁺, des mastocytes, et des neutrophiles. L'inflammation persistante provoque des modifications morphologiques du tissu des bronches qui se caractérise par la formation de collagène sous la membrane basale, l'hypertrophie des cellules productrices de mucus et une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses

(figure1) (2, 3). Cette inflammation chronique est associée à une hyperréactivité bronchique qui se traduit par une dyspnée paroxystique (essoufflement, difficulté à respirer avec une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des mouvements respiratoires), une respiration sifflante et une toux sèche parfois associée à une expectoration séro-muqueuse. Ces crises peuvent être calmées par l'utilisation d'un traitement symptomatique comme les bronchodilatateurs. Les crises d'asthme peuvent aller du simple essoufflement à l'insuffisance respiratoire grave, nécessitant une hospitalisation.

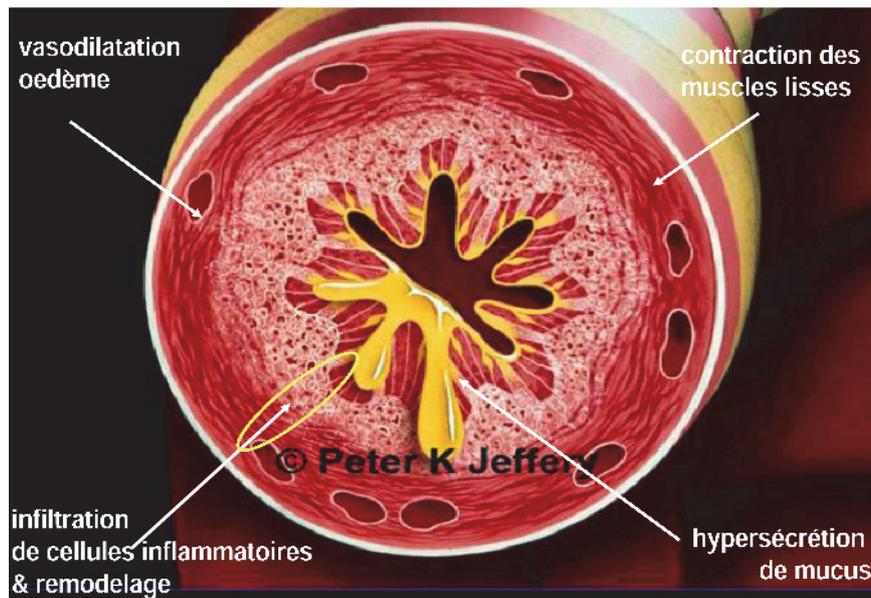


Figure 1. Coupe schématique d'une bronche d'un patient asthmatique

1.3. Étiologie de l'asthme.

L'asthme est une maladie multifactorielle dans laquelle sont impliqués différents facteurs de risque endogènes et exogènes (figure 2).

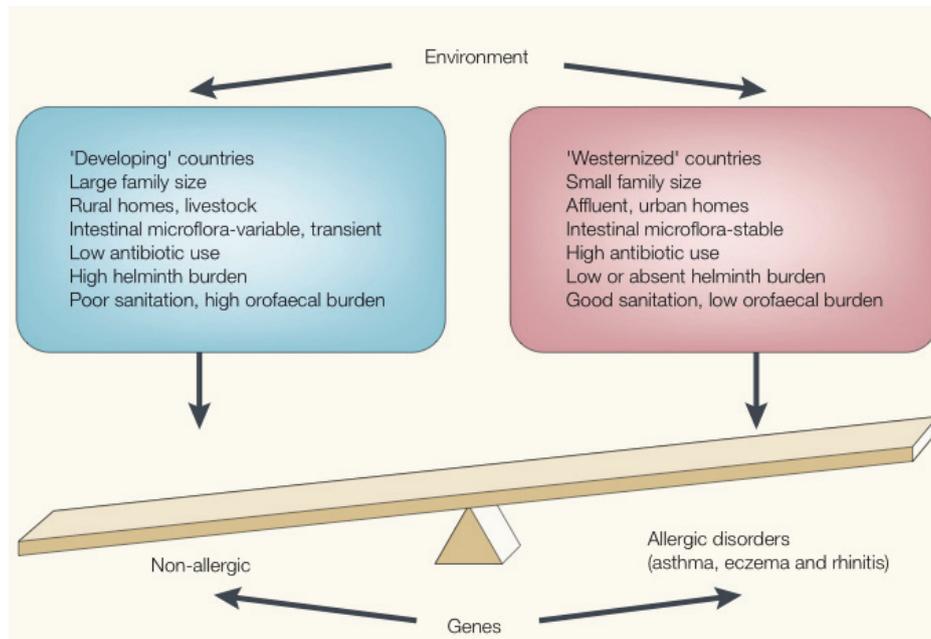


Figure 2. Allergie: gènes et environnement..

Une augmentation de la prévalence de l'allergie a été observée principalement dans les sociétés modernisées au cours des dernières décennies. Des facteurs génétiques et environnementaux influencent l'étiologie de l'asthme. L'augmentation récente de la prévalence des allergies et de l'asthme est considérée comme étant principalement due aux changements qui ont eu lieu dans l'environnement des pays développés comme une conséquence de la modernisation. Une comparaison des conditions environnementales dans les pays développés et en développement a fourni de nouvelles indications sur les causes possibles.

Adapté de Wills-Karp M., Nature Reviews Immunology 2001.

1.3.1. Facteurs de risque endogène

1.3.1.1 Le terrain génétique

Le terrain atopique est le principal facteur causal de l'asthme. L'atopie est une aptitude anormale d'un individu à synthétiser des IgE spécifiques dirigées contre les allergènes naturels entrant en contact avec l'organisme par des voies naturelles. Il s'agit d'allergies à caractère héréditaire diagnostiquées dans les familles (4).

Le terrain génétique est un élément essentiel de la maladie asthmatique surtout chez l'enfant. Ainsi considérant que le risque allergique moyen d'un enfant pris au hasard dans la population est de 20 %, celui d'un enfant ayant un parent allergique sera de 40% à 45 % et celui d'un enfant né de parents tous deux allergiques approchera les 80-90 % (5).

Les études des familles et les analyses des associations cas-témoin ont identifié un nombre de régions chromosomiques qui sont associées à la susceptibilité de l'asthme.

Les analyses génétiques ont tout d'abord mis en évidence des régions dans le génome qui contiennent des gènes prédisposant aux maladies allergiques. Puis, la mise en évidence des

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*; soit la modification d'un seul nucléotide par rapport à la séquence d'ADN normale) a offert la possibilité de caractériser ces gènes et leur variant génétique (ou ensemble de variants) et d'associer ainsi des polymorphismes de ces gènes avec la maladie (*tableau 1*).

Gene	Chromosome	Function and pathway	Common variants
<i>GSTM1</i>	1p13.3	Environmental and oxidative stress — detoxification	+/null
<i>FLG</i>	1q21.3	Epithelial barrier integrity	Arg510X, 2282del4
<i>IL10</i>	1q31-q32	Immunoregulation	-1082A/G, -571C/A
<i>CTLA4</i>	2q33	T-cell-response inhibition and immunoregulation	-318C/T, 49A/G
<i>IL13</i>	5q31	T _H 2 effector functions	-1112C/T, Arg130Gln
<i>IL4</i>	5q31.1	T _H 2 differentiation and IgE induction	-589C/T, +33C/T
<i>CD14</i>	5q31.1	Innate immunity — microbial recognition	-1721G/A, -260C/T
<i>SPINK5</i>	5q32	Epithelial serine protease inhibitor	Glu420Lys
<i>ADRB2</i>	5q31-q32	Bronchial smooth-muscle relaxation	Arg16Gly, Gln27Glu
<i>HAVCR1</i>	5q33.2	T-cell-response regulation — HAV receptor	5383_5397del
<i>LTC4S</i>	5q35	Cysteinyl leukotriene biosynthesis — inflammation	-444A/C
<i>LTA</i>	6p21.3	Inflammation	NcoI (intron 1)
<i>TNF</i>	6p21.3	Inflammation	-308G/A, -857C/T
<i>HLA-DRB1</i>	6p21	Antigen presentation	Multi-SNP alleles
<i>HLA-DQB1</i>	6p21	Antigen presentation	Multi-SNP alleles
<i>HLA-DPB1</i>	6p21	Antigen presentation	Multi-SNP alleles
<i>GPRA</i>	7p14.3	Regulation of cell growth and neural mechanisms	Haplotypes
<i>NAT2</i>	8p22	Detoxification of drugs and carcinogens	Slow acetylation SNPs
<i>FCER1B</i>	11q13	High-affinity Fc receptor for IgE	Ile181Leu, Gly237Glu
<i>CC16</i>	11q12.3-q13.1	Epithelium-derived anti-inflammatory protein	38A/G
<i>GSTP1</i>	11q13	Environmental and oxidative stress — detoxification	Ile105Val
<i>IL18</i>	11q22.2-q22.3	Induction of IFN γ and TNF	-656T/G, -137G/C
<i>STAT6</i>	12q13	IL-4 and IL-13 signalling	2964G/A, (GT) $_n$ exon 1
<i>NOS1</i>	12q24.2-q24.31	Nitric oxide synthesis — cell-cell communication	3391C/T, 5266C/T
<i>CMA1</i>	14q11.2	Mast-cell chymotryptic serine protease	BstXI, -1903G/A
<i>IL4R</i>	16p12.1-p12.2	α -chain of the IL-4 and IL-13 receptors	Ile50Val, Glu551Arg
<i>CCL11</i>	17q21.1-q21.2	Epithelium-derived eosinophil chemoattractant	Ala23Thr, -1328G/A
<i>CCL5</i>	17q11.2-q12	Monocyte, T-cell and eosinophil chemoattractant	-403A/G, -28C/G
<i>ACE</i>	17q23.3	Inactivation of inflammatory mediators	In/del
<i>TBXA2R</i>	19p13.3	Smooth-muscle contraction, inflammation	924T/C, 795T/C
<i>TGFB1</i>	19q13.1	Immunoregulation, cell proliferation	-509C/T
<i>ADAM33</i>	20p13	Cell-cell and cell-matrix interactions	Multiple SNPs
<i>GSTT1</i>	22q11.23	Environmental and oxidative stress — detoxification	A/null

Tableau 1. Les principaux gènes de susceptibilité associés à l'asthme et à l'allergie.

Adapté à partir de Vercelli D., Nature Reviews of Immunology 2008.

Par exemple, l'IL-13Arg130 (un SNP qui induit la substitution d'une arginine en position 130 par une glutamine) est l'expression d'un variant du gène codant pour l'IL-13 (principale cytokine de l'inflammation allergique dans l'asthme) dont l'activité biologique est augmentée (6). Ce polymorphisme est associé aux taux élevés des IgE totaux sériques et à une augmentation du risque de développer un asthme (7) et de l'atopie (8).

Autre exemple, un SNP du promoteur du gène de l'IL-13 (L'IL-131112CT) conduit à une expression accrue de l'IL-13 dans les cellules Th2. La présence de ce polymorphisme prédispose également au développement de l'asthme (9, 10).

1.3.1.2 Les facteurs psychologiques et hormonaux

Le stress psychologique comme les émotions, les contrariétés, l'anxiété et les tensions, peut être à l'origine du déclenchement d'une crise d'asthme (11).

Les hormones affectent le développement de l'asthme allergique. Les études épidémiologiques ont rapporté une prévalence plus élevée de l'asthme chez les garçons pendant l'enfance et chez la femme à l'âge adulte (12, 13). D'un point de vue clinique, la période prémenstruelle est une période à risque. Il existe un autre pic de prévalence de l'asthme au moment de la ménopause chez la femme. Les oestrogènes et/ou la progestérone peuvent altérer les fonctions pulmonaires et aggraver l'asthme chez les femmes pendant les périodes prémenstruelles et menstruelles (14).

Les études des différentes populations de patients allergiques confirment que l'asthme allergique est une maladie multifactorielle et que le contexte environnemental extérieur joue également un rôle prédominant dans cette pathologie.

1.3.2. Facteurs de risque exogène

Au cours de ces dernières années, la prévalence de l'asthme a pratiquement doublé dans la plupart des pays industrialisés surtout chez les sujets jeunes (15). Bien que les facteurs génétiques prédisposent à cette maladie, il est peu probable que le caractère génétique soit à l'origine de cette brutale augmentation en moins d'un quart de siècle, ce qui suggère que la cause probable de cette épidémie est liée à l'environnement (15).

1.3.2.1 Facteurs environnementaux

i. Exposition aux allergènes

Il n'y a pas une allergie sans allergène. Les allergènes sont des antigènes capables d'induire sous certaines conditions la synthèse d'IgE spécifique chez les individus prédisposés et de se lier spécifiquement à ces molécules d'IgE fixées à la surface des cellules effectrices, déclenchant ainsi la réaction allergique (16).

Globalement, les allergènes sont divisés en cinq types : les pneumoallergènes, les trophoallergènes, les allergènes de contact, les allergènes médicamenteux et les venins d'hyménoptères. Les pneumoallergènes, véhiculés par l'air, comprennent principalement les acariens de la poussière de maison (*Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae*), les pollens végétaux (ambrosie, cyprès, bouleau, platane) et les allergènes issus des animaux (poils, squame d'animaux tels que les chiens, les chats et les débris d'insectes), mais également les moisissures dans les habitats humides.

Ces pneumoallergènes entraînent généralement des manifestations respiratoires, conjonctivales ou oculaires. Les trophoallergènes sont présents dans de nombreux aliments (œufs, lait, poissons, crustacés, arachide..) et sont responsables des manifestations digestives mais également cutanées. Les allergènes de contact tel que le latex, causent majoritairement des réactions allergiques cutanées mais peuvent dans certains cas provoquer de l'asthme et des chocs anaphylactiques. Les allergies médicamenteuses (antibiotiques, certains anesthésiques) induisent de simple réaction urticarienne ou des chocs anaphylactiques. Les venins d'hyménoptères peuvent induire des réactions allergiques violentes comme le choc anaphylactique et l'œdème de Quincke.

Quelles sont les caractéristiques d'un allergène?

La caractérisation des allergènes a été une condition préalable à la compréhension des maladies allergiques pour développer des stratégies d'intervention immunitaire. Les allergènes sont presque toujours des protéines mais toutes les protéines ne sont pas des allergènes (17). Ceci soulève la question de : qu'est ce qui caractérise les protéines qui sont des allergènes communs ?

La plupart des allergènes sont des protéines stables qui sont transportées sur des particules sèches comme les grains de pollen et les excréments des acariens. La solubilité élevée des allergènes permettant leur élution rapide des particules sèches et leur faible poids moléculaire favorisent leur diffusion dans la muqueuse des voies respiratoires. De faibles doses d'allergènes sont généralement en contact avec la muqueuse respiratoire ce qui favorise l'induction des lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-4. Cette dernière est responsable de la production des IgE spécifiques de l'allergène. A noter également que la structure protéique des allergènes doit contenir des peptides capables de se lier au complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) pour induire des lymphocytes T.

Certains allergènes possèdent une activité enzymatique comme Dermatophagoïdes pteronyssinus (*Derp1*), un allergène présent dans les excréments des acariens. Derp1 est une cystéine protéase capable de cliver les jonctions étroites entre les cellules épithéliales de la muqueuse respiratoire ce qui favorise son accès aux cellules présentatrices de l'antigène sous-épithéliales (16).

ii. Asthme professionnel

L'activité professionnelle et le lieu de travail constituent une source importante d'exposition potentielle à des substances capables de déclencher une crise d'asthme.

Deux catégories d'agents ou de sensibilisants sont responsables de l'asthme professionnel:

- Des allergènes de haut poids moléculaire comme les allergènes d'origine animale (les excréments d'animaux existants dans les laboratoires de recherche, les animaleries), les allergènes d'origine végétale (les farines de blé, d'orge et de seigle présentes dans les boulangeries et les pâtisseries)
 - Des allergènes de faible poids moléculaire constitués de substances chimiques (les isocyanates utilisés dans divers secteurs de l'industrie et de l'artisanat sous forme de matières plastiques, élastomères, matériaux alvéolaires, revêtements ou adhésifs.)
- (18, 19).

iii. Le tabagisme

L'exposition à la fumée de cigarettes est associée à une altération de la fonction pulmonaire chez les personnes souffrant d'asthme, à l'exacerbation de l'asthme et à une diminution de la sensibilité des patients au traitement par les GCs (*Glucocorticoïdes*) (20, 21). L'exposition prénatale ou postnatale à la fumée de cigarettes est associée à des effets nocifs mesurables dont un plus grand risque potentiel à développer des symptômes de type asthmatique dans les premières années de vie de l'enfant.

iv. La pollution atmosphérique

Une des causes parmi plusieurs de la hausse de morbidité associée aux maladies respiratoires allergiques est la présence accrue de polluants dans l'air (22, 23). La pollution atmosphérique urbaine est aujourd'hui un grave problème de santé publique. De récentes études ont bien confirmé que cette pollution affecte la fonction pulmonaire chez les asthmatiques (24-27). Elle provoque des endommagements de la muqueuse respiratoire et une altération de la clairance mucociliaire ce qui facilite l'accès des allergènes aux cellules du système immunitaire et favorise ainsi la sensibilisation des voies respiratoires (28-30). Ces éléments pourraient expliquer la prévalence croissante des maladies respiratoires allergiques dans les zones urbaines polluées (29). Les composants les plus abondants responsables de la pollution atmosphérique dans les zones urbaines sont les particules diesel, l'azote, le dioxyde de carbone, et l'ozone (30, 31). En outre, la température du globe terrestre est en augmentation, principalement en raison de facteurs anthropiques (par exemple la combustion des fossiles combustibles et les émissions de gaz à effet de serre). Le changement climatique modifie la

concentration et la distribution des polluants atmosphériques et augmente la période saisonnière d'exposition aux pollens allergisants (28, 32).

v. L'obésité

Durant la dernière décennie, il est devenu évident que l'obésité est un facteur de risque pour l'asthme. Plusieurs études menées à travers le monde montrent que la prévalence de l'asthme est plus élevée chez les obèses versus les personnes non obèses.

Plusieurs études prospectives réalisées à la fois chez l'enfant et chez l'adulte indiquent que l'obésité est antérieure à l'asthme et que le facteur de risque de l'incidence de l'asthme augmente avec l'IMC (*Indice de Masse Corporelle*). L'obésité semble également aggraver le contrôle de l'asthme et la sévérité (33-35). Chez l'individu obèse, le volume pulmonaire et le volume courant sont réduits ce qui induit un rétrécissement des voies respiratoires. L'obésité conduit également à un état d'inflammation systémique de bas grade qui pourrait agir sur les poumons et exacerber l'asthme (36).

La compréhension de cette relation entre l'obésité et l'asthme pourrait conduire à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la population d'individus obèses. Le développement de telles stratégies semble indispensable parce que les modalités actuelles de traitement de l'asthme ne sont pas efficaces chez les patients asthmatiques obèses (33, 34, 37, 38).

vi. L'allaitement

Des études épidémiologiques concernant le rôle protecteur de l'allaitement maternel contre le développement des maladies allergiques ont donné des résultats contradictoires. Le statut allergique des mères n'a pas été toujours pris en considération dans ces études ce qui expliquerait ces divergences (39, 40). Des études prospectives réalisées entre 1996 et 2000 ont conclu que la protection des enfants contre l'asthme, suite à un allaitement maternel, était plus élevée dans le sous-groupe des enfants issus d'une famille allergique ou atopique.

Deux autres études prospectives plus récentes réalisées sur une cohorte de 4089 (41) et 3115 enfants (42) respectivement n'ont pas confirmé ces résultats. Une dernière étude prospective réalisée sur 1200 enfants révèle que l'allaitement maternel ne protège pas les enfants contre l'asthme ou l'atopie voir augmente le risque d'asthme chez les enfants issus de familles asthmatiques (43). A noter que l'exposition des mères à l'allergène n'a pas été évaluée dans ces études.

Récemment, l'équipe de Valérie Julia a démontré que la protection contre l'asthme lors de l'allaitement repose sur l'induction d'une tolérance immunitaire et nécessite un transfert de l'antigène de la mère au nouveau-né par le lait maternel (*figure 3*). Dans un modèle murin, cette équipe a mis en évidence que la protection contre l'asthme exige l'exposition des mères à l'allergène durant la période de lactation. La présence conjointe de l'allergène et du TGF- β (*Transforming-Growth factor β*) dans le lait maternel permet d'induire des lymphocytes T régulateurs (LTregs) responsables de la protection partielle de la descendance contre le développement de l'asthme. Dans cette étude, les mères n'étaient pas sensibilisées aux antigènes inhalés (44). Par contre, cette protection contre le développement de l'asthme est plus importante et de longue durée quand les souris nouveau-nées sont allaitées par des mères sensibilisées à l'OVA puis exposées à des aérosols d'OVA pendant la période de lactation. Cette protection est assurée par le passage des complexes immuns IgG-OVA du lait maternel aux nouveau-nés par l'intermédiaire du récepteur FcRn exprimé par les cellules épithéliales intestinales du nouveau-né induisant ainsi la génération de LTregs CD25⁺Foxp3⁺ spécifiques de l'OVA. Cette induction de tolérance par les complexes immuns IgG-OVA n'exige pas la présence du TGF- β dans le lait maternel contrairement à la tolérance induite par le lait maternel contenant de l'OVA non complexé à des immunoglobulines (45). L'identification de nouveaux paramètres clés dans l'induction de tolérance chez les nouveau-nés permettra dans le futur d'élaborer de nouvelles voies dans la prévention de l'asthme.

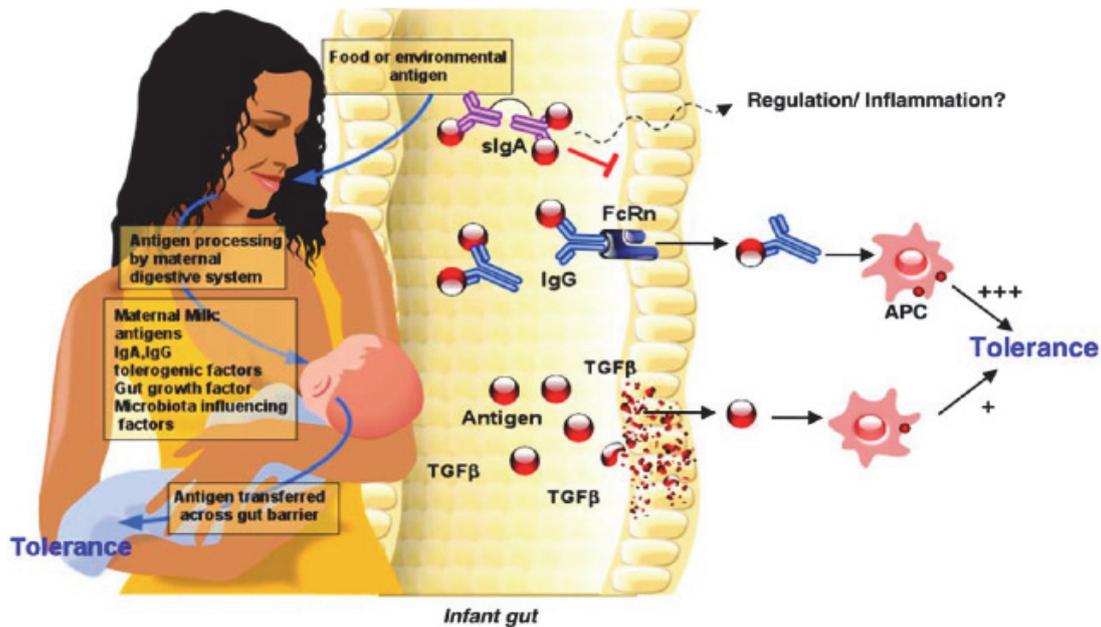


Figure 3. Possibilité d'une influence maternelle sur l'induction de la tolérance néonatale par le biais de l'allaitement.

Les antigènes inhalés ou ingérés par la mère sont dégradés par son système digestif ce qui pourrait contribuer à la production de peptides tolérogènes. Selon l'exposition antigénique de la mère et la perméabilité des glandes mammaires, différentes quantités d'antigène seront présentes dans le lait maternel. La sensibilisation maternelle aux allergènes inhalés déterminerait le mode de transfert de l'allergène dans le lait maternel sous forme libre ou complexée à des IgA ou des IgG spécifiques de l'antigène. Les IgA piègeraient également les antigènes et empêcheraient leur transfert à l'enfant tandis que les antigènes liés aux IgG seraient efficacement transférés à travers la barrière intestinale de l'enfant en utilisant les FcγRs (FcRn). Les antigènes libres pourraient également être transférés passivement à travers la barrière intestinale de l'enfant avec beaucoup moins d'efficacité. Ensuite, l'antigène serait capté par les cellules présentatrices d'antigène (APC) du nourrisson qui génèreraient des LT régulateurs. Différents facteurs pourraient influencer ces étapes et la génération de LTregs comme la présence dans le lait maternel de facteurs de croissance (EGF: Epidermal Growth Factor) ou du TGF (Transforming Growth Factor) qui accélèrent la maturation de l'épithélium intestinal et/ou l'induction d'une tolérance immune vis-à-vis des antigènes transférés dans le cas du TGF-β. La présence de probiotiques dans le lait maternel favorise le développement d'une flore microbienne qui pourrait contribuer également à l'induction d'une tolérance immunitaire chez le nourrisson

Adapté à partir de Verhasselt V., Current Opinion of Immunology 2010.

vii. Hypothèse hygiéniste

L'hypothèse qui a reçu la plus grande attention afin d'expliquer l'augmentation de la prévalence de l'asthme est «l'hypothèse hygiéniste». Cette hypothèse suggère que l'amélioration de l'hygiène dans les sociétés, avec le progrès manifeste des mesures de santé publique et l'utilisation des vaccins et des antibiotiques, a réduit l'incidence des infections ce qui favorise le développement de la réponse immune de type Th2 et ainsi à l'augmentation de l'incidence des maladies atopiques (46). Dans la société moderne, les enfants sont élevés dans

des familles de taille restreinte, et sont moins fréquemment exposés aux infections que ceux qui vivent dans des familles nombreuses. La réduction de l'atopie a été associée à un nombre élevé de frères et sœurs plus âgés (47), à l'entrée précoce dans les crèches, à l'utilisation réduite d'antibiotiques ainsi qu'à l'exposition fréquente à un environnement rural (48).

Le rôle de la flore intestinale a aussi été mis en exergue suite à l'observation des effets nocifs des antibiotiques qui déséquilibrent la flore commensale et des effets bénéfiques des probiotiques. Ces derniers sont représentés par certaines souches de lactobacilles et s'avèrent capables de promouvoir une réponse immune de type Th1. La présence dans le milieu intestinal d'une flore saprophyte « naturelle » ou le rétablissement de cet équilibre par les probiotiques pourrait diminuer le risque de développement de l'atopie (47, 49).

Il est important de mentionner qu'au cours des 20 dernières années, un grand nombre d'études a contribué à soutenir l'explication originale de l'hypothèse hygiéniste, postulant que l'explosion des maladies allergiques dans les pays occidentaux est la conséquence d'une diminution de la stimulation microbienne et ainsi d'un défaut de la déviation immune de réponses Th2 vers des réponses Th1 (50, 51). La réduction des stimulations microbiennes entraîne une diminution de la production des cytokines Th1 par les cellules immunes innées ce qui entraîne ensuite une réduction de la polarisation Th1 et une augmentation des réponses immunes Th2. Plusieurs études ont démontré *in vitro* que les composants microbiens ou les adjuvants synthétiques peuvent directement agir sur les cellules immunes innées telles que les cellules dendritiques et les cellules NKs (*Natural Killer*) et stimuler leur production d'IL-12, d'IFN- α et d'IFN- γ ce qui conduit à la commutation des LTh2 spécifiques de l'allergène vers un phénotype Th1 (52, 53).

In vivo plusieurs études ont également démontré que la stimulation des cellules immunes innées avec des composants microbiens ou synthétiques empêche le développement des maladies allergiques en induisant des phénotypes Th1 (54, 55)

Toutefois, Cette hypothèse hygiéniste ne peut pas être la réponse unique pour expliquer l'augmentation des maladies allergiques (*figure 4*).

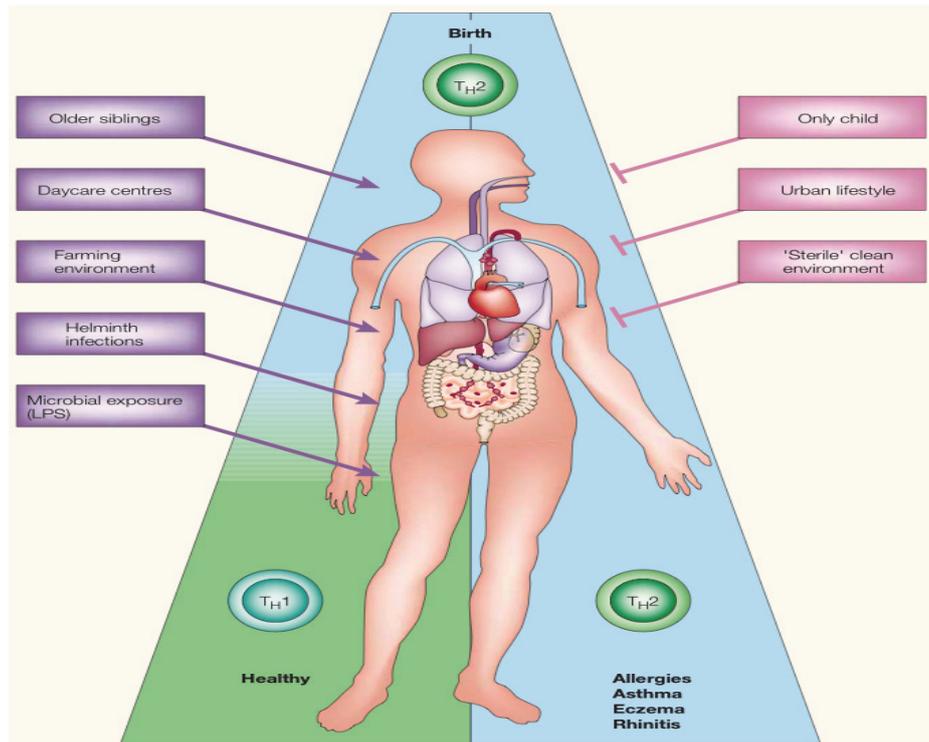


Figure 4. Hypothèse hygiéniste.

Selon cette hypothèse, le système immunitaire est immature à la naissance et il est biaisé en faveur de la production des cytokines de type Th2. Certains stimuli tels que les infections avec les helminthes ou les virus peuvent contribuer à l'évolution du système immunitaire vers un équilibre entre les réponses cytokiniques de type Th1 et Th2. En l'absence de ces stimuli, la production des cytokines de type Th2 par les LT immatures persiste conduisant à un risque accru de développer un asthme ou d'autres maladies allergiques. LPS, lipopolysaccharide.

Adapté de Gern J.E. and Busse W.W., Nature Reviews Immunology 2002.

1.4. Réaction inflammatoire asthmatique

D'un point de vue physiopathologique, la réaction allergique est caractérisée par une hypersensibilité immune induite par des IgE (hypersensibilité de type I selon Gell et Combs) et se décompose en deux phases : une phase de sensibilisation et une phase effectrice.

1.4.1. La phase de sensibilisation à l'allergène.

Une fois que l'allergène a traversé la barrière épithéliale des voies respiratoires, il est capté par les cellules dendritiques (CDs) résidentes dans les tissus sous-épithéliaux conduisant à leur maturation. Lors de ce processus de maturation, les CDs acquièrent l'expression du récepteur CCR7 permettant ainsi leur migration vers les ganglions lymphatiques drainant les poumons et augmentent l'expression des molécules de CMH II (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité de type II*) et des molécules de co-stimulation (CD80 et CD86) impliquées dans la réponse lymphocytaire. Les CDs matures interagissent alors avec les

lymphocytes T (LT) naïfs présents dans les ganglions, initiant une réponse immune primaire de profil Th2. Les lymphocytes Th2 produisent des cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. La présence de l'IL-4 et l'IL-13 et l'interaction CD40-ligand (LT) / CD40 (lymphocytes B) vont initier la production des IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B (56). Les IgE ainsi sécrétées vont diffuser dans le sang et se fixer notamment sur le FcεRI (le récepteur de forte affinité aux IgE) présent à la surface des mastocytes et des basophiles. Cette phase de sensibilisation est asymptomatique (*figure 5*).

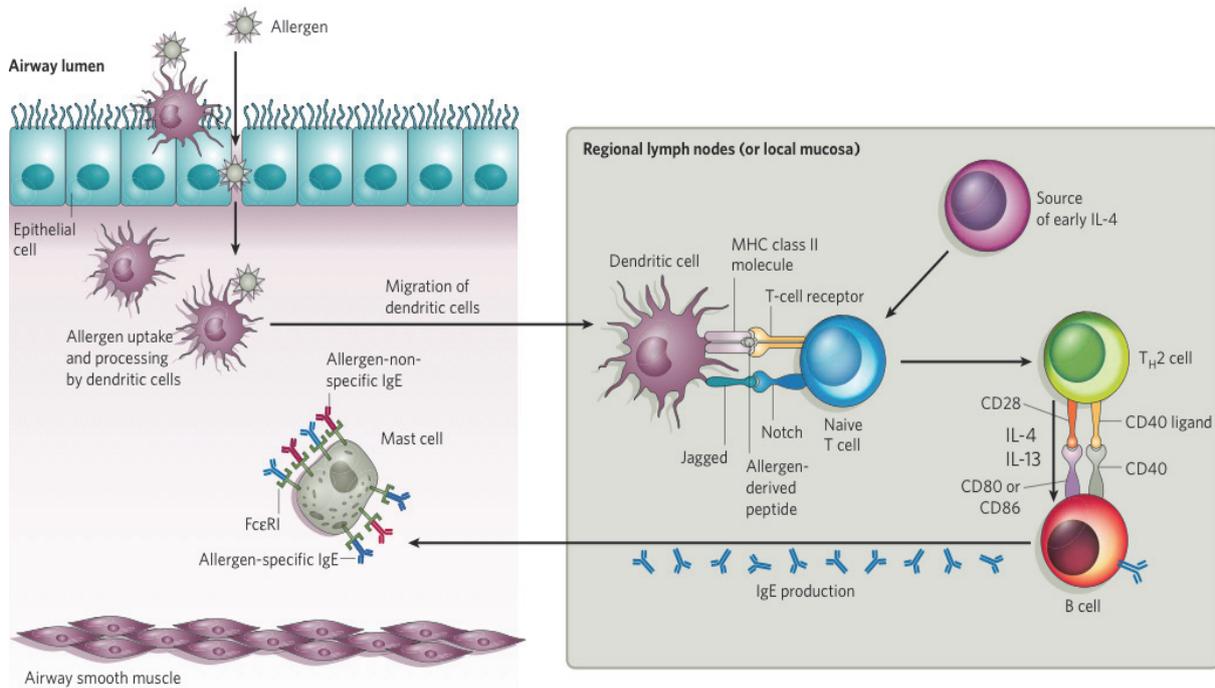


Figure 5. Phase de sensibilisation aux allergènes.

L'allergène peut être capté puis apprêté soit par les CD intra-épithéliales, soit par les CD présentes dans la sous-muqueuse. Les CD activées mûrissent et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles présentent le complexe CMH II/ peptide antigénique aux LT naïfs. En présence d'IL-4, les LT naïfs se différencient en LTh2 produisant entre autre de l'IL-4 et de l'IL-13. L'interaction entre les LTh2 et les LB conduit à la production d'IgE par les LB. Ces IgE spécifiques de l'allergène diffusent localement puis de façon systémique et se fixent sur les mastocytes tissulaires résidents via le FcεRI (récepteur de forte affinité aux IgE).

Adapté à partir de Galli S.J., Nature 2008.

1.4.2. La phase effectrice

Cette phase a lieu lors d'un contact ultérieur avec l'allergène et se décompose en deux phases successives : la réaction immédiate et la réaction retardée.

La réaction immédiate débute quelques minutes après l'exposition à l'allergène. Celle-ci se caractérise par l'activation des mastocytes et des basophiles suite à la fixation de l'allergène sur les complexes FcεRI/IgE présents à la surface de ces cellules, induisant la dimérisation

des récepteurs de forte affinité aux IgE (FcεRI). Cette dernière est indispensable à la transduction du signal qui aboutit à la libération de médiateurs préformés et néoformés aux propriétés vasoactives et/ou chimiotactiques (histamine, prostaglandines, leukotriènes, PAF (*Platelet-Activating factor*), chimiokines et cytokines). La libération de ces médiateurs entraîne une obstruction bronchique due à un spasme du muscle lisse bronchique, une sécrétion de mucus et un œdème du chorion. Outre leur rôle dans la réaction immédiate, les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement de cellules inflammatoires via l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales vasculaires (via le TNF par exemple) et la libération de facteurs chimiotactiques comme le LTB₄, PGD₂ et de chimiokines comme l'IL-8 et CCL2 (*figure 6*).

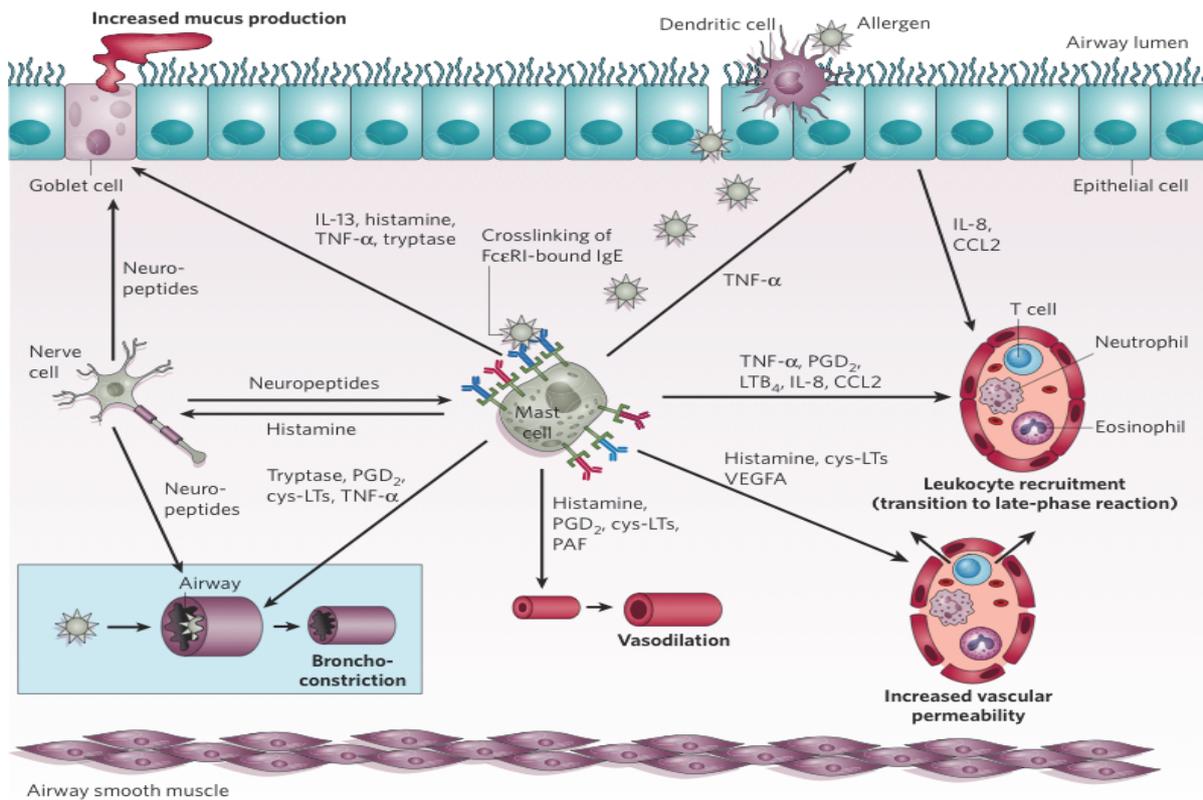


Figure 6. La réaction immédiate de la phase effectrice.

Lors d'un contact ultérieur avec des allergènes, ceux-ci se fixent sur les complexes IgE/FcεRI présents à la surface des mastocytes. Cette fixation induit la dimérisation des récepteurs aux IgE, aboutissant à la libération de médiateurs préformés et néoformés. Les médiateurs rapidement libérés sont responsables de la bronchoconstriction, de la vasodilatation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production de mucus. Les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement des cellules inflammatoires à la fois en augmentant les molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires (via le TNF-α) et en sécrétant des facteurs chimiotactiques (tels que le LTB₄ et le PGD₂) et des chimiokines.

Adapté de Galli S.J., Nature 2008.

La réaction retardée survient 2 à 6 heures après l'exposition à l'allergène. Elle est caractérisée par une infiltration de la muqueuse par différentes cellules du système immunitaire (lymphocytes, éosinophiles, basophiles et macrophages). Les substances pro-inflammatoires cytotoxiques, telles que la MBP (*Major Basic Protein*), l'ECP (*Eosinophilic Cationic Protein*), et l'EPO (*Eosinophil Peroxydase*) libérées par les éosinophiles sont responsables de la destruction de l'épithélium et de l'inflammation de la sous-muqueuse diminuant ainsi le diamètre des voies respiratoires. Les sous-populations lymphocytaires T auxillaires majoritairement Th2 interviennent dans le recrutement des cellules effectrices et dans l'activation de l'épithélium bronchique. Cette inflammation si elle devient chronique aboutit à long terme à une modification de l'architecture des voies respiratoires, également nommée

Chapitre 2: Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) sont une famille hétérogène de cellules qui contrôlent l'immunité, la tolérance centrale aux autoantigènes et la tolérance périphérique aux antigènes environnementaux et aux allergènes. Les CDs sont présentes dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes. Elles forment un réseau de cellules sentinelles capables de détecter les pathogènes via les récepteurs de reconnaissance des pathogènes (les PRRs), la phagocytose, le traitement et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T et B. Les CDs assurent le lien entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont capables de discriminer les pathogènes et les antigènes environnementaux inoffensifs présents. Les CDs contrôlent les antigènes agressifs en induisant la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LT effecteurs (Th1, Th2, Th17) alors que les antigènes inoffensifs sont tolérés via l'induction de LTregs, la délétion de cellules réactives, ou l'établissement de l'anergie pour éviter un endommagement de l'hôte.

2.1. Les CDs pulmonaires humaines

Sertl et ses collègues ont été les premiers à décrire la présence des CDs dans l'épithélium respiratoire, le parenchyme pulmonaire et la plèvre viscérale (57). Une étude réalisée par Donnenberg et al en 2003 a réussi à distinguer deux sous-populations de CDs dans les lavages broncho-alvéolaires humains : une sous-population de CDs myéloïdes (0,06%) et une sous-population de CDs plasmacytoïdes (0,02%). Les cellules de Langerhans, caractérisées par la présence des granules de Birbeck et par l'expression de CD1a, sont également présentes, mais limitées à l'épithélium bronchique et elles jouent comme les cellules de Langerhans de l'épiderme un rôle d'immuno-surveillance (58).

En absence d'inflammation, le nombre de CDs au niveau des bronches souches des voies respiratoires est de l'ordre de 500 à 800 CDs par mm² de surface épithéliale, ce nombre diminue au niveau des petites voies respiratoires (59). Dans le parenchyme pulmonaire, les CDs sont principalement présentes au niveau des septa intra-alvéolaires et sont à un stade immature caractérisé par une forte capacité d'internalisation des antigènes et une faible capacité de stimulation des LT (60). Une étude publiée en 2005 par Desmedts et al a identifié 3 sous-populations de CDs dans le parenchyme pulmonaire humain: deux sous-populations de CDs myéloïdes (les CDs myéloïdes de type I caractérisées par l'expression de CD11c et de

BDCA-1 (*Blood DC Antigen*) et les CD myéloïdes de type II caractérisées par l'expression de CD11c et de BDCA-3 et une sous-population de CD plasmacytoïdes caractérisée par le phénotype CD11c⁻/BDCA-2⁺/CD123⁺ (61). La même équipe a démontré que ces trois sous-populations expriment différents TLRs (*Toll like receptor*) (*tableau 2*) (62). Les CD myéloïdes de type 1 sont les plus puissantes à induire une prolifération des LT en comparaison avec les CD myéloïdes de type 2 et les CD plasmacytoïdes. Ces observations suggèrent que les CD myéloïdes de type 1 et à moindre degré les CD myéloïdes de type 2 sont capables d'induire une réponse immune active contrairement aux CD plasmacytoïdes qui pourraient être impliquées dans la tolérance immunitaire pulmonaire (61, 63).

DC subset	mRNA detected	Protein detected	Ligand stimulation shown	Refs
Myeloid DC1 (CD1c ⁺)	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR8	TLR1, TLR2, TLR4	TLR2, TLR3, TLR4	38
Myeloid DC2 (BDCA3 ⁺)	TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR8	TLR1, TLR2, TLR4	TLR2, TLR3, TLR4	38
Plasmacytoid DC (CD123 ⁺)	TLR1, TLR6, TLR7, TLR9	TLR9	TLR7, TLR9	38,46

BDCA3, blood DC antigen 3; DC, dendritic cell; TLR, Toll-like receptor.

Tableau 2. Expression des TLR par les CD pulmonaires humaines.

Adapté à partir de Holt P.G. et al, Nature reviews Immunology 2008.

2.2. Les CD pulmonaires murines

Chez la souris, cinq sous-populations de CD ont été caractérisées en fonction de l'expression de marqueurs de surface et de leur localisation. Les sous-populations de CD peuvent être grossièrement divisées en CD conventionnelles CD11c^{high}, CD plasmacytoïdes CD11c^{dim}. D'autres sub-divisions peuvent être réalisées en se basant sur l'expression du marqueur myéloïde CD11b.

Les CD conventionnelles résidentes intra-épithéliales des voies respiratoires sont CD11c^{high} CD11b⁻ CD103⁺ Langerin⁺ (64).

Immédiatement sous la lamina propria se trouvent les CD conventionnelles CD11c^{high} CD11b^{high} SIRPα⁺ CX3CR1⁺ et les CD plasmacytoïdes caractérisées par le phénotype CD11c^{dim} CD11b⁻ SiglecH⁺ BST2⁺. Les CD parenchymateuses sont également divisées en CD conventionnelles CD11b⁺ et CD11b⁻. Dans des conditions inflammatoires, les monocytes sanguins sont recrutés et se différencient en CD inflammatoires exprimant

CD11b⁺Ly6C⁺SIRPα⁺. Une population très rare de CDs tueuses productrices d'interferon (iKDCs : *Interferon killer Dendritic Cells*) et caractérisée par le phénotype CD11c^{dim}B220⁺NK1.1⁺ a été également observée dans le parenchyme pulmonaire (figure 8) (65).

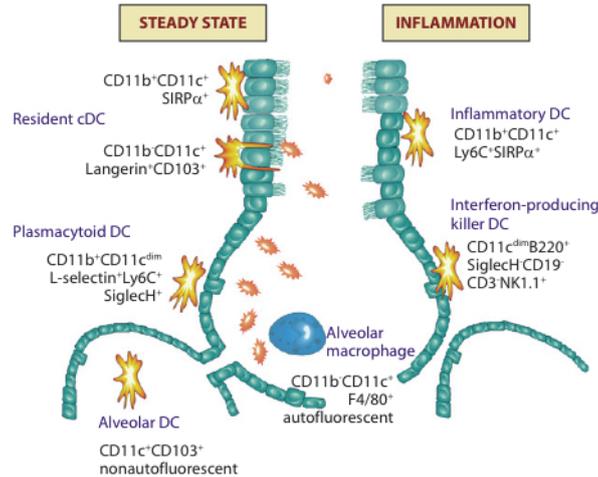


Figure 8. Les sous-populations de CDs et leurs fonctions.

Les différentes sous-populations de CDs accomplissent différentes fonctions. En cas d'homéostasie (STEADY STATE, à gauche) une distinction peut être faite entre les CDs conventionnelles et les CDs plasmacytoïdes. Les CDs conventionnelles sont également séparées en 2 sous-populations : CD11b⁺ et CD11b⁻. En cas d'inflammation (à droite) la situation est plus complexe. Les CDs inflammatoires qui expriment toujours Ly6C comme faisant partie de leur héritage monocytaire et les iKDC (*interferon killer Dendritic Cells*) sont recrutées. Dans les compartiments alvéolaires, les CDs et les macrophages sont présents et peuvent être distingués par leur taux d'autofluorescence.

Adapté à partir de Platinga M. et al, Eur.J. Immunol 2010.

2.3. Principales fonctions des CDs

2.3.1. Capture et internalisation des antigènes par les CDs immatures.

Les CDs expriment de nombreux récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR ; *Pattern Recognition Receptor*) dont les récepteurs Toll-like (TLR), les récepteurs NOD-like, les récepteurs PAR (*Protease Activated Receptor*) et les récepteurs lectine de type C (tableau 3). La stimulation de ces récepteurs par les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*) tels que les molécules issues de pathogènes, les DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) tels que les molécules issues de lésions tissulaires et les protéines de stress (HMGB1, l'acide urique et l'ATP) et les cytokines inflammatoires sont indispensables pour donner le signal de danger nécessaire à la maturation de la CD (66).

	Dendritic cells	Lung epithelial cells
PAMP receptors		
Toll like receptors	TLR1-10	TLR1-6
Intracellular receptors	NLRs, TLR 3, 7, 9	NLRs, TLR 9
C-type lectin receptors	Dectin-1, -2, DEC205, BDCA-2 Macrophage mannose receptor	
RIG-I-like receptors	MDA5, LGP2	MDA5
Protease activated receptors	PAR 1-3	PAR 1-4
DAMP receptors		
Complement receptors	hCR1, hCR2, hCR3, mC3aR, mC5aR	mC3aR, mC5aR
Prostanoid receptors	DP1, EP2, EP4, IP	
Neuropeptide receptors	NK1, CGRPR	
Purinergic receptors	P2X, P2Y	P2X, P2Y
HMGB1 receptor	RAGE	RAGE
Heat shock protein receptors	CD14, CD36, CD91	

Tableau 3. Quelques exemples des récepteurs exprimés par les CD et les cellules épithéliales pulmonaires. Ces récepteurs sont stimulés par les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern) ou les DAMP (Damage Associated Molecular Pattern).

Adapté à partir de Willart M.AM. &Hammad H., Allergy International 2010.

Au cours de la maturation, les CD dégradent l'antigène en peptides immunogènes dans les compartiments endosomaux. Ces peptides s'associent aux molécules de CMH. Les complexes peptides-CMH traversent le cytoplasme au sein des vacuoles d'exocytose et gagnent la membrane plasmique afin d'être présentés aux LT. La maturation des CD s'accompagne de différents changements phénotypiques : une augmentation de l'expression de CMH I et II, des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et CD86, des molécules de maturation (CD83) et d'adhésion. Ce phénotype est corrélé à une forte capacité des CD à activer les LT (*figure 9*) (67, 68).

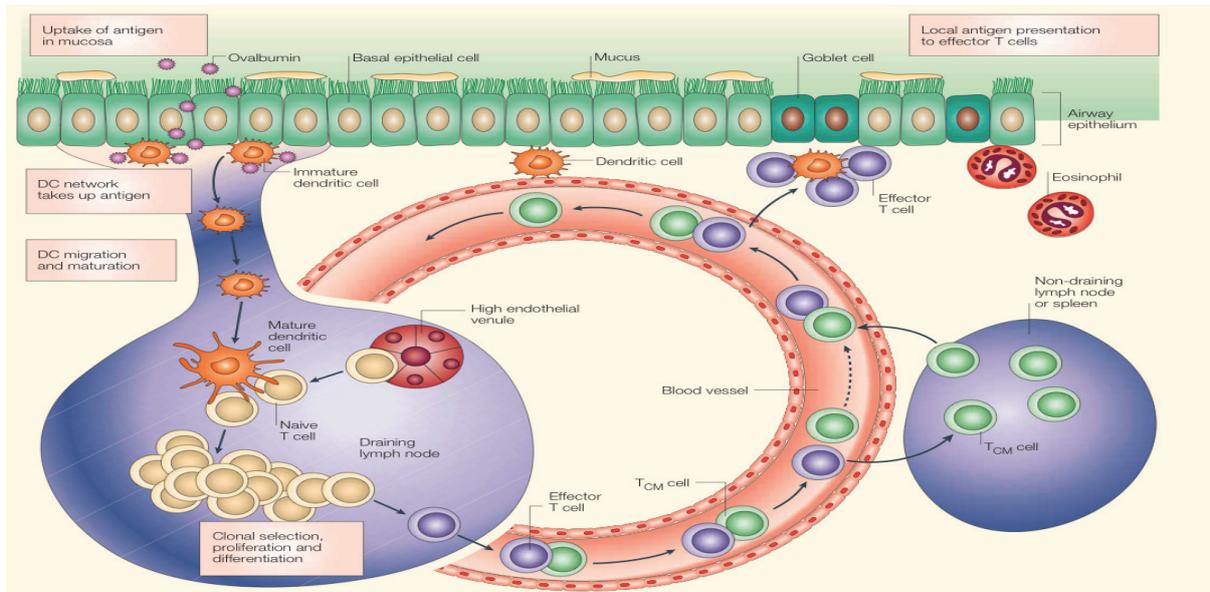


Figure 9. La migration des CD et des LT CD4⁺ durant les réponses immunes primaires et secondaires. L'antigène est capturé par les CD des muqueuses qui migrent continuellement des poumons dans les ganglions médiastinaux. Dans le cas d'une inflammation, ce processus est amplifié afin de présenter les antigènes dérivés de pathogènes aux LT naïfs ou mémoires centraux (T_{CM}). Après une expansion clonale, les LT spécifiques de l'antigène se différencient soit en LT_{CM} soit en LT effecteur. Les LT_{CM} diffuseront dans les autres ganglions non drainant et dans la rate où ils s'accumuleront éventuellement avec le temps. La réactivation des LT_{CM} aura lieu seulement dans les organes lymphoïdes centraux. Par contre, les LT effecteurs migreront vers les sites d'inflammation périphériques. Contrairement aux LT naïfs qui sont exclus des tissus pulmonaires, les LT effecteurs peuvent être restimulés par des CD locales pour exercer leurs fonctions effectrices. Dans ce scénario, d'autres cellules présentatrices de l'antigène exprimant le CMH II comme les éosinophiles ou même les cellules épithéliales pourraient être impliquées.

Adapté à partir de Lambrecht B.N. & Hammad H., Nature Reviews Immunology 2003.

2.3.2. Migration des CD vers les ganglions lymphatiques drainants

La migration des CD vers les ganglions drainants les poumons est dépendante des récepteurs CCR7/CCR8 (69, 70). La migration des CD pulmonaires est dirigée par un gradient chimiotactique de CCL19 et CCL21 dans les vaisseaux lymphatiques et la zone T des ganglions lymphatiques (71-73) (figure 10). La réponse des CD aux chimiokines CCL19/CCL21 et donc leur migration vers les ganglions lymphatiques est modulée par des médiateurs lipidiques. Ainsi PGE2 libéré entre autre par les cellules épithéliales alvéolaires au cours des réactions allergiques stimule la migration des CD pulmonaires dépendante de CCL19/CCL21 (74). A l'inverse PGD2 inhibe la migration des CD pulmonaires via l'activation du récepteur DP1 (75).

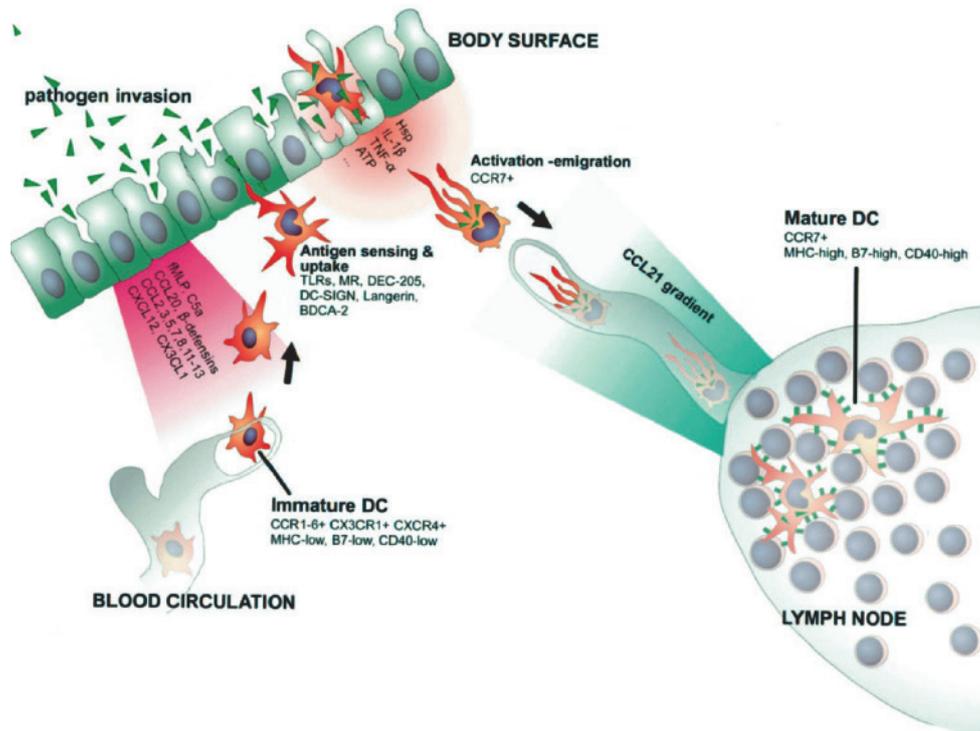


Figure 10. La migration des CD.

Les CD immatures sont recrutées à partir de la circulation sanguine en réponse à différents médiateurs libérés au niveau du site inflammatoire. Ces médiateurs peuvent être des chimiokines inflammatoires, les β -défensines, des peptides microbiens et les produits de clivage du complément. Après interaction avec les antigènes et en présence d'un signal de danger, les CD vont maturer et migrer du tissu jusqu'aux ganglions lymphatiques drainants le tissu. L'expression du marqueur CCR7 va permettre aux CD matures de quitter l'interface épithéliale pour gagner les ganglions drainants en réponse aux gradients chimiotactiques CCL19 et CCL21. Une fois dans les ganglions drainants, les CD vont interagir avec les LT pour induire une stimulation lymphocytaire.

Adapter à partir de Vermaelen K. & Pauwels R., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2005.

2.3.3. L'interaction CD/LT

Afin de reconnaître l'antigène, le LT a besoin d'établir un contact avec la CD en formant une synapse immunologique. Le TCR (*T cell receptor*) et les molécules de co-stimulation se positionnent au centre de la synapse immunologique et sont entourés par un anneau de molécules d'adhésion.

Au cours de l'interaction CD/LT, trois signaux sont délivrés par la CD (76). Les deux premiers sont nécessaires à l'activation du LT et le troisième signal détermine sa différenciation (77). Le premier signal est délivré par la CD à travers le TCR du LT après sa fixation au complexe CMH-peptide dont il est spécifique. Un niveau élevé de complexes CMH-peptide est nécessaire pour l'initiation du signal de transduction au cours de la stimulation d'un LT naïf (76). Cette activation déclenche une cascade de signalisation

conduisant à l'expression de différentes molécules dont le CD40L qui interagit avec CD40 exprimé par les LT. Les CD sont ainsi activées et augmentent en retour leur expression de molécules de co-stimulation CD80/CD86.

Le deuxième signal d'activation est issu de l'interaction entre CD28, exprimé de façon constitutive par les LT CD4, et les molécules CD80 ou CD86 (78). Mais ce second signal est finement régulé par un ensemble de signaux positifs et négatifs délivrés par les récepteurs CD28 et CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) respectivement. En effet, CTLA-4 transfère un signal inhibiteur de l'activation des LT lorsqu'il reconnaît les molécules CD80 ou CD86. Ce mécanisme protégerait les LT mémoires de l'apoptose induite par une forte activation via l'engagement du TCR. Ce signal régulateur empêcherait également les LT naïfs d'être activés de façon inadéquate et de provoquer des pathologies inflammatoires (79). Les CD activées produisent des cytokines qui constituent le 3^{ème} signal d'activation (80, 81). Ces cytokines vont déterminer la différenciation du LT CD4 naïf en LT effecteur de type Th1, Th2, Th17, ou LTreg (*figure 11*).

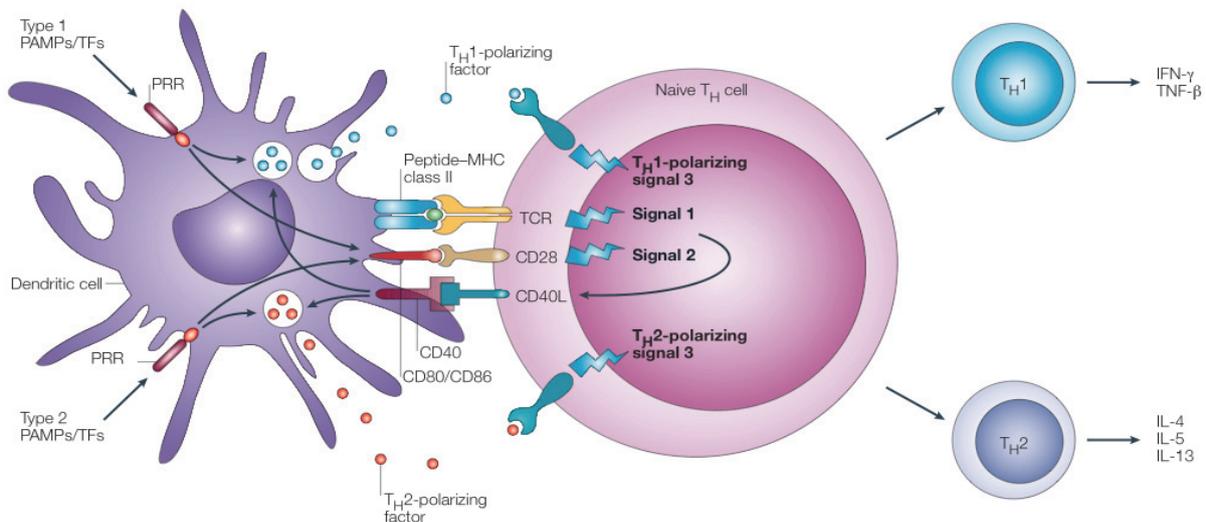


Figure 11. Interaction entre la CD et le LT.

Trois signaux sont nécessaires pour obtenir une réponse lymphocytaire T. Le premier signal implique la reconnaissance par le récepteur à l'antigène du LT (TCR) du peptide antigénique présenté dans le contexte du CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité). Le 2^{ème} signal implique l'interaction des molécules de co-stimulation (CD80/CD86) de la CD avec le CD28 du LT. Le 3^{ème} signal implique la sécrétion de cytokines par la CD qui participe à la polarisation de la réponse lymphocytaire.

Adapté à partir de Kapsenberg M.L., Nature Reviews Immunology 2003.

2.3.4. L'orientation de la réponse immunitaire

La CD a un rôle déterminant dans l'orientation de la réponse immune. Cette orientation dépend de son degré de maturité (expression des molécules de co-stimulation), de son profil de sécrétion de cytokines ou encore du nombre de CDs présent au niveau des organes lymphoïdes secondaires. La nature de l'antigène, la quantité, le temps d'exposition et les facteurs environnementaux déterminent la sécrétion préférentielle de certaines cytokines par les CDs et ainsi la polarisation de la réponse immune.

La sécrétion d'IL-12 par les CDs joue un rôle majeur dans l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil Th1 (82). L'IL-18 agit conjointement avec l'IL-12 pour favoriser la maturation et la production d'IFN- γ par les LTh1 (83). L'IL-23 et l'IL-27 en présence de faibles taux d'IL-12 participent également au développement d'un profil Th1 (84).

D'autres cytokines produites par les CDs favorisent le développement d'une réponse Th2. L'IL-6 est une cytokine qui régule négativement la production d'IL-12 (85, 86).

Enfin les CDs sécrètent des cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 impliquée dans le processus de tolérance immunitaire. Les CDs localisées au sein de la muqueuse bronchique pourraient être à l'origine de la génération de LTregs par leur synthèse d'IL-10 (88). Cette cytokine peut également réduire la production d'IL-2, de TNF- α et d'IL-5 par les LTs effecteurs (89, 90). Par ailleurs, une stimulation répétée de LT naïfs par des CDs immatures conduit à la génération de lymphocytes T à activité régulatrice (91, 92), démontrant ainsi le rôle important des cellules présentatrices de l'antigène dans la génération de la tolérance vis-à-vis d'un antigène (*figure 12*).

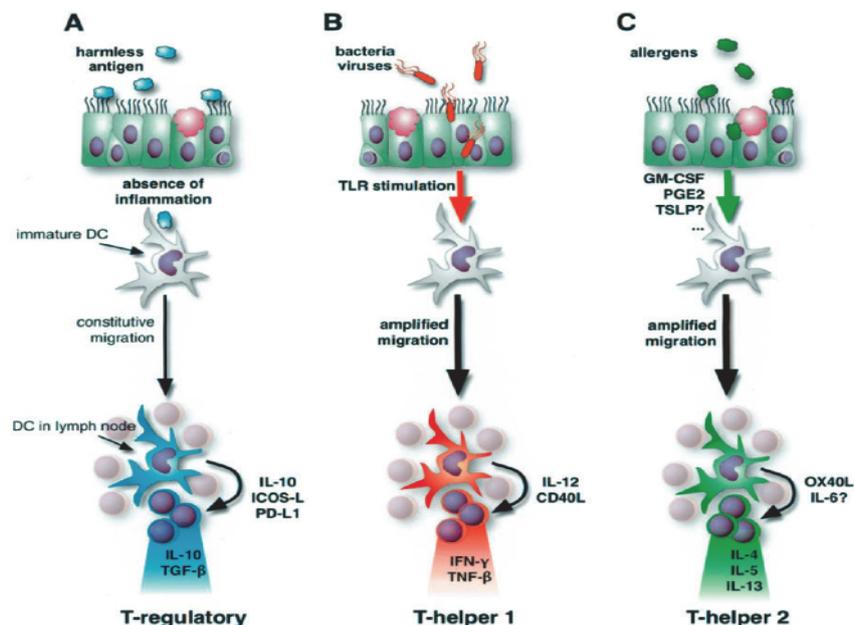


Figure 12. Représentation schématique des différents types de réponse lymphocytaire en fonction des antigènes.

A. En absence d'inflammation bronchique, les antigènes inoffensifs sont présentés aux LT après un processus normal de migration et induisent une réponse de type T-régulatrice favorisée par la sécrétion d'IL-10, d'ICOSL (inducible costimulator ligand) et du signal d'apoptose PD-L1 (programmed death ligand-1). B. Les pathogènes bactériens et viraux activent les CD via les TLRs et induisent une réponse de type Th1 favorisée par la sécrétion d'IL-12 et de CD40L. Cette réponse Th1 est cruciale pour une réponse anti-infectieuse efficace. C. Les allergènes à activité protéolytique tels que les allergènes d'acarien induisent la production de GM-CSF et de PGE2 par les cellules épithéliales et favorisent ainsi la migration des CD vers les ganglions médiastinaux. Ils induisent une réponse de type Th2. Alternativement, un antigène inoffensif peut devenir allergénique du fait de la présence concomitante d'un adjuvant environnemental tels que les particules diesel (non montré) induisant une réponse immune de type Th2. ICOS-L, Inducible Costimulatory Ligand; PD-L1, programmed death ligand-1; PGE2, Prostaglandin E₂; TSLP, Thymic Stromal Lymphopoietin.

Adapter à partir de Vermaelen K. & Pauwels R., Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2005.

2.4. Rôles des CD humaines dans la réaction inflammatoire allergique.

Chez l'homme, une augmentation du nombre des CD exprimant le FcεRI est observée dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques (93, 94). Les CD isolées du sang des sujets asthmatiques présentent également des différences en comparaison avec les CD isolées du sang des sujets sains. Les CD différenciées in vitro à partir de monocytes (Mo-DCs) isolés de patients allergiques ont une capacité accrue à présenter l'antigène aux LT (95). Plusieurs études ont montré que les CD isolées du sang de patients asthmatiques ou atopiques sécrètent des médiateurs inflammatoires et des cytokines polarisantes différentes de ceux sécrétés par les CD isolées du sang de sujets sains (96, 97).

Chez les sujets allergiques sensibilisés à *Dermatophagoïdes pteronyssinus*, la stimulation des Mo-DCs par Derp1 (un des allergènes majeurs de *Dermatophagoïdes pteronyssinus*) induit une augmentation de l'expression de CD83 (marqueur de maturation) et du CD86 qui n'est pas observée chez les sujets contrôles (sujets non allergiques ou allergiques à un allergène non relevant comme les graminées). En revanche, l'expression du CD80 n'est pas augmentée à la surface des Mo-DCs de sujets allergiques à *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et stimulés par Derp1 alors qu'elle l'est chez les sujets contrôles (97).

Les Mo-DCs de sujets allergiques activées par Derp1 produisent de grandes quantités de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6 comparativement aux Mo-DCs non activées. En revanche, chez les sujets non allergiques seule une augmentation transitoire de la production de TNF-α et de l'IL-6 est observée. Dans un système hétérologue, les Mo-DCs de sujets allergiques activées par Derp1 induisent la production d'IL-4 par les LT, alors que chez les sujets contrôles les Mo-DCs activées par Derp1 induisent la production d'IFN-γ (97). Ces observations suggèrent

que la polarisation de la réponse immune par les CD en réponse à une stimulation antigénique dépend de l'état immun des donneurs. Les CD de sujets allergiques contrairement à celles des sujets sains jouent un rôle crucial dans l'amplification de la réponse Th2 suggérant ainsi que les CD pourraient être responsable de l'établissement de la réaction allergique chez les patients allergiques.

Une étude récente a démontré que Derp1 est capable de se lier à DC-SIGN (*DC-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Nonintegrin*), un récepteur de type lectine C exprimé par les CD (98). Dans cette étude, les auteurs ont démontré que Derp1 module la différenciation et la maturation des Mo-DCs de patients allergiques en se liant à DC-SIGN. La stimulation des Mo-DCs de patients allergiques par Derp1 s'accompagne d'une internalisation du complexe Derp-DC-SIGN. Les Mo-DCs ainsi traitées expriment moins DC-SIGN et activent des LT de type Th2 (98).

Il a également été démontré que les CD myéloïdes (mDCs) de patients allergiques induisent une réponse immunitaire de type Th1 alors que les CD plasmacytoïdes (pDCs) induisent une réponse immune de type Th2. En revanche, chez les sujets sains, aucune de ces deux populations de CD du sang périphérique n'est capable de stimuler les LT naïfs. Ceci suggère que les pDCs et les mDCs des sujets allergiques à Derp1 présentent un dysfonctionnement dans leur réponse à Derp1 (96).

Les mDCs des sujets sains et allergiques à Derp1 auraient une capacité de capture de Derp1 plus élevée en comparaison avec celle des pDCs. Contrairement aux mDCs de sujets allergiques à Derp1, les mDCs de sujets sains stimulées par Derp1 surexpriment CD80 et sécrètent des taux élevés d'IL-10. Cette production d'IL-10 par les mDCs des sujets sains induit la génération de LT producteurs d'IL-10 (96). Chez l'homme, il a été également démontré que les Mo-DCs sécrétrices d'IL-10 génèrent des LT qui présentent des caractéristiques similaires à celles des LTregs de type Tr1 (99-102). Donc, l'IL-10 semble être cruciale dans la fonction régulatrice des CD tolérantes. Or chez les patients allergiques, le défaut de sécrétion d'IL-10 par les mDCs corrèle avec leur capacité à activer des LT allogéniques et à stimuler les LT naïfs vers une réponse immunitaire de type Th1. Ces données suggèrent que les mDCs des patients allergiques sont impliqués dans la dérégulation de la balance entre l'immunité et la tolérance immunitaire.

Il est à noter que les mDCs et les Mo-DCs des patients allergiques induisent des réponses lymphocytaires différentes. Les MoDCs stimulées par Derp1 activent des LT producteurs d'IL-4 tandis que les mDCs stimulées par Derp1 activent des LTh1. Ces différences peuvent s'expliquer par des variations dans les voies de capture de Derp1. Le récepteur de mannose

est impliqué dans la capture de Derp1 par les Mo-DCs alors qu'il n'est pas exprimé par les mDCs du sang périphérique. Ainsi, il a été démontré dans d'autres modèles que les voies d'internalisation des antigènes par les CD semblent interférer avec le processus de polarisation des LT naïfs (103, 104).

Une faible capacité de capture de Derp1 par les pDCs a été détectée chez les patients allergiques à Derp1 et chez les sujets sains. D'autre part, après 24h d'incubation avec Derp1, aucun marqueur de maturation tel que HLA-DR, CD80, CD86 n'a été observé chez les patients allergiques à Derp1 et les sujets sains. Et pourtant, les pDCs des patients allergiques stimulés par Derp1 induisent la polarisation des LT naïf vers un profil Th2 contrairement aux pDCs de sujets sains (96). Une étude récente a également décrit que l'exposition des patients atteints de rhinites allergiques à l'allergène approprié induit in vivo le recrutement des pDCs dans la muqueuse nasale où elles sont en contact avec l'allergène (105). Ces données suggèrent que si les pDCs peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques, elles pourraient être responsable de l'induction des réponses immunes Th2 spécifiques de l'allergène chez l'homme. Chez les sujets sains, les pDCs stimulés par Derp1 sont incapables d'induire la différenciation des LT vers un profil Th1 ou un profil Th2 (96) ce qui suggère que les pDCs des sujets sains contribueraient au maintien de la tolérance immune face à un antigène inhalé tandis que chez les patients allergiques, elles induisent une polarisation Th2 au cours des réactions allergiques.

2.5. Rôle des CD dans les modèles murins d'asthme allergique.

L'injection par voie intra-trachéale de CD myéloïdes pulsées avec de l'OVA (*Ovalbumine*) dans la trachée de souris naïves induit, après l'exposition des souris à des aérosols d'OVA, une hyperréactivité bronchique et une inflammation bronchique avec un infiltrat riche en éosinophiles (106, 107). Ces données suggèrent l'importance des CD myéloïdes dans le développement de l'asthme allergique dans les modèles murins. De plus, dans ces modèles d'inflammation pulmonaire allergique, la déplétion des CD myéloïdes dans les voies respiratoires avant l'exposition des souris aux aérosols d'OVA abolit complètement toutes les caractéristiques de l'asthme (107, 108). La déplétion des CD CD11c⁺ pulmonaires lors d'une réaction allergique déjà établie diminue également l'inflammation pulmonaire (108).

Dans un modèle d'asthme induit chez le rat, le nombre de CD est augmenté au niveau de l'épithélium bronchique et de la sous-muqueuse après sensibilisation et exposition à l'allergène. L'exposition à l'allergène induit également une augmentation du nombre de

précurseurs de CD^s au niveau de la moelle osseuse, fournissant un pool plus important de CD^s circulantes (109).

Au niveau du tissu pulmonaire, après exposition aux aérosols d'OVA, les CD^s CD11c⁺ CMH II⁺ sont activées (augmentation des molécules costimulatrices CD80, CD40, ICAM-1, PDL-1, PDL-2) et sont colocalisées avec les LT CD4⁺ dans les infiltrats péribronchiques et périvasculaires, suggérant un rôle des CD^s dans l'activation des LT CD4⁺ (108).

Le nombre de pDCs est également augmenté dans les poumons des souris après exposition à des aérosols d'OVA. Ces CD^s plasmacytoïdes, localisées dans le parenchyme pulmonaire, sont capables de transporter l'OVA depuis les poumons jusqu'aux ganglions drainant, mais une fois sur place, elles sont incapables d'induire la prolifération des LT naïfs spécifiques de l'OVA. La déplétion des pDCs durant la phase de sensibilisation à l'OVA aggrave toutes les caractéristiques de l'asthme allergique (éosinophilie pulmonaire, production spécifique d'IgE à l'OVA, production de cytokines de type Th2). Tandis que le transfert adoptif de pDCs avant la sensibilisation à l'OVA prévient le développement de la maladie (110). Ces observations montrent clairement que les pDCs sont capables de contrôler la réponse immunitaire développée lors de la phase de sensibilisation à un allergène.

De plus, il a été démontré que la déplétion de pDCs durant la phase secondaire (au moment de la réexposition à des aérosols d'allergène) s'accompagne d'une augmentation du nombre d'éosinophiles et d'un retard dans la résolution de l'inflammation pulmonaire (111).

L'ensemble de ces données montre que les mDCs contribuent à l'induction et au maintien de l'asthme tandis que les pDCs protègent contre le développement de l'asthme allergique chez la souris (112).

2.6. Principaux régulateurs de la fonction des cellules dendritiques pulmonaires.

Les voies respiratoires sont bordées par une couche de cellules épithéliales qui agit comme un tamis moléculaire excluant les pathogènes et les antigènes inhalés selon leur poids moléculaire. Cet épithélium respiratoire est la première ligne de défense de l'appareil respiratoire avec les CD^s situées dans l'espace basolatéral. En effet, dans les voies respiratoires comme dans l'intestin, ces CD^s envoient leurs pseudopodes entre les cellules épithéliales directement dans la lumière aérienne et scannent ainsi les antigènes inhalés. Ce mécanisme permet aux CD^s de jouer un rôle de cellules sentinelles dans la surveillance immunitaire locale et de contrôler l'induction de l'immunité innée et adaptative dans les voies respiratoires.

La réponse immune générée par les CD pulmonaires est largement dépendante de 2 types de signaux qu'elles reçoivent :

- les signaux liés aux propriétés intrinsèques de l'antigène.
- les signaux reçus de leur microenvironnement.

Ce microenvironnement se compose, dans le cas des CD pulmonaires, des cellules de l'épithélium respiratoire et d'autres cellules du système immunitaire tels que les macrophages alvéolaires, les macrophages interstitiels et les mastocytes. Des études de plus en plus nombreuses ont mis en évidence des interactions directes et indirectes entre les CD et ce microenvironnement qui contribue ainsi à la sensibilisation, à l'initiation et à la progression vers la maladie chronique.

2.6.1. Les cellules épithéliales

Il est clairement établi qu'une barrière épithéliale structurellement ou fonctionnellement défectueuse peut faciliter l'accès des aéro-allergènes aux CD.

Certains allergènes via leur activité protéolytique provoquent une lésion de l'épithélium au niveau des jonctions serrées et augmentent ainsi la perméabilité de l'épithélium bronchique. Mais l'épithélium respiratoire ne joue pas seulement un rôle de barrière physique dans l'asthme allergique. Les cellules épithéliales expriment de nombreux récepteurs de reconnaissance aux pathogènes (PRRs) tels que les TLRs et les PARs comme les cellules du système immunitaire. Les TLRs peuvent être également activés par des agonistes naturels comme les LPS bactériens présents dans l'air inhalé en même temps que les allergènes. La stimulation des cellules épithéliales par l'intermédiaire de ces récepteurs aboutit à l'activation de NF κ B et ainsi à la production de chimiokines (CCL20, CCL17, β -défensines) qui attirent les éosinophiles, les neutrophiles, les monocytes et les CD dans les voies respiratoires. Les cellules épithéliales activées produisent des cytokines capables d'induire la maturation des CD et la polarisation de la réponse immune vers un type Th2 (113). Les principales cytokines sécrétées par les cellules épithéliales et ayant la capacité d'activer les CD comprennent la protéine thymique stromale (TSLP), le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), l'IL-1 β , l'IL-33, l'ostéopontine et l'IL-25. De même plusieurs facteurs exprimés par les cellules épithéliales des voies respiratoires peuvent affecter la fonction des CD telles que le CD200 et la vitamine D (*figure 1*) (114).

La TSLP (*Thymic stromal lymphopoietin*) est une cytokine fortement exprimée par les cellules épithéliales des voies respiratoires des patients asthmatiques (115, 116). Les CD

stimulées par la TSLP favorisent la différenciation des LTs vers un profil Th2 (117-119). Les souris déficientes pour le gène de *tslp* ne parviennent pas à développer une réponse de type Th2 (120).

Le GM-CSF est une autre cytokine importante qui est produite par les cellules épithéliales des voies respiratoires suite à l'exposition aux allergènes protéolytiques. La surexpression du GM-CSF provoque une rupture de la tolérance et une induction des réponses Th2 par les CD8 (121). D'autres sensibilisants connus pour leur capacité d'activation des réponses Th2, telles que les particules diesel de gaz d'échappement et la fumée de cigarettes peuvent également induire la libération du GM-CSF par les cellules épithéliales.

L'IL-25 et l'IL-33 produites par les cellules épithéliales favorisent la différenciation des LT naïfs vers un profil Th2 par les CD8. La surexpression de l'IL-25 dans les poumons ou l'administration systémique de l'IL-25 aux souris induit une hyper-éosinophilie sanguine, une augmentation des taux sériques d'IgE et augmente la production des cytokines Th2 et le recrutement des éosinophiles dans les voies respiratoires (122, 123). Un défaut de signalisation de l'IL-25 s'accompagne d'une diminution des taux de cytokines produites par les cellules épithéliales bronchiques et par les éosinophiles (124).

Des données récentes suggèrent que **l'IL-33** est une alarmine (125) qui jouerait un rôle dans la détection des endommagements tissulaires. Les cellules épithéliales des voies respiratoires sont les principales cellules productrices d'IL-33 et des taux élevés d'IL-33 sont détectés dans le lavage broncho-alvéolaire de souris asthmatiques et dans les cellules épithéliales des voies respiratoires chez les sujets asthmatiques (126-128).

L'IL-1 β est libérée par les cellules épithéliales des voies respiratoires en culture suite à une exposition avec l'allergène Derp1. L'IL-1 β stimule la production de CCL20, le chimioattractant des CD8 et la production des cytokines responsables de la maturation des CD8 telle que la TSLP et le GM-CSF par les cellules épithéliales (129, 130).

L'ostéopontine est une autre cytokine présente en quantité élevée dans les voies respiratoires des patients asthmatiques en comparaison avec les sujets non-asthmatiques. Il est très probable que l'ostéopontine favorise l'activation des LTh2 en altérant la balance entre les CD8 tolérantes et immunogènes dans les poumons bien que le mécanisme mis en jeu ne soit pas clairement identifié à ce jour (131).

CD200: Les cellules épithéliales des voies respiratoires expriment le CD200 tandis que son récepteur CD200R (récepteur immun d'inhibition) est exprimé par les macrophages alvéolaires et les CD8 pulmonaires. Cette liaison CD200-CD200R régule l'activité et la fonction des macrophages alvéolaires et des CD8 pulmonaires afin de limiter leurs réponses

dans le cas des infections virales (virus influenza) (132, 133). Il a été démontré que les macrophages alvéolaires cultivés en présence des cellules épithéliales sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (133). Bien qu'il ne soit pas clairement établi que cette voie CD200-CD200R soit directement impliquée dans l'interaction entre les cellules épithéliales bronchiques et les CD, il est probable que cet axe contribue au moins indirectement au contrôle de la fonction des CD.

La vitamine D: Les cellules épithéliales des voies respiratoires expriment l'enzyme hydroxylase 1 α qui convertit la vitamine D en sa forme active. Or le traitement des CD par la vitamine D3 induit l'expression de PD-L1 par les CD, leur production d'IL-10 et par ce biais la génération de LTregs producteurs d'IL-10 (134, 135). Plusieurs rapports ont décrit un lien entre la déficience en vitamine D et l'asthme (136). Ces données suggèrent que les cellules épithéliales peuvent orienter les CD vers un phénotype tolérant via leur sécrétion de la vitamine D.

En résumé, la fonction des cellules épithéliales en tant que barrière physique détermine l'accessibilité des allergènes aux CD pulmonaires capables d'activer la réponse immune adaptative. Mais les cellules épithéliales influencent également le phénotype immunogène/tolérant des CD et leur état de maturation en libérant des facteurs pro- ou anti-inflammatoires en réponse aux agressions physiques qu'elles subissent ou aux pathogènes qu'elles détectent.

La mise en évidence récemment d'une activation directe des cellules épithéliales respiratoires par l'allergène Derp1 par l'intermédiaire de TLR4 est une avancée majeure dans la compréhension du rôle de ces cellules dans la physiopathologie de l'asthme allergique.

Une meilleure compréhension des interactions entre les cellules épithéliales et les CD pourrait conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques de la maladie asthmatique.

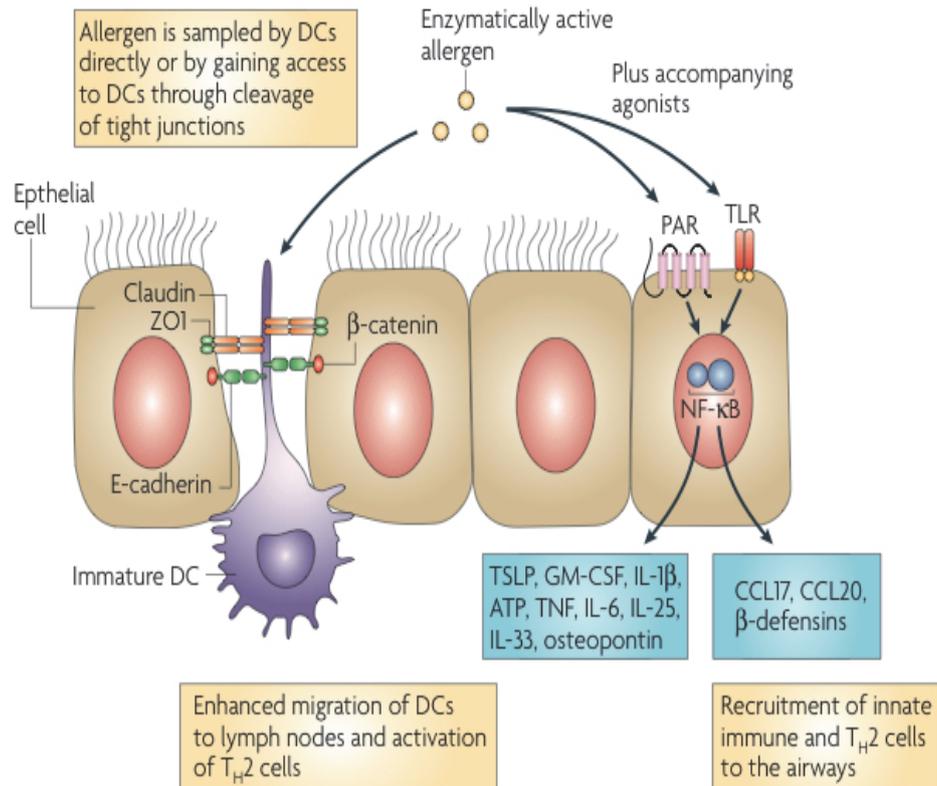


Figure 13. Interactions entre les cellules épithéliales et les CD dans les voies respiratoires.

Les CD scanent la lumière aérienne en émettant des extensions entre les cellules épithéliales. Les CD forment des jonctions étroites avec les cellules épithéliales. Les allergènes peuvent activer les récepteurs PARs (Protease Activated Receptor) et les récepteurs TLR (Toll like Receptor) exprimés par les cellules épithéliales induisant ainsi l'activation de NF-κB et la production de chimiokines et de cytokines par les cellules épithéliales. Ces cytokines et chimiokines vont attirer et activer les CD. Les TLR peuvent être activés par des agonistes naturels comme les LPS bactériens présents dans l'air inhalé en même temps que les allergènes. CCL, CC-chemokine ligand; GM-CSF, granulocyte/macrophage stimulating factor; IL, interleukin, Th2 cell, T helper cell, PAR, protease-activated receptor; TNF, tumor-necrosis factor; TSLP, thymic stromal lymphopoietin; TLR, Toll Like Receptor.

Adapté à partir de Hammad H. & Lambrecht B.N., Nature Reviews Immunology 2008.

2.6.2. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages tissulaires jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie et les défenses de l'hôte. Dans les poumons, les macrophages sont localisés dans les espaces alvéolaires (MAs, macrophages alvéolaires) mais aussi dans l'interstitium pulmonaire (MIs, macrophages interstitiels). La fonction des macrophages alvéolaires est de répondre aux antigènes inhalés tout en limitant une inflammation excessive afin de préserver les fonctions respiratoires. Les MAs sont continuellement exposés aux substances inhalées en raison de leur position dans la lumière alvéolaire. Afin d'éviter une réponse immune vis-à-vis

d'allergènes inoffensifs, les MAs sont maintenus dans un état quiescent. Ils produisent peu de cytokines pro-inflammatoires et présentent de faibles capacités de phagocytose du fait d'une faible expression du récepteur phagocytaire CD11b (137). Ils produisent cependant divers médiateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et le TGF- β (138) qui suppriment l'activation des LT (139, 140) ainsi que la maturation et les fonctions CPA des CDs (141-143). La déplétion des MAs *in vivo* entraîne des réactions inflammatoires exagérées en réponse à des antigènes inoffensifs (143). Les MAs adhèrent étroitement aux cellules épithéliales des voies respiratoires et sont séparés des CDs interstitielles seulement par une distance de 0,2-0,5 μ m. Chez les souris dont les MAs sont déplétés, les CDs présentent une augmentation de leur fonction présentatrice de l'antigène (141). De même, il a été démontré que la déplétion des MAs entraîne une augmentation du nombre des CDs dans les espaces alvéolaires, une augmentation de la capture des particules par les CDs ainsi qu'une migration accrue des CDs dans les ganglions drainants. Cette étude a mis en évidence un rôle probable des MAs dans la régulation de la localisation, de l'activité et de la migration des CDs en conditions normales non inflammatoires (steady-state) (73).

Les MAs sont maintenus dans un état quiescent grâce à l'interaction du TGF- β membranaire exprimé à leur surface avec l'intégrine $\alpha\beta 6$ exprimée à la surface des cellules épithéliales alvéolaires (144) (*Figure 14, 1*) (145). Les MAs restent toutefois capables de reconnaître les micro-organismes inhalés *via* les TLRs (146) provoquant dans ce cas une diminution de leur interaction avec les cellules épithéliales. Cette perte d'interaction s'accompagne d'une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha\beta 6$ par les cellules épithéliales. L'inhibition des MAs est ainsi levée (*Figure 14, 2*). Les MAs retrouvent alors leur capacité de phagocytose et de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. La résolution de l'inflammation implique l'activation et le recrutement des LT sur le site de l'inflammation. La sécrétion d'IFN- γ par les LT activés induit la production de MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase- 9*) par les MAs (*Figure 14, 3*). Cette MMP-9 active le TGF- β à la surface des MAs et augmente l'expression de l'intégrine $\alpha\beta 6$ par les cellules épithéliales. Le complexe TGF- β - $\alpha\beta 6$ peut à nouveau se former et inhiber les fonctions inflammatoires des MAs (145).

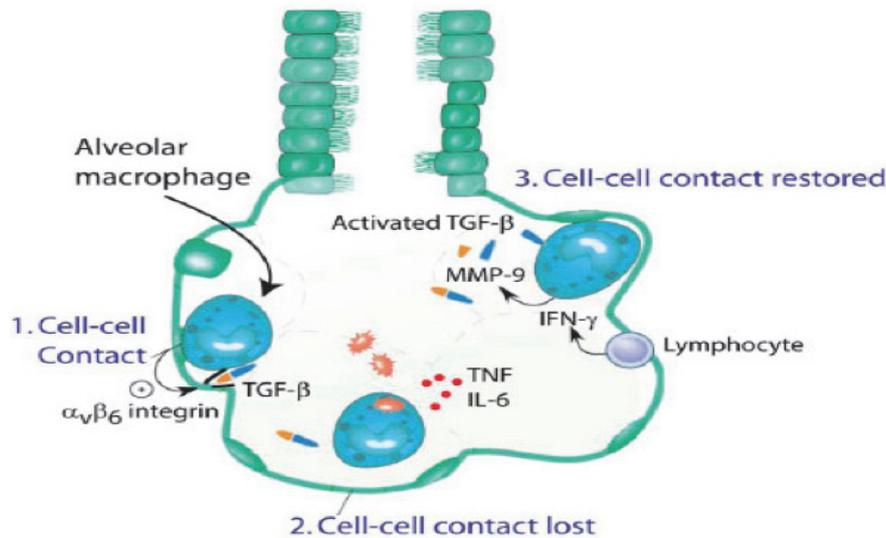


Figure 14. Inhibition/activation des MA et contrôle de l'immunité pulmonaire.

En condition normale (*steady state*), (1) les MAs adhèrent étroitement aux cellules épithéliales alvéolaires via le couple TGF- β -intégrine $\alpha_v\beta_6$ ce qui maintient les MAs dans un état quiescent. Suite à la reconnaissance des antigènes via les TLRs, les MAs se détachent des cellules épithéliales alvéolaires et l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_6$ est rapidement éteinte. L'inhibition des MAs est ainsi levée. Les MAs reprennent leur activité phagocytaire et produisent des cytokines pro-inflammatoires (2). Après quelques jours, les LT activés et recrutés dans le tissu stimulent la production de MMP-9 par les MAs via la sécrétion d'IFN- γ . La MMP-9 active le TGF- β et permet la restauration de la liaison TGF- β / $\alpha_v\beta_6$. Les fonctions pro-inflammatoires des MAs sont à nouveau inhibées et l'homéostasie pulmonaire est restaurée.

Adapté à partir de Lambrecht B.N., *Immunity* 2006.

L'activité pro-inflammatoire des MAs est également régulée par la liaison des protéines du surfactant avec le récepteur SIRP- α (*Receptor Signal Regulatory Protein- α*) (147). Les MAs expriment également des taux élevés du récepteur régulateur CD200R. La liaison de CD200 exprimé par les cellules épithéliales avec ce CD200R exprimé par les MAs joue également un rôle central dans l'homéostasie du tractus respiratoire (133).

2.6.3. Les macrophages interstitiels

Les macrophages interstitiels (MIs), par leur localisation dans le parenchyme pulmonaire, sont idéalement situés pour interagir avec les CD. La grande proximité entre ces deux types cellulaires a été mise en évidence par immunohistochimie (*figure 15*). Afin d'étudier les interactions potentielles entre les CD et les macrophages, des modèles de co-culture ont été réalisés dans lesquels des CD et des MAs ou MIs, ont été exposés à un antigène inoffensif en présence de LPS (ajouté à une concentration similaire à celle de l'air ambiant). Les CD ont été ensuite injectées à des souris syngéniques receveuses, et la sensibilité des souris à l'encontre de l'antigène a été étudiée. Les CD cultivées en présence de MAs induisent une

sensibilisation allergique des souris receveuses contrairement aux CDs incubées en présence de MIs. Ces dernières présentent un phénotype plus immature et une activité migratoire diminuée par comparaison aux CDs incubées seules ou en présence de MAs. Ce résultat s'explique par le fait que les MIs, lorsqu'ils sont exposés au LPS, sécrètent de grandes quantités d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui bloque la maturation des CDs et provoque leur paralysie (*figure 15*). Ces résultats démontrent sans ambiguïté l'importance des MIs dans l'homéostasie pulmonaire. Ce rôle est confirmé par des expériences in vivo de déplétion sélective des MIs. Leur déplétion permet la sensibilisation des souris à un antigène inoffensif administré avec de faibles doses de LPS, un protocole qui n'induit pas de réponse chez les souris non déplétées en MIs. Ces résultats suggèrent qu'en conditions normales les MIs sécrètent de l'IL-10 en réponse au LPS et, par ce biais, bloquent l'activité des CDs, prévenant ainsi les réponses non désirables et potentiellement dangereuses à l'encontre d'antigènes inoffensifs. Dans ce modèle, la non-réponse aux antigènes inoffensifs est basée sur une ignorance, plutôt qu'une tolérance, de l'antigène par le système immunitaire (148, 149).

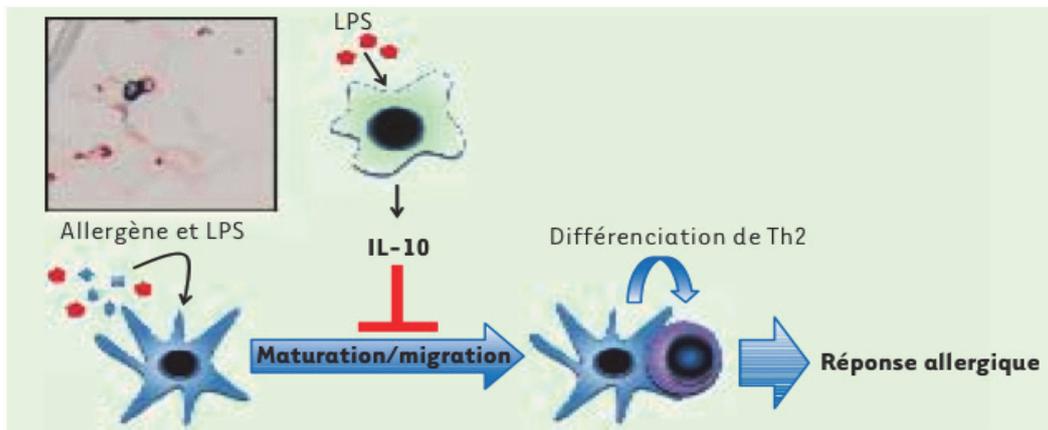


Figure 15. Les macrophages interstitiels induisent un état d'ignorance immunitaire en conditions physiologiques.

Encart. Des cryo-coupes de poumons de souris ont été analysées par immunohistochimie afin d'identifier les macrophages interstitiels (MI, en rouge) et les cellules dendritiques (CDs, en bleu). Sur cette photographie, le contact entre une CD et un MI peut être observé.

Schéma. Modèle de la régulation de l'homéostasie immune pulmonaire par les MI en conditions physiologiques non inflammatoires. Les CDs (en bleu), lorsqu'elles sont exposées à un allergène accompagné d'endotoxine (LPS), comme cela se passe dans la majorité des situations physiologiques, devraient induire le développement de lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2, en mauve) favorisant les allergies pulmonaires. Dans ce modèle, la stimulation des MI par le LPS empêche ce processus. Les MI stimulés par le LPS produisent la cytokine immunosuppressive IL-10, laquelle bloque la maturation et la migration des CDs. Les réponses immunes adaptatives ne peuvent dès lors se développer et l'allergène est ignoré par le système immunitaire pulmonaire.

Adapté à partir Bedoret Denis et al Medecine Science 2010.

2.6.4. Les mastocytes

Les mastocytes (MCs) sont localisés au niveau des muqueuses c'est à dire au niveau des sites d'entrée des antigènes. Les MCs humains et murins activés par la dimérisation de leurs récepteurs aux IgE libèrent des chimiokines capables d'attirer les CDs immatures : CCL2, CCL3 et CCL4 (150, 151). Réciproquement, il a été démontré que les CDs produisent CCL5 et CCL8 lesquelles peuvent interagir avec le récepteur CCR3 exprimé par les MCs. De plus en plus d'études s'intéressent aux interactions entre les CDs et les MCs au cours des réponses immunitaires et ont démontré que les MCs modulent l'activité des CDs.

L'histamine par exemple qui est stockée dans les granules des MCs et dans ceux des basophiles exerce plusieurs effets sur les CDs par l'intermédiaire des récepteurs H1R, H2R et H4R. L'histamine est un facteur chimio-attractant des CDs humaines, propriété principalement imputée au récepteur H4R avec une contribution modeste du récepteur H1R décrite (152-155). L'histamine inhibe la sécrétion d'IL-12 (IL-12p70) par les CDs et augmente la production d'IL-10 et d'IL-6 (152, 154, 156-161). Ces données suggèrent que

l'histamine via le récepteur H1R polarise les CD8 vers un profil induisant la génération des LTh2 (*figure 16*). L'histamine via ces récepteurs H1R et H2R induit également la maturation des CD8. Elle augmente l'expression des molécules de CMH II et CD86 par les CD8 (156, 157). Des données obtenues *in vivo* ont démontré que l'histamine sécrétée par les MCs dans un modèle d'hypersensibilité cutanée agit sur les cellules de Langerhans via son récepteur H2R et induit leur migration vers les ganglions lymphatiques drainants. Ceci souligne que l'activation des MCs *in vivo* peut influencer la migration des CD8 (162-164).

D'autres facteurs libérés par les MCs après l'engagement du FcεRI ont des effets redondants par rapport à l'histamine. Le TNF et l'IL-1β facilitent la migration et la maturation fonctionnelle des CD8 (165, 166). L'IL-16 (167), l'IL-18 (168), CCL5 (169, 170) et PGE2 (171) augmentent également la migration des CD8. Le TNF et les exosomes provenant des MCs augmentent l'expression des intégrines α₆β₄ et α₆β₁, de CMH II, CD80, CD86 et CD40 induisant ainsi la maturation fonctionnelle des CD8 (172, 173). Il a été démontré que PGD2 et PGE2 inhibent également la production de l'IL-12 par les CD8 renforçant la polarisation Th2. A l'inverse des autres facteurs cités, PGD2 bloque la migration des CD8 (75). La TSLP produite par les MCs promeut la maturation des CD8 et active le développement des LTh2 (174) et la production de CCL17 (également nommée TARC) par les CD8. CCL17 est une chimiokine qui induit la migration de LTh2.

Récemment, l'étude réalisée par Mclachlan J.B. et al a démontré sans ambiguïté l'effet adjuvant des MCs sur les CD8. L'administration sous-cutanée ou intra-nasale de molécules activatrices des MCs, en même temps que l'antigène en lieu et place des adjuvants classiquement utilisé comme l'hydroxyde d'aluminium, induit une réponse immune systémique protectrice contre l'antigène en provoquant une augmentation de la mobilisation et de l'activation des CD8 dans les ganglions drainants. Par contre, ces molécules activatrices des MCs étaient incapables d'induire des réponses immunes optimales chez les souris déficientes en mastocytes (175).

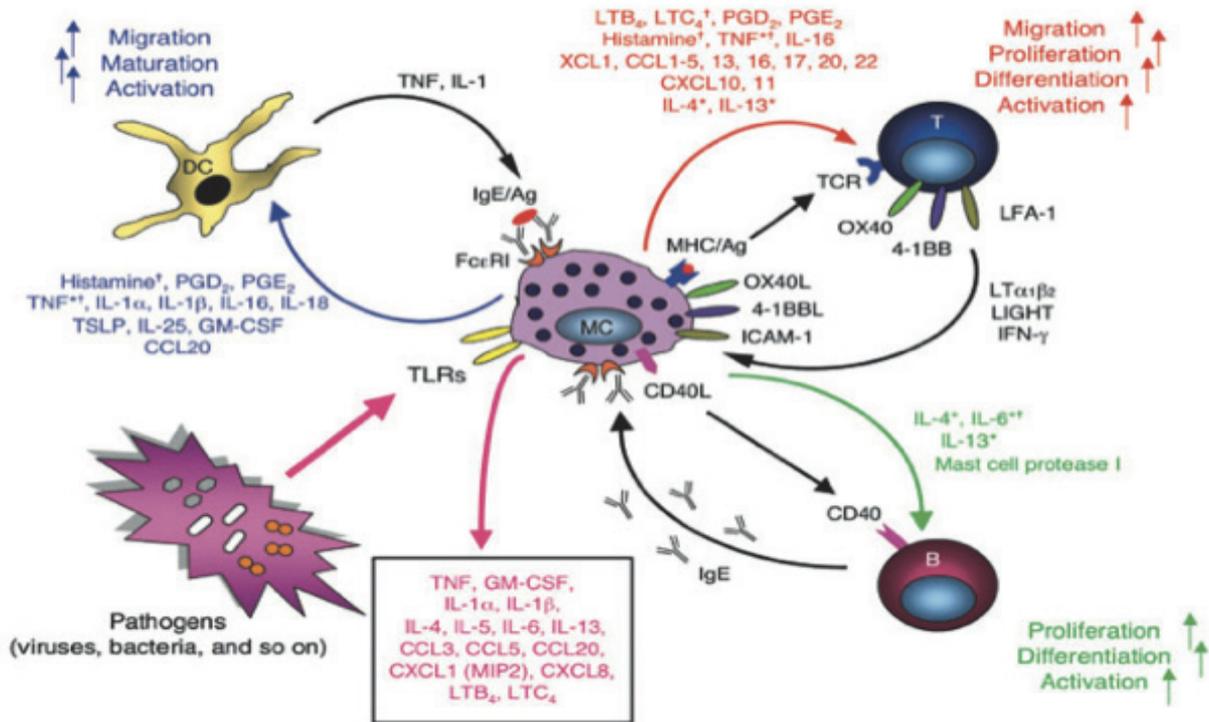


Figure 16. Mécanismes par lesquels les MCs peuvent influencer les CD.

Les molécules membranaires exprimées par les MCs et leurs produits de sécrétion influencent plusieurs aspects de la biologie et de la fonction des CD. En retour, les CD peuvent également influencer la fonction des MCs.

Adapté à partir de Galli S.J. et al, Nature Immunology 2005.

A la lumière de ces différentes données, les MCs n'apparaissent plus seulement comme des cellules délétères responsables des symptômes cliniques dans les maladies allergiques mais également comme des cellules capables de réguler la fonction des CD et donc d'entretenir une réponse immune inadaptée vis-à-vis de l'allergène.

Chapitre 3: La balance LT effecteurs/LT régulateurs dans l'allergie

Dans ce chapitre, nous allons discuter le rôle des différentes sous-populations de LT impliquées dans l'asthme allergique qui n'apparaît plus exclusivement comme un dysfonctionnement induit par les LTh2. L'asthme a été longtemps interprété dans le cadre très restreint du fameux paradigme Th1/Th2. La participation d'autres LT dans la pathogenèse de l'asthme allergique a été étudiée et met en cause des LTh17, LTh9, LiNKT, LT $\gamma\delta$, les T CD8⁺ et les LTregs (*figure 17*).

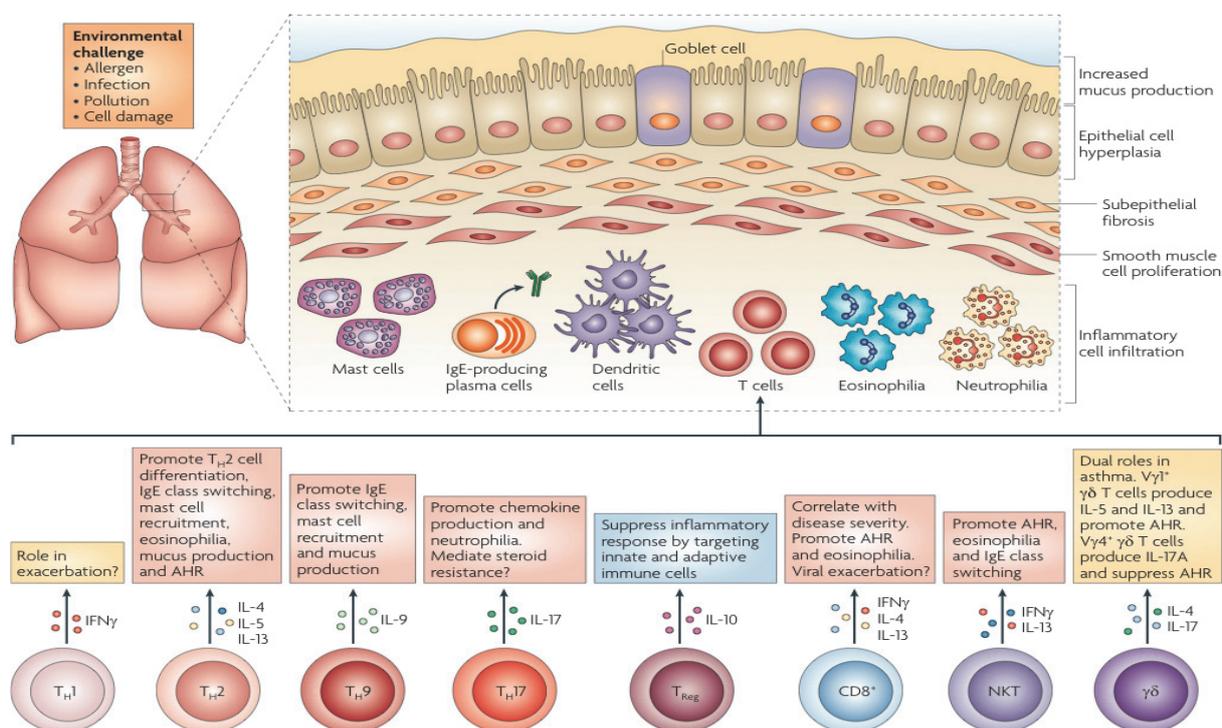


Figure 17. Les différentes sous-populations de LT impliquées dans le phénotype asthmatique. Différentes sous-populations de LT influencent les réponses immunes allergiques. Les LTh2 assurent le recrutement des éosinophiles en conjonction avec les LiNKT et les LTCD8⁺. Les LTh1 et les LTh17 sont associés à l'asthme sévère résistant aux stéroïdes souvent caractérisé par un infiltrat riche en neutrophiles. Les LTregs et la sous-population de LT $\gamma\delta$ sont capables de réguler négativement les réponses immunes pulmonaires et sont importants dans l'homéostasie du système immunitaire. IFN γ , Interféron- γ ; IL, Interleukin.

Adapté de Lloyd C.M. & Hessel E.M., Nature Reviews Immunology 2010.

3.1. Les lymphocytes Th1 et Th2

3.1.1. *Les lymphocytes Th2*

Le rôle essentiel des LTh2 a été suggéré suite à la présence massive des LTh2 dans les voies respiratoires de sujets souffrant d'asthme (176, 177).

Un grand nombre de données provenant des modèles humains et murins a mis en évidence que les LTh2, via la production des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 peuvent initier et entretenir les caractéristiques pathophysiologiques de la maladie (178, 179). L'IL-4 est importante pour la sensibilisation allergique et la production d'IgE et l'IL-5 pour la survie des éosinophiles. L'IL-13 a également des effets délétères sur les poumons. Elle joue un rôle central dans l'hyperréactivité bronchique et le remodelage tissulaire.

Les LT CD4⁺ activés (augmentation de l'expression de CD25) sont détectés 24 heures après la provocation allergénique dans le lavage broncho-alvéolaire de sujets atteints d'asthme allergique. Des études ont montré que l'activation des LT dans le lavage broncho-alvéolaire est corrélée à la sévérité de l'asthme (évaluée par l'hyperréactivité bronchique) et à l'éosinophilie bronchique (180-182). Ces LT expriment des taux élevés d'ARNm de l'IL-4 et de l'IL-5 (180), suggérant une augmentation du nombre de LTh2. Des biopsies de tissus pulmonaires confirment également un nombre accru de LT CD4⁺ activés au sein de la muqueuse (183). Les ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-5 sont également détectés dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques allergiques (184).

De plus, le nombre de cellules exprimant les facteurs de transcription GATA-3, c-Maf et STAT6 (associés au profil de lymphocyte Th2) est plus important dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques allergiques comparativement aux sujets contrôles (185, 186). A l'inverse, le nombre de cellules exprimant T-bet (facteur de transcription associé au profil de LTh1) est réduit (187).

Plusieurs études chez la souris ont souligné le rôle des LT CD4⁺ et des réponses immunes de type Th2 dans la maladie asthmatique allergique. Des souris déficientes en LTCD4⁺ (par déplétion ou inactivation des LTCD4⁺ totaux) et des souris déficientes en IL-4 développent une réaction asthmatique atténuée en comparaison avec des souris sauvages contrôles, après immunisation et challenge avec l'allergène (188, 189).

Le transfert de LTh2 spécifiques de l'OVA provenant de souris transgéniques DO11.10 (souris ayant un TCR spécifique de l'OVA) ou de souris immunisées à l'OVA, à des souris naïves induit une éosinophilie pulmonaire et une hyperréactivité bronchique après challenge des souris receveuses par l'OVA (190, 191). Chez des souris SCID, le transfert de LTh2, un

jour après l'administration intra-nasale d'OVA, suivi de plusieurs challenge d'OVA s'accompagne également d'une hyperréactivité bronchique et d'une inflammation pulmonaire (192). Étant donné l'importance des facteurs de transcription STAT6 et GATA3 dans la différenciation des LTh2, plusieurs études ont évalué leur rôle dans le développement de la réaction pulmonaire allergique (*figure 18*). Des souris déficientes pour le facteur de transcription STAT6 ne développent pas d'inflammation pulmonaire après immunisation et challenge à l'OVA (193). Chez des souris sensibilisées à l'OVA, l'administration intra-nasale d'un nucléotide anti-sens de STAT6 avant le challenge réduit l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire (194, 195). De la même façon, l'administration d'un nucléotide anti-sens pour GATA-3 à des souris immunisées, avant le challenge à l'OVA, inhibe la réponse Th2, l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique (196). L'ensemble de ces données humaines et murines souligne le rôle crucial des LTh2 dans le développement de la réaction pulmonaire allergique.

3.1.2. Les lymphocytes Th1

Le rôle des LTh1 dans le développement de l'asthme allergique est plus hardu à évaluer. Dans certaines études, les LTh1 atténuent la réaction allergique, tandis que dans d'autres études ils la potentialisent.

Des lymphocytes Th1 ont été également détectés dans les voies respiratoires des patients asthmatiques (197). Certaines études ont conforté le rôle protecteur des LTh1 principalement par inhibition de la fonction des LTh2. Ainsi, l'immunothérapie avec des allergènes tels que le venin d'hyménoptère ou les graminées est capable d'augmenter l'expression de l'IFN- γ et de diminuer chez la plupart des patients la production d'IL-4 (198, 199). De même, une immunothérapie avec des extraits de l'acarien *Dermatophagoïdes pteronyssinus* améliore la fonction pulmonaire des enfants atteints d'asthme allergique. Cette amélioration a été attribuée à la diminution des taux sériques d'IL-4 et d'IL-13 et à l'augmentation des taux sériques d'IFN- γ (200).

Le transfert de LTh1, issus de souris transgéniques avec un TCR spécifique de l'OVA, à des souris naïves n'induit pas d'hyperréactivité bronchique ni d'inflammation pulmonaire. De la même façon, le transfert de LTh1 à des souris SCID naïves n'induit pas d'hyperréactivité bronchique et s'accompagne d'une faible production de mucus et de la présence d'infiltrats

périvasculaires riches en LT et neutrophiles. En conclusion, le transfert de LTh1 à des animaux receveurs ne permet pas d'induire un asthme allergique.

Les LTh1 exercent différents effets inhibiteurs sur les LTh2. Ils inhibent via la production d'INF γ la sécrétion des cytokines par les LTh2 et leur prolifération in vitro (201, 202). Chez la souris, l'INF γ a des effets inhibiteurs sur l'hyperréactivité bronchique et l'éosinophilie pulmonaire induites par les LTh2. Quand elle est administrée avant le challenge antigénique, l'INF γ réduit in vivo le nombre de LT CD4 dans le tractus respiratoire (203-205) et la sécrétion des cytokines Th2 (204, 206).

Dans une autre étude, le transfert adoptif de LTh1 polarisés in vitro et issus de souris transgéniques avec un TCR spécifique de l'OVA au moment de la première provocation à l'OVA diminue le nombre d'éosinophiles présents dans le lavage broncho-alvéolaire, mais ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique.

Le facteur de transcription T-bet est responsable de la différenciation des LT CD4 vers un profil Th1. Chez des souris sensibilisées à l'OVA, l'administration par voie intra-nasale de T-bet avant les provocations à l'OVA diminue le nombre d'éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire, l'infiltration péribronchique, les taux sériques d'IgE totaux et les taux d'IgE spécifiques de l'OVA (207). Ces données confirment l'implication des LTh1 dans le contrôle de la réaction pulmonaire allergique.

Toutefois, le transfert de LTh1 avec un TCR spécifique de l'OVA à des souris soumises à un modèle d'asthme allergique a donné des résultats controversés. Dans une première étude, ce transfert réalisé au moment de la première provocation allergique diminue le nombre d'éosinophiles présents dans le lavage broncho-alvéolaire, mais ne modifie pas l'hyperréactivité bronchique.

Dans une autre étude, ce transfert induit une augmentation du nombre de lymphocytes et de monocytes/macrophages dans le lavage broncho-alvéolaire et tend à augmenter le nombre d'éosinophiles. Le transfert de LTh1 chez des souris avec un asthme déjà établi (suivi de provocations à l'OVA) augmente aussi le nombre de lymphocytes, de macrophages et d'éosinophiles dans le lavage broncho-alvéolaire (208). Ces derniers résultats suggèrent que les LTh1 ne sont pas protecteurs dans ce modèle d'asthme expérimental, mais potentialiseraient plutôt la réponse inflammatoire. Contrairement aux LTh2, le transfert de LTh1 provenant de souris immunisées n'induit pas d'hyperréactivité bronchique ni d'inflammation pulmonaire allergique (190, 209, 210). Toutefois, une équipe a également démontré que les LTh2 seuls ne suffisaient pas au développement d'une réponse allergénique

pulmonaire. Un co-transfert de LTh1 et de LTh2 à des souris naïves suivi de provocations à l'OVA semble indispensable au recrutement des LTh2 et des éosinophiles dans les voies respiratoires et dans les poumons et ce via l'induction de l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales dans les poumons (211).

Les études utilisant des modèles murins ont ainsi donné des résultats contradictoires quant au rôle potentiel des LTh1 et de l'FN- γ dans l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique. Dans certaines études, il a été démontré que les LTh1 et l'FN- γ atténuent la réaction allergique tandis qu'ils l'amplifient dans d'autres études.

3.2. Les lymphocytes Th17

Les LTh17 sont une sous-population de LT CD4⁺ effecteurs qui exprime l'IL-17 et les facteurs de transcription clés tels que ROR- γ t et ROR α (212, 213). Le TGF- β et les cytokines telles que l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-23 sont des facteurs cruciaux pour le développement des LTh17 chez la souris. Le rôle de ces cytokines dans le développement des LTh17 chez l'homme n'est pas clairement établi (214, 215) (*figure 18*). IL-17A est induite dans les poumons des patients asthmatiques et les taux d'IL-17 corrént avec la sévérité de la maladie chez les patients asthmatiques résistants aux stéroïdes et les patients avec un infiltrat inflammatoire riche en neutrophiles (216, 217). Des études plus approfondies ont révélé un rôle important des LTh17 dans la réaction allergique. La sensibilisation des voies respiratoires à un allergène induit des réponses Th2 modestes et une forte réponse Th17 responsable d'une neutrophilie et d'une hyperréactivité bronchique (218, 219). Les LTh17 exacerbent l'hyper-éosinophilie pulmonaire (220). Le transfert de LTh17 spécifiques de l'allergène provoque une hyperréactivité bronchique et une inflammation pulmonaire résistante aux stéroïdes chez la souris (221) renforçant davantage l'association entre les LTh17 et l'asthme sévère (*figure 19*). Cependant, certaines études réalisées in vivo ont révélé un rôle plus complexe de l'IL-17 au cours des réactions allergiques. Bien que l'abrogation de la fonction de l'IL-17 durant la sensibilisation allergique soit protectrice dans les modèles murins d'asthme allergique, l'administration de l'IL-17A au moment des provocations réduit également l'inflammation pulmonaire suggérant un rôle régulateur de l'IL-17 dans l'asthme allergique (222, 223).

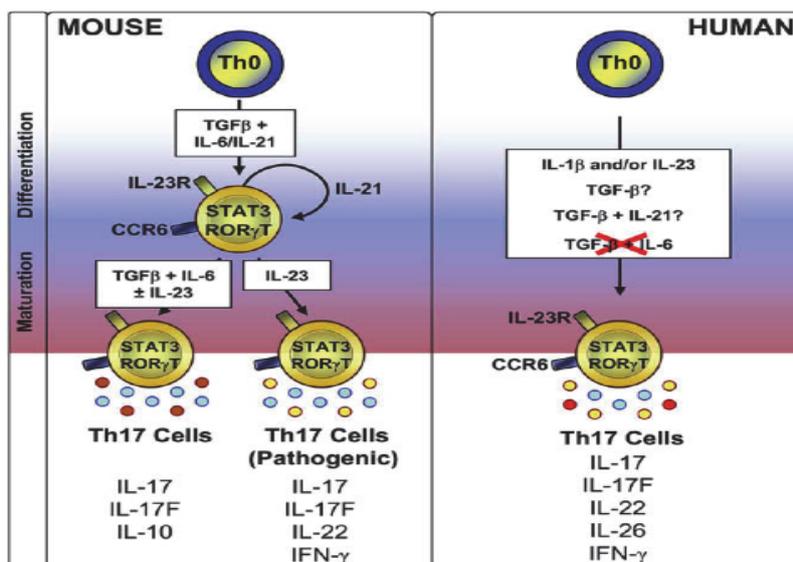


Figure 18. Différentiation et maturation des LTh17 chez l'homme et chez la souris.

Chez la souris, le TGF- β agit de concert avec l'IL-6 ou l'IL-21 pour induire l'activation de STAT3. Cette dernière induit l'expression de ROR γ T et de l'IL-23R et aboutit ainsi à la différenciation des LT CD4⁺ naïfs en LTh17. Chez l'homme, la combinaison de TGF- β et d'IL-6 est incapable d'induire la différenciation de LTh17 à partir de LT CD4⁺ naïfs du sang de cordon ou de la circulation périphérique. IL-1 β et IL-23 sont des facteurs critiques dans le développement des LTh17 humains.

Adapté de Louten J., Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009.

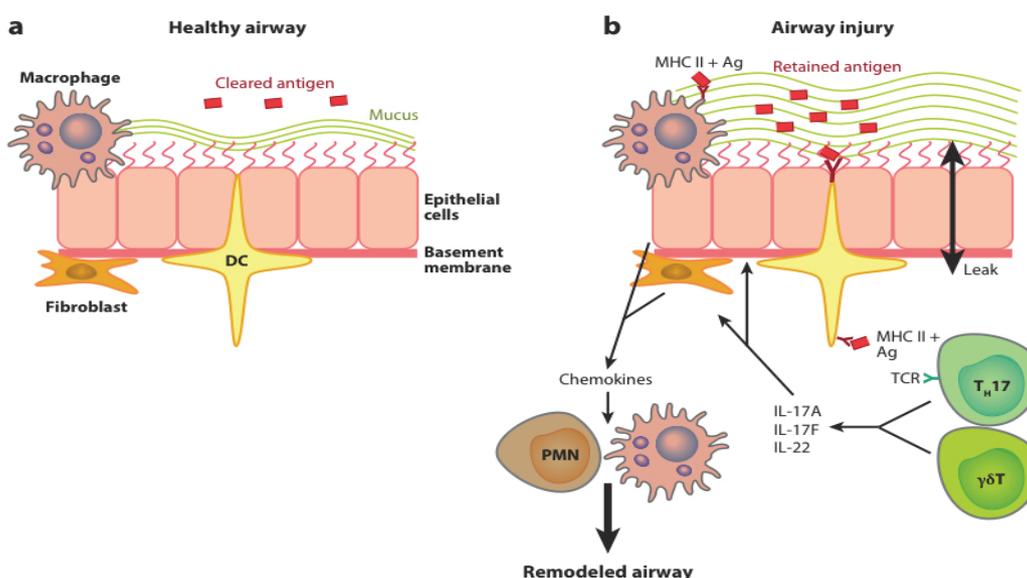


Figure 19. Modèle de remodelage pulmonaire via l'IL-17.

IL-17 produite par les LTh17 et les LT $\gamma\delta$ promeut le remodelage pulmonaire via le recrutement des macrophages et des neutrophiles dans les voies respiratoires. Ag, antigène; DC, dendritic cell; PMN, polymorphonuclear cell.

Adapté à partir de Alcorn J.F., Annual Reviews Physiology 2010.

3.3. Les lymphocytes Th9

Les données concernant les sous-populations de LT CD4⁺ ont atteint un nouveau degré de complexité avec la description récente d'une population discrète de LT CD4⁺ sécrétrices d'IL-9 dont le développement dépend du TGF- β et de l'IL-4 (224). La génération de LTh9 exige l'expression du facteur de transcription PU.1. La sécrétion d'IL-9 par les LTh9 est up-régulée par l'IL-25 (64). Plusieurs preuves suggèrent que les LTh9 sont impliqués dans le développement de la réaction allergique pulmonaire (*figure 20*). L'IL-9 est détectée dans les biopsies bronchiques des patients asthmatiques et elle est co-localisée avec des marqueurs de LT CD4⁺ même si d'autres sources cellulaires ont été identifiées comme les mastocytes et les éosinophiles (225, 226). Les souris transgéniques pour l'IL-9 présentent une éosinophilie pulmonaire basale et une hyperréactivité bronchique en absence d'exposition à un allergène. Les souris déficientes en IL-9 ont donné des résultats contradictoires (227, 228). En comparaison avec les souris sauvages, les souris avec des LT déficients en PU.1 développent des réponses Th2 normales après une exposition à un allergène avec toutefois une réduction de l'inflammation pulmonaire associée avec une diminution de l'expression d'IL-9 (64). Une étude plus approfondie de la fonction des LTh9 est exigée pour clairement préciser s'ils jouent un rôle anti- ou pro-inflammatoire dans la réaction allergique.

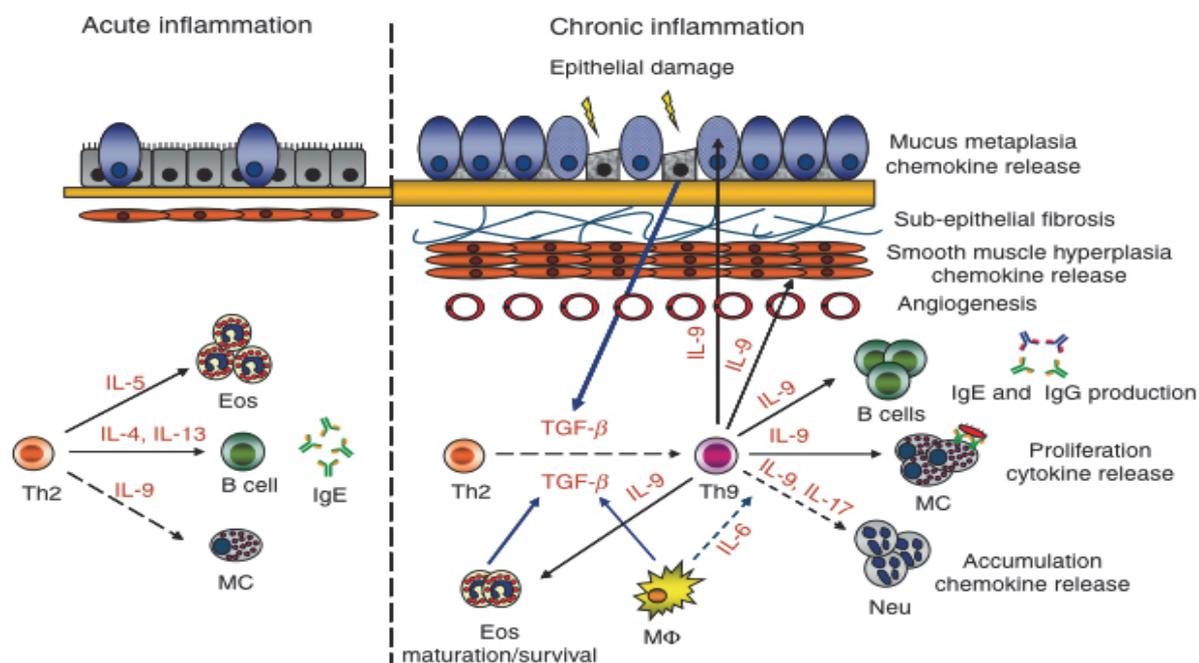


Figure 20. Les réponses Th2 et Th9 pendant une inflammation pulmonaire aiguë et chronique.

Durant la phase aiguë de l'inflammation pulmonaire, l'inhalation de l'allergène chez les individus prédisposés induit l'activation des LTh2 qui sécrètent plusieurs cytokines. Ces dernières sont responsables de la synthèse des IgE par les LB, l'activation et le recrutement des mastocytes et des basophiles. Au cours d'une inflammation chronique, les éosinophiles, les macrophages et les mastocytes produisent du TGF- β . En présence d'IL-4 et de TGF- β , quelques LTh2 peuvent se différencier en LTh9. L'IL-9 augmente la production des IgE et des IgG par les LB, promeut la prolifération/la survie et la libération des cytokines pro-inflammatoires par les mastocytes et potentialise la survie et la maturation des éosinophiles. L'IL-9 peut augmenter la libération de l'IL-8 par les neutrophiles et en combinaison avec l'IL-17 augmente l'accumulation des neutrophiles dans les voies respiratoires. Sur les cellules épithéliales, l'IL-9 induit la sécrétion des chimiokines et la production de mucus. L'IL-9 peut également induire l'expression des chimiokines spécifiques des LTh2 par le muscle lisse pulmonaire et l'hyperplasie des cellules musculaires. Les changements structuraux et cellulaires induits par l'IL-9 influencent le remodelage pulmonaire et perpétuent l'inflammation.

Adapté à partir de Sorrosh P. and Doherty T.A., Immunology 2009.

3.4. Les Lymphocytes T CD8⁺

La présence des LT CD8⁺ dans les voies respiratoires des patients asthmatiques est bien documentée. La production de l'IL-4 et l'IL-5 par les LT CD8⁺ est plus élevée dans les biopsies bronchiques des patients atteints d'asthme atopique ou non atopique que chez les sujets sains (184). De plus chez ces patients, la production de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IFN- γ par les LT CD8⁺ est augmentée dans les expectorations induites par rapport aux sujets sains (229). Il est clairement établi que les LT CD8⁺ issus du sang périphérique diffèrent des LT CD8⁺ des voies respiratoires surtout chez les patients asthmatiques (229). Ceci peut s'expliquer par un homing préférentiel ou un état d'activation altéré ou augmenté induit par

l'environnement local des voies respiratoires (229). Les LT CD8⁺αβ sont bien représentés parmi les LT intra-épithéliaux et sont présents en proportions élevées chez les patients asthmatiques (230). La baisse annuelle de FEV1 (*Forced Expiratory Volume in One Second*) chez les patients asthmatiques peut être anticipée en fonction du nombre de LT CD8⁺ présent dans les infiltrats bronchiques (231). La production des cytokines par les LT CD8⁺ dans les expectorations induites est corrélée avec la sévérité de l'asthme (229). De plus, les patients qui meurent de crises d'asthme ont une large proportion de LT CD8⁺ bronchiques activés par rapport aux patients asthmatiques qui décèdent d'autres causes (232) ce qui suggère un rôle néfaste pour les LT CD8⁺ dans la pathogenèse de la maladie asthmatique humaine.

Durant la dernière décennie, plusieurs modèles animaux ont démontré que les LT CD8⁺ peuvent avoir des effets bénéfiques ou délétères dans les voies respiratoires des sujets asthmatiques (233). Bien que l'ensemble de ces données contribue à mieux appréhender le rôle potentiel des LT CD8⁺ dans l'asthme chez la souris et chez l'homme, leur rôle n'est pas totalement élucidé. La déplétion des LT CD8α⁺ (en utilisant l'anticorps OX-8) chez des rats déjà sensibilisés à l'allergène entraîne une augmentation de l'inflammation pulmonaire, du remodelage pulmonaire (hyperplasie musculaire, prolifération des cellules épithéliales et augmentation de la production de mucus) (234) ce qui suggère un rôle protecteur des LT CD8. Le fait que le marqueur CD8α soit exprimé par d'autres cellules comme les macrophages, des sous-populations de CD8, les cellules NK et les cellules iNKT compliquent l'interprétation de ces résultats. A l'inverse, des expériences de transfert in vivo de LT CD8αβ⁺ révèlent que ces cellules aggravent les symptômes de la maladie asthmatique soit directement soit de concert avec les LT CD4⁺ (235-237). Les souris déficientes en LT CD8⁺ développent moins d'inflammation pulmonaire tandis que le transfert de LT CD8⁺ effecteurs mémoires (générés in vitro et activés par l'allergène) à des souris déficientes en LT CD8⁺ sensibilisées au même allergène s'accompagne d'une augmentation de l'hyperréactivité bronchique, de l'éosinophilie et des taux d'IL-13 dans le lavage broncho-alvéolaire. Il est intéressant de noter que les effets délétères des LT CD8 transférés ne sont pas observés si les LT CD8⁺ transférées proviennent de souris déficientes en IL-13 ou de souris n'ayant pas reçu de challenge intra-nasale (237) ce qui indique que les LT CD8αβ⁺ délétères sont activées dans les voies respiratoires et produisent de l'IL-13 localement.

En présence des LTh2, les LT CD8⁺ spécifiques du virus de la chorioméningite lymphocytaire produisent beaucoup d'IL-5 et à l'inverse ne sécrètent plus d'IFN-γ. Ils contribuent ainsi à une augmentation de l'éosinophilie chez la souris (238). Cette observation explique partiellement

la contribution des infections virales dans l'exacerbation de l'asthme. A l'inverse, la maladie asthmatique altère les réponses T CD8⁺ anti-virales. Les patients asthmatiques infectés par un rhinovirus présentent une sécrétion altérée d'IFN- γ , un phénotype non cytolytique de LT CD8⁺ et une perturbation de la résolution de l'infection virale. En comparaison avec les sujets sains, les patients asthmatiques ont une augmentation de la fréquence, de la sévérité et de la durée de leurs infections rhinovirales (239). En dépit de toutes ces corrélations et de l'ensemble de ces données, la question reste posée quant aux rôles des LT CD8⁺ dans la chronicité et la sévérité de la maladie: spectateurs ou acteurs? (Figure 21).

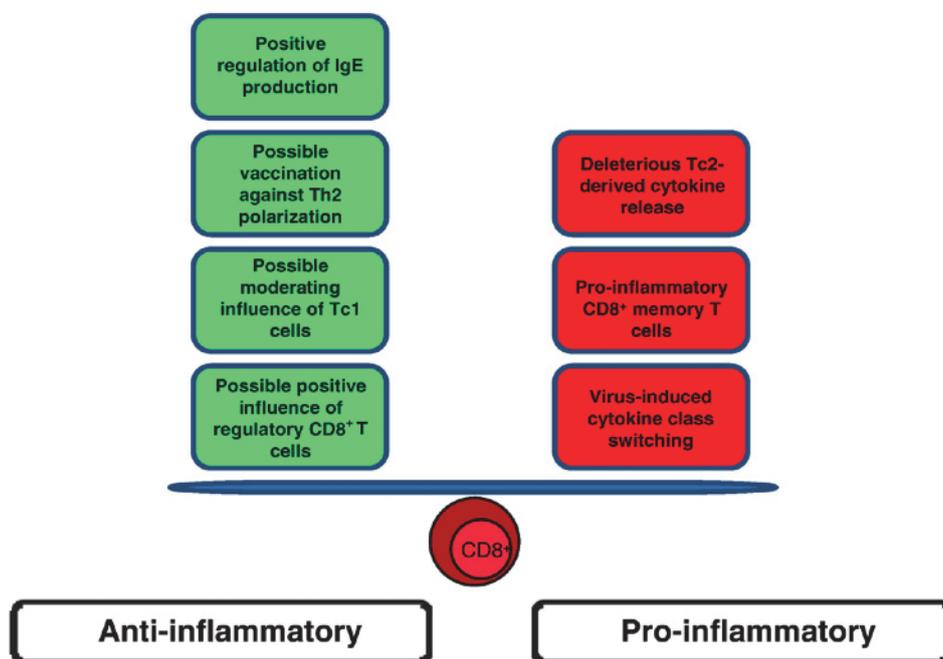


Figure 21. Les effets positifs et néfastes des LT CD8⁺ dans l'asthme.

Les LT CD8⁺ régulent la production d'IgE et peuvent représenter une cible précieuse pour modérer la polarisation Th2 des réponses allergiques. Les LTc1 peuvent modérer l'inflammation pulmonaire à l'inverse des LTc2. Le rôle régulateur des LT CD8⁺ dans l'asthme reste à définir. Les LT CD8⁺ activés par les virus respiratoires sont capables de switcher la production d'IFN- γ en une production de cytokines de type 2 et contribuer ainsi aux exacerbations d'asthme induite. Les cellules mémoires CD8⁺ sont impliquées dans la pathogenèse de l'asthme via une production de cytokines de type 2.

Adapté à partir de Bettes R.J., Kemeny D.M., Pharmacology & Therapeutics 2009.

3.5. Les Lymphocytes NKT invariants (LiNKT)

Les LiNKT expriment le récepteur invariant des LT (TCR):V α 14 chez la souris et V α 24 chez l'homme. Ce TCR reconnaît les glycolipides à la place des antigènes peptidiques

conventionnels dans le contexte des molécules de CMH de classe 1 CD1d. Ce récepteur est hautement conservé entre les espèces suggérant qu'il agit comme un PRR et que les LiNKT contribuent aux réponses immunes innées. L'activation du TCR invariant des LiNKT conduit à une production rapide d'une gamme de cytokines comme l'IL-4 et l'INF- γ assurant un soutien précoce pour l'induction des réponses immunes adaptatives. Une autre population de LiNKT dénommée les LiNKT non classiques ou les LiNKT de type II reconnaît également les antigènes associés au CD1d mais n'exprime pas le TCR invariant.

L'implication des LiNKT dans le développement des maladies allergiques des voies respiratoires a été mise en évidence dans les modèles animaux. Les souris déficientes en LiNKT (souris CD1d^{-/-} ou les souris $\text{j}\alpha 18^{-/-}$) maintiennent un certain degré d'éosinophilie mais ne parviennent pas à développer une hyperréactivité bronchique (240). L'instillation intranasale de glycolipide α -galcer (*α -galactosylcéramide*), ligand du TCR des LiNKT induit la production de l'IL-13 et de la TSLP par les LiNKT et favorise l'hyperréactivité bronchique (241). L'exposition des souris à l' α -galcer en présence d'un antigène induit bien une sensibilisation des animaux vis-à-vis de l'allergène dépendante des LiNKT. Des résultats similaires ont été obtenus chez des primates non humains (242). Cependant le rôle des LiNKT dans le développement de l'asthme humain reste controversé. La proportion de LiNKT dans le lavage broncho-alvéolaire des patients asthmatiques varie de 2% à 60% (243, 244). Ces différences reflètent la variabilité des techniques expérimentales et de l'échantillonnage des patients. Le nombre de LiNKT est augmenté chez les patients asthmatiques après provocations allergéniques (245, 246) (*tableau 4*). Les LiNKT sont susceptibles d'amplifier les réponses allergiques en présence des LTh2. Ils peuvent également induire une hyperréactivité bronchique sans l'aide activatrice des LTh2 par le biais d'une activation directe par des virus ou la pollution (247) (*figure 22*).

iNKT cells in patients with asthma				
Year	iNKT cells are			
	pathogenic		not pathogenic	
2006	Akbari	About 60% of CD4 ⁺ CD3 ⁺ cells in BALF from patients with severe asthma were CD1d-restricted NKT cells [21]	Thomas	Only 0.4–2.1% of lymphocytes in BALF of asthmatic patients were 6B11+ NKT cells [25]
	Pham-ti	The frequency of CD1d-restricted NKT cells in BALF from severe asthmatic children was higher than in BALF from controls [22,23]		
	Hamzaoui	The number of CD3 ⁺ CD56 ⁺ NKT cells in the sputum of severe asthmatic patients is increased as compared to that of controls [24]		
2007			Vijayanand	Fewer than 2% of CD4T cells were CD1d-restricted, 6B11 ⁺ or V α 24 ⁺ NKT cells in airway biopsy, BALF, and sputum of mild or moderately severe asthmatic patients and controls [26]
			Mutalithas	The presence of 6B11 ⁺ NKT cells in BALF of mild asthmatic patients was not significantly higher than that of controls [27]
			Thomas	Approximately 1% of lymphocytes were 6B11 ⁺ V α 24 ⁺ NKT cells in BALF and this did not increase with an antigen challenge [28]
			Bratke	Less than 1% of T cells were 6B11 ⁺ NKT cells in BALF of mild asthma patients [29]
2009	Matangkas ombut	CD1d-restricted NKT cells in BALF of severe or mild asthmatic patients increased (readdressed) [30**]		
	Reynold	CD1d-restricted NKT cells increased in lung specimens from mild asthmatic patients as compared to those from controls [31]		
2010	Koh	V α 24 ⁺ or 6B11 ⁺ NKT cells were significantly increased in sputum from patients with asthma as compared to those from controls [32]		

BALF, bronchoalveolar lavage fluid.

Tableau 4. Les lymphocytes iNKT chez les patients asthmatiques.

Adapté à partir de Iwamura C. & Nakayama T., Current Opinion in Immunology 2009.

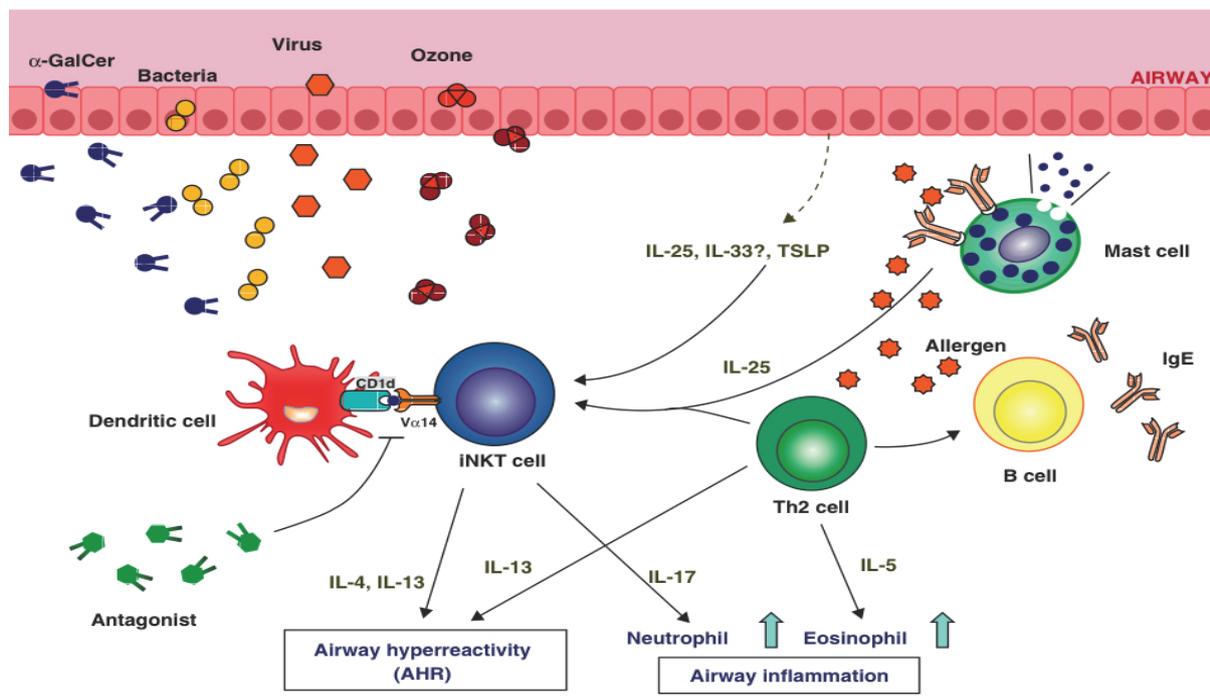


Figure 22. Les LTh2 et les LiNKT dans le développement de l'hyperréactivité bronchique et de l'inflammation pulmonaire.

Les LiNKT sont activés par des substances environnementales ou des cytokines pro-Th2. Les iNKT activés peuvent induire une hyperréactivité bronchique et une hyper-neutrophilie dans les voies respiratoires en produisant respectivement l'IL-13 et l'IL-17.

Adapté à partir de Iwamura C. & Nakayama T., Current Opinion in Immunology 2009.

3.6. Les Lymphocytes $T\gamma\delta$

Une population locale de $LT\gamma\delta$ est en association étroite avec l'épithélium pulmonaire. Elle exerce une fonction d'immunosurveillance en répondant aux signaux de stress endogène (248, 249). Le taux de $LT\gamma\delta$ est plus élevé dans le lavage broncho-alvéolaire des patients asthmatiques en comparaison avec les sujets sains. En outre, les $LT\gamma\delta$ des patients asthmatiques sécrètent de l'IL-4 et prolifèrent aux allergènes spécifiques contrairement aux $LT\gamma\delta$ des sujets contrôles (250). Par ailleurs, une grande proportion de $LT\gamma\delta$ dans la muqueuse nasale des patients atteints de rhinite allergique exprime de l'IL-4 et peu d'IFN- γ (251). Cette observation n'a pas été confirmée avec les cellules du sang périphérique soulignant la nécessité d'évaluer les cellules tissulaires résidentes. La fonction des $LT\gamma\delta$ n'a pas été étudiée dans les poumons des patients asthmatiques. L'étude des modèles murins a suggéré que les $LT\gamma\delta$ exercent des rôles contradictoires dans le développement de la réaction allergique. Deux sous-populations de $LT\gamma\delta$ pulmonaires ont été identifiées. Une sous-

population de $LT\gamma\delta$ pro-inflammatoire qui exprime le $TCRV\gamma1^+$ et une sous-population suppressive qui exprime le $TCRV\gamma4^+$ (252, 253). Comme les $LTh2$, les $LT\gamma\delta V\gamma1^+$ produisent de l'IL-4 et de l'IL-13 dans les voies respiratoires et agissent en synergie avec les $LiNKT$ pour induire une hyperréactivité bronchique. La capacité des $LT\gamma\delta V\gamma4^+$ a supprimé l'hyperréactivité bronchique et l'inflammation pulmonaire déjà établies dépend de leur capacité à sécréter de l'IL-17A (222). Une hyperréactivité bronchique est observée chez des souris non sensibilisées déficientes en $LT\gamma\delta$ suggérant un rôle de ces cellules dans l'homéostasie des voies respiratoires (254).

Collectivement, ces expériences suggèrent une implication des $LT\gamma\delta$ dans les réponses immunitaires pulmonaires. Leur rôle précis dans l'asthme allergique chez l'homme reste à étudier.

3.7. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (LTregs) sont un groupe de cellules qui jouent un rôle central dans le maintien de l'intégrité de l'individu en évitant les réponses immunes excessives ou inappropriées qui peuvent conduire à des pathologies immunes. Cette population de LTregs contribue à établir un état de tolérance immune vis-à-vis des antigènes inoffensifs.

3.7.1. Les caractéristiques générales des LTregs

Il existe des arguments attestant l'existence d'une population de $LT CD4^+$ régulatrices qui se développe durant la maturation thymique des $LT CD4^+$ (appelée *LTreg naturel*) ou en réponse à une stimulation antigénique en périphérie (*LTreg induit*) (*figure 23*) (255, 256).

3.7.1.1 Les *LTregs naturels*

Ces cellules expriment constitutivement et fortement le CD25 à leur surface. Les $LTregs CD4^+CD25^+$ représentent approximativement 10% des cellules T $CD4^+$ circulantes chez la souris (257) et 6 à 10% chez l'homme (258). Outre la forte expression du CD25 à leur surface membranaire, les $LTregs$ murins quiescents expriment d'autres molécules de surface tels que le CTLA-4 (259), la neuropiline-1 (260), trois membres de la famille de récepteurs au $TNF-\alpha$ (GITR, OX40, et 4-1BB) (261), le CD103 (262) et le $CD45RB^{low}$ (263). Après activation, l'expression membranaire du CTLA-4, de OX40 et de 4-1BB est fortement augmentée, celle de GITR est légèrement augmentée tandis que l'expression de CD103 n'est pas modifiée (261). Les $LTregs$ naturels humains expriment également le CTLA-4 mais son expression est intra-cellulaire et les récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR8 (264).

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les LTregs naturels expriment fortement le facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead-box protein 3*) molécule contribuant en grande partie à leur développement et à leur fonction suppressive. Ainsi, la réduction de l'expression de Foxp3 abroge leur fonction suppressive. A l'inverse, une surexpression de Foxp3 dans LT effecteurs CD25⁻ leur confère un phénotype supprimeur (265). Chez l'homme, des mutations du gène Foxp3 induisent le syndrome IPEX (*Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked*) caractérisé par le développement de maladies auto-immunes et allergiques.

Des mutations du gène codant Foxp3 chez la souris (souris scurfy) conduisent à un syndrome équivalent au syndrome IPEX humain (266). L'expression de Foxp3 peut également être induite dans les LT naïfs CD4⁺CD25⁻ par le TGF-β, convertissant ainsi ces lymphocytes en LTregs (CD25⁺CD45RB^{-/low}CTLA-4⁺) (267).

3.7.1.2 Les LTregs CD4⁺ induits

Contrairement aux LTregs naturels, les LTregs induits sont générés en périphérie. Ils sont divisés en deux sous-populations: les Tr1 et les Th3.

Les Tr1 ont été décrits par Groux et al. Cette équipe a démontré que l'activation chronique des LT CD4⁺ humains et murins en présence d'IL-10 génère des LT CD4⁺ ayant une faible capacité proliférative et produisant des quantités élevées d'IL10, peu d'IL-2 et pas d'IL-4 (268). Il apparaît que la fonction régulatrice de ces cellules ne se limite pas aux réponses de type Th1, et qu'elle inclut les réponses de type Th2 et CD8⁺ cytotoxique (256).

Les LTh3 ont été décrits par Chen et al. Ils produisent des quantités élevées de TGF-β, peu d'IL-4 et des quantités variables d'IL-10. Ils interviennent dans la protection contre les maladies auto-immunes de type Th1 (269).

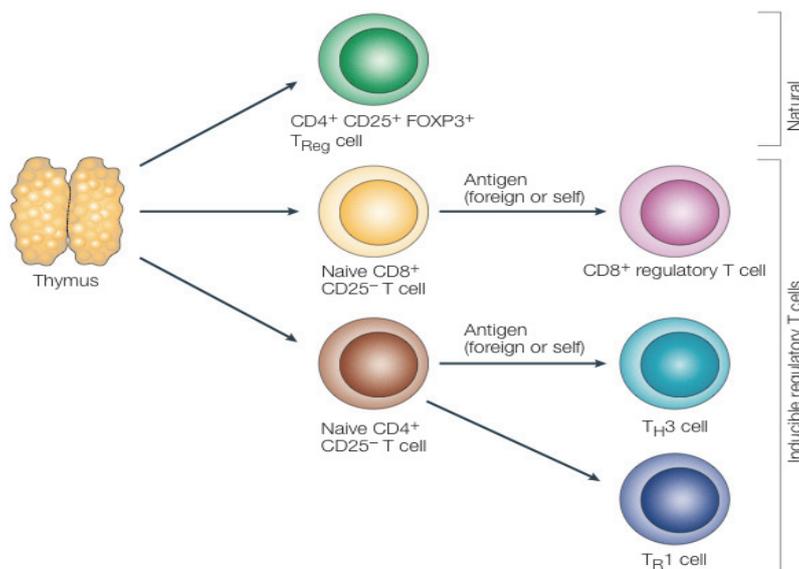


Figure 23. Les LTregs naturels et induits.

Les LTreg naturels $CD4^+CD25^+$ se développent et se différencient dans le thymus, puis circulent dans les tissus périphériques où ils suppriment les LT activés dirigés contre les antigènes du soi. D'autres populations de LTreg dits inductibles spécifiques d'antigène peuvent être induits à partir de $CD4^+CD25^-$ ou des $CD8^+CD25^-$ naïfs par des CDs semi-matures, de l'IL-10, du TGF- β et probablement de l'INF- α .

A partir de Mills K.H., Nature Reviews Immunology 2004.

3.7.2. Détection de LTregs spécifiques de l'allergène chez les individus non atopiques

Plusieurs études chez l'homme ont démontré que chez un individu non atopique, une réponse immune aux allergènes environnementaux communs est détectable avec une prédominance des LTr1 spécifiques d'allergènes (270-272).

Des LTh1, des LTh2, et des LTr1 spécifiques de l'allergène sont mis en évidence chez les individus sains comme les patients allergiques mais dans des proportions différentes. Chez les individus sains avec des IgG anti-allergènes détectables, les LTr1 sont la sous-population dominante de LT en réponse aux allergènes environnementaux communs alors qu'une fréquence élevée de LT producteurs d'IL-4 a été observée chez les individus allergiques. Par conséquent, la fréquence des LTh2 effecteurs ou des LTr1 détermine si les individus développeront de l'allergie (prédominance des LTh2) ou non (prédominance des Tr1). Deux situations chez l'homme ont permis de démontrer que l'exposition à des taux élevés d'allergènes induit une tolérance immune et l'activation de LTregs (273, 274). Les apiculteurs sont naturellement exposés à des taux élevés d'allergènes du venin d'abeilles durant la saison apicole. Chez ces individus, une réduction des réactions cutanées et une capacité altérée des LT spécifiques de l'allergène à proliférer et à produire des cytokines Th1 et Th2 sont

observées tout au long de la saison apicole. Cette régulation est en corrélation avec une conversion des LTh1 et des LTh2 spécifiques de l'allergène vers un phénotype LTr1. Il a également été démontré que l'histamine et son récepteur H2R jouent un rôle majeur dans cette conversion. Dans cette situation, le récepteur d'histamine H2R est sur-exprimé sur les LTh2 spécifiques. L'histamine induit via H2R la production d'IL-10 par les LTh2 (273, 275). L'activation de H2R exprimé par les LTh2 inhibe également la production de l'IL-4 et l'IL-13 et la prolifération des LT (273, 276). Ces données suggèrent que le récepteur H2R participe dans certaines conditions à l'induction de la tolérance périphérique aux allergènes. Dans un autre modèle d'exposition à des taux élevés aux allergènes de chat, des réponses IgG4 et des LTr1 sont également induits et s'accompagnent d'une absence d'asthme (274). Il a été également démontré que les enfants qui ne sont pas allergiques au lait de vache présentent une fréquence élevée de LTregs et une diminution des réponses prolifératives aux allergènes spécifiques par rapport aux enfants qui ne tolèrent pas le lait et présentent des symptômes cliniques allergiques après sa consommation (277). L'immunothérapie spécifique qui consiste à injecter par voie sous-cutanée des doses croissantes d'un allergène aux patients induit de la tolérance périphérique vis-à-vis de cet allergène en activant des LT régulateurs spécifiques de l'allergène (des LTreg producteurs d'IL-10 et des LT CD4⁺CD25⁺) (270, 272, 278-280). Ainsi, l'immunothérapie spécifique pratiquée chez des patients atteints de rhinite allergique (en réaction aux pollens de graminées) augmente le nombre de LT CD25⁺Foxp3⁺ dans la muqueuse nasale. Cette induction de LTregs s'accompagne bien d'une inhibition de l'inflammation allergique saisonnière (281). Ces données suggèrent un rôle crucial des LTregs dans l'induction de la tolérance immune spécifique de l'allergène chez l'homme.

3.7.3. Les LTregs et l'hypothèse hygiéniste

La découverte du rôle des LTregs dans la protection contre les maladies allergiques et les différentes études épidémiologiques ont conduit à de nouvelles interprétations de l'hypothèse hygiéniste. Il a été proposé qu'une hygiène excessive et une faible exposition microbienne altèrent l'induction des LTregs d'où une augmentation des réponses Th1 et Th2. Cette interprétation permettrait d'expliquer l'augmentation conjointe de la prévalence des maladies allergiques et des maladies auto-immunes (*figure 24*).

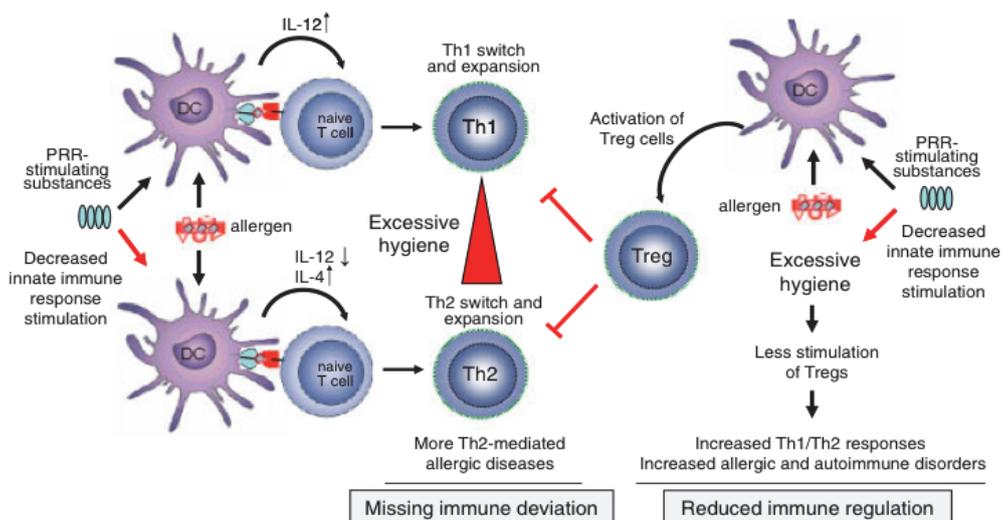


Figure 24. Réduction de la régulation immunitaire et défaut de la déviation immunitaire dans les maladies allergiques.

Une diminution de l'activation des DCs par les PRRs du fait d'une hygiène excessive s'accompagnerait également d'une diminution de la stimulation de LTregs ce qui explique l'augmentation de la prévalence des maladies allergiques et auto-immunes.

Adapté à partir de Palomares O., European journal of immunology 2010.

3.7.4. Défaut de LTregs dans l'allergie et dans l'asthme allergique

3.7.4.1 Les LTregs et les réponses allergiques humaines

Plusieurs études ont évalué l'effet des LTregs sur les LTh2 in vitro. Les T CD4⁺CD25⁺ isolés du sang périphérique humain suppriment la prolifération des LT CD4⁺CD25⁻ et leur production de cytokines de type Th2 suite à une stimulation allergénique in vitro (282, 283). Donc les LTregs sont capables d'inhiber les réponses Th2 inappropriées vis-à-vis des allergènes environnementaux. La sensibilisation des patients atopiques pourrait s'expliquer par un déficit ou par une défaillance de LTregs. Les premières études n'ont pas mis en évidence de différence significative dans la capacité suppressive des LT CD4⁺CD25⁺ entre les sujets allergiques atopiques et les sujets contrôles non atopiques (282, 283). Depuis, il a été confirmé que les LT CD4⁺CD25⁺ isolés de sujets atopiques sensibilisés aux pollens de graminées et co-cultivés avec des LT CD4⁺CD25⁻ stimulés par le même allergène présentent une fonction suppressive réduite en comparaison avec les LT CD4⁺CD25⁺ isolés de sujets non atopiques (284). Chez des enfants asthmatiques allergiques vis-à-vis des acariens, une réduction similaire des fonctions suppressives des LT CD4⁺CD25⁺ du sang périphérique a été observée comparativement à des sujets non allergiques. Ce défaut de fonction de LTregs pourrait être en partie lié à une production amplifiée de TNF-α au cours des réactions allergiques. En effet, en présence d'anti-TNF-α, l'activité fonctionnelle des LTregs et

l'expression de Foxp3 sont restaurées ce qui pourrait expliquer au moins en partie l'efficacité de la thérapie anti-TNF- α observée dans le traitement de l'asthme sévère chronique (285).

Des résultats similaires ont été observés avec les LTreg isolés des lavages broncho-alvéolaires de sujets allergiques. Ainsi, les LT CD4⁺CD25⁺ isolés des lavages broncho-alvéolaires d'enfants asthmatiques inhibent moins la prolifération des LT effecteurs et leur production de cytokines/chimiokines (IL-4, IL-13, CCL17 et CCL22) comparativement à ceux isolés des lavages broncho-alvéolaires de sujets contrôles. De plus, le pourcentage des LT CD4⁺CD25⁺ et les taux d'ARNm de Foxp3 sont plus faibles dans leurs lavages broncho-alvéolaires comparativement aux sujets contrôles (286).

Outre la réduction de leur capacité suppressive, les LTregs naturels CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} isolés du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques sont moins efficaces dans l'induction de CD_s tolérantes comparativement aux LTregs naturels de sujets contrôles. Ce défaut d'induction est lié à une expression réduite d'IL-10 par les LTregs naturels des sujets allergiques asthmatiques et est corrélé à la sévérité de l'asthme (287). Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que les LT CD4⁺CD25⁺ isolées du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques présentent des défauts de migration en réponse à CCL1 (une chimiokine impliquée dans l'infiltration pulmonaire des lymphocytes Th2) (287). Un traitement avec des corticostéroïdes inhalés restaure les fonctions suppressives des LT CD4⁺CD25^{high} (286, 287) et une corticothérapie orale augmente l'expression de l'IL-10 et l'induction de CD_s toléro-géniques chez les patients allergiques (286, 287).

Les LTregs producteurs d'IL-10 ont été impliqués dans la prévention de la sensibilisation atopique. Akdis et al ont démontré une augmentation de la fréquence des LT CD4⁺ producteurs d'IL-10 dans le sang des sujets non atopiques en comparaison avec les sujets atopiques. Ces LT producteurs d'IL-10 peuvent inhiber spécifiquement les LTh2 suite à une activation par un allergène. Cette fonction suppressive a été inhibée par des anticorps bloquants l'IL-10 et le TGF- β (271). Les traitements utilisés dans les maladies allergiques tels que les glucocorticoïdes et les β_2 -agonistes agissent en augmentant le nombre et la fonction des LTr1-like (288, 289). Ainsi, les patients atteints d'un asthme modéré ou sévère voient leur nombre de LT CD4⁺IL-10⁺Foxp3⁺ augmenté dans le sang périphérique suite à un traitement oral par des glucocorticoïdes (288). Une autre étude a démontré une augmentation du nombre de LT CD3⁺CD25⁺FOXP3⁺ dont une partie co-exprime également l'IL-10 dans la muqueuse nasale des patients atteints de rhume des foins après une désensibilisation aux pollens des graminées (281). Il a également été démontré que le traitement avec la DEX (*Dexaméthasone*)

et la vitamine D3 augmente les LTregs producteurs d'IL-10 capables d'inhiber les LTh2 spécifiques de l'allergène (290).

3.7.4.2 Les LTregs dans les modèles murins allergiques

Un certain nombre d'études utilisant les modèles murins a suggéré un rôle des LTregs dans la prévention et le contrôle des maladies induites par les LTh2.

L'étude réalisée par Kearly et al en 2005 a démontré que le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ spécifiques d'OVA (provenant de souris DO11.10) par voie intraveineuse à des souris receveuses immunocompétentes inhibent tous les paramètres de la réaction allergique (inflammation pulmonaire et hyperréactivité bronchique). Cette protection était dépendante de l'IL-10 sécrétés par les LTCD4⁺ pulmonaires des souris receveuses et non pas par les LT CD4⁺CD25⁺ transférées (291). En revanche, il a été démontré que le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ par voie intra-trachéale (et non par voie intra-veineuse) avant les provocations à l'OVA inhibait la réaction pulmonaire allergique par l'intermédiaire de la production de TGF- β et d'IL-10 par les LT CD4⁺CD25⁺ transférés (292).

La déplétion des LTregs CD4⁺CD25⁺ des souris C3H/HeJ avant leur sensibilisation à l'allergène des acariens a augmenté toutes les caractéristiques de l'asthme chez ces souris (hyperréactivité bronchique, hyper-éosinophilie, augmentation des taux sériques élevés d'IgE et des cytokines Th2 dans les poumons) (293).

Outre leur rôle au moment de la sensibilisation des animaux par l'allergène, les LTregs naturels administrés par voie intraveineuse après le développement de l'inflammation pulmonaire mais avant le remodelage bronchique sont capables de supprimer et de prévenir ces deux paramètres. Tandis que le transfert de LT CD4⁺CD25⁺ par voie intraveineuse demeure sans effet sur un remodelage bronchique déjà établi. Ce résultat pourrait s'expliquer par un défaut de recrutement de LT CD4⁺CD25⁺ dans les poumons des souris à ce stade la maladie. En effet, lorsque le transfert est effectué aussi tardivement, les LT CD4⁺ CD25⁺ ne sont pas détectés au niveau pulmonaire (294).

L'utilisation des modèles murins a permis de mettre également en évidence les rôles potentiels des LTregs induits comme les LTh3 et les LTregs producteurs d'IL-10 dans la suppression des maladies allergiques.

Une étude a montré que les LT CD4⁺CD25⁺ induits dérivés en présence de TGF- β (exprimant le facteur de transcription Foxp3) inhibent l'inflammation pulmonaire dans un modèle

d'asthme induit par les acariens. Toutefois, aucune donnée sur l'hyperréactivité bronchique n'a été publiée dans cette étude (267).

Les clones Tr1 dérivés d'une stimulation antigénique en présence d'IL-10 inhibent la sensibilisation Th2 et la production des IgE quand ils ont été transférés aux souris avant leur sensibilisation au même antigène (295). Une tolérance aux antigènes inhalés peut également être induite par l'administration intra-nasale de doses élevées d'antigène dans le tractus respiratoire des souris. Cette tolérance est dépendante de l'IL-10 produite par les CD⁺ pulmonaires matures qui induisent des LT CD4⁺ producteurs d'IL-10 (88).

L'ensemble de ces données révèle que les LTregs naturels et induits jouent un rôle important dans la prévention et la résolution des réactions allergiques dans l'asthme.

3.7.5. Les cibles cellulaires de LTregs dans la réaction allergique

Les LTregs ont la capacité de contrôler et de modifier le développement des maladies allergiques en agissant sur la phase de sensibilisation et la phase effectrice (*figure 25*) (296). Les LTregs altèrent les propriétés inflammatoires et la capacité des CD⁺ à activer les LTh1, les LTh2, et les LTh17 en induisant le développement de CD⁺ tolérantes (297). De plus, les LTregs inhibent directement l'activation des LTh2 spécifiques de l'allergène ce qui entraîne une diminution de la production des cytokines indispensables à la phase effectrice de la réaction allergique telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, et l'IL-9 (270, 272, 298). Les LTregs suppriment également la réaction allergique via une action directe sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles. Ils empêchent également le remodelage tissulaire en agissant directement sur les mastocytes et les fibroblastes pulmonaires (299-301). En inhibant les LTh1, responsables de l'apoptose des cellules épithéliales, les LTregs préviennent également les lésions tissulaires (302, 303). Les LTregs exercent un effet direct sur les LB en supprimant la production des IgE spécifiques de l'allergène et en induisant des IgG4 (303, 304). Récemment, il a été également démontré dans un modèle murin que les LTregs naturels spécifiques de l'allergène suppriment l'inflammation pulmonaire induite par les LTh17 et par conséquent le recrutement des neutrophiles et des LB. Ces différentes actions des LTregs mettent en jeu des facteurs membranaires ou solubles tels que l'IL-10, le TGF- β , le CTLA-4 ou PD-1 (*Program Death One*) (271, 273, 305).

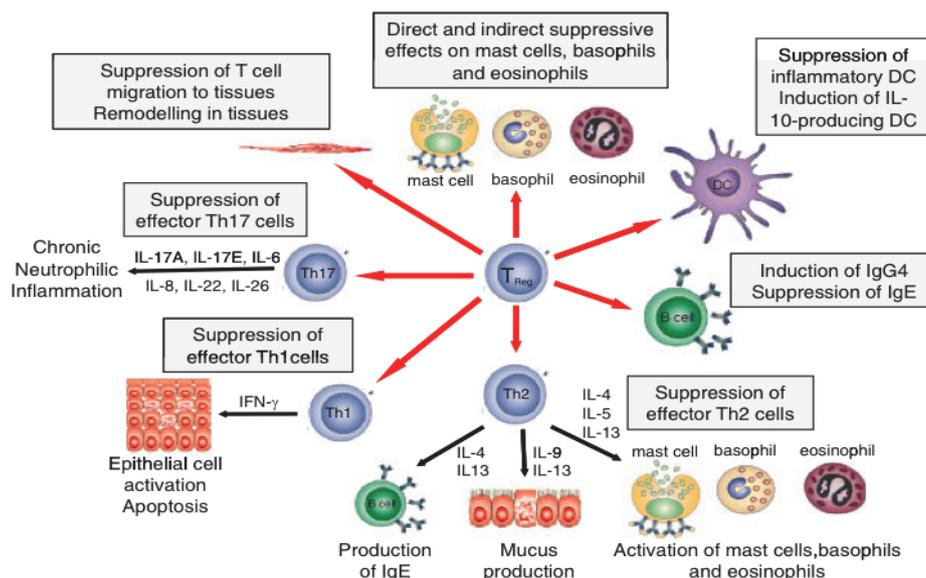


Figure 25. Les cibles cellulaires des LTregs dans les réactions allergiques.

Les LTregs régulent les réponses immunes allergiques en inhibant la réponse des lymphocytes effecteurs d'une part et en agissant sur d'autres cibles cellulaires comme les LB, les CD, les mastocytes, les cellules épithéliales. Les flèches rouges indiquent les effets régulateurs et supprimeurs des LTregs. Les flèches noires montrent la contribution des LT effecteurs Th1, Th2 et Th17 dans les maladies allergiques.

Adapté à partir de Palomares O., European journal of immunology 2010.

3.7.6. Les sous-populations de CD_s inductrices de LTregs

La génération des LTregs est un mécanisme essentiel dans l'établissement et le maintien de la tolérance centrale et périphérique. Les LTregs sont activés par différentes sous-populations de CD_s. Les CD_s semi-matures induisent une tolérance périphérique par délétion clonale des LT (306). A l'inverse, les CD_s dites tolérantes participent à la tolérance immune par un mécanisme actif inducteur de LTregs qui met en jeu des molécules spécifiques de la tolérance comme PDL-1 et PDL-2. L'implication de PDL-1 et PDL-2, membres de la famille B7 a été démontrée dans la régulation des maladies allergiques et de l'asthme (306-310).

Dans une étude récente, Henry et ses collègues ont démontré que les CD_s tolérantes productrices d'IL-10 sont capables de prévenir la sensibilisation à l'OVA après injection à des souris receveuses naïves. Ces CD_s tolérantes ont induits des LTregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL10⁺ dans les ganglions médiastinaux des souris receveuses (311). D'autres études ont détaillé le rôle des CD_s exprimant IDO (*Indolamine 2,3-Dioxygénase*, une enzyme impliquée dans le catabolisme du tryptophane) dans l'induction de la tolérance. Les CD_s qui expriment cette enzyme inhibent la prolifération des LT. L'inhibition d'IDO supprime les effets bénéfiques de l'immunothérapie dans un modèle murin d'asthme (312). Sa neutralisation durant

l'administration intra-nasale d'OVA à des souris abroge la tolérance immune (313). Nous avons déjà mentionné que certaines sous-populations de CD8 comme les CD8 plasmacytoïdes et les CD8 $\alpha\gamma$ ont un rôle crucial dans la protection contre le développement des réponses inflammatoires respiratoires aux antigènes inhalés. Hadeiba et ses collègues ont démontré dans des modèles de rejet de greffe que les CD8 plasmacytoïdes CCR9⁺ sont plus efficaces que les CD8 plasmacytoïdes CCR9⁻ dans l'induction de LTregs (314).

Une autre population de CD8 régulatrice CD103⁺ a été identifiée dans la muqueuse intestinale. Ces CD8 CD103⁺ génèrent des LTregs via l'acide rétinoïque (315-317). Pour le moment, il a été démontré que l'acide rétinoïque polarise les LTCD4⁺ naïfs en LTregs Foxp3⁺ selon un mécanisme dépendant du TGF- β (315-319). L'acide rétinoïque peut aussi affecter indirectement la génération de LTregs induits en altérant la production d'IL-4, d'IL-21 et d'IFN- γ par les LTCD4⁺ mémoires. Ces cytokines sont connues pour bloquer la différenciation des LTregs induits (320). La production d'acide rétinoïque par les CD8 intestinales participe au maintien de l'équilibre entre les LT effecteurs et les LTregs dans le tractus gastrointestinal et à la tolérance orale (321, 322). La production d'acide rétinoïque par les CD8 intestinales est limitée aux CD8 CD103⁺ (315, 316). Des CD8 capables de produire constitutivement de l'acide rétinoïque ont été détectées dans la peau et les poumons. Ces CD8 n'expriment pas le marqueur CD103⁺. Il est important de noter que la production d'acide rétinoïque par certaines sous-populations de CD8 n'est observée dans les tissus qui constituent des interfaces environnementales (323). Le rôle de ces sous-populations de CD8 dans la tolérance aux antigènes inhalés reste à explorer.

Les CD8 tolérantes sont elles mêmes induites par des cytokines tels que l'IL-10. Ainsi, il a été démontré que des CD8 différenciées à partir de cellules de la moelle osseuse in vitro en présence d'IL-10 ont la capacité de supprimer le développement de l'hyperréactivité bronchique, l'hyper-éosinophilie et la production de cytokines Th2 chez la souris (324).

Les LTregs sont également capables d'induire des CD8 tolérantes (325), de même que des molécules issues de pathogènes comme l'hémagglutinine filamenteuse (326) et d'autres signaux comme l'adénosine (327) et les métabolites de la vitamine D3 (328).

L'identification de nouvelles molécules impliquées dans la génération de LTregs ou de CD8 tolérantes et une meilleure compréhension du rôle des différentes sous-populations de CD8 dans les réactions allergiques devrait contribuer à élaborer des immunothérapies plus efficaces dans le traitement des maladies allergiques.

Ainsi, mon équipe a identifié un nouveau mécanisme impliqué dans la génération de CD4⁺ tolérantes. Nous avons démontré que l'expression de la protéine intracellulaire GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) contrôle le phénotype des CD4⁺. Les CD4⁺ qui surexpriment GILZ au moment de la présentation de l'antigène génèrent des LTreg spécifiques de cet antigène. A l'inverse, les CD4⁺ qui expriment des taux faibles de GILZ affichent le programme opposé immunogène et activent des LT effecteurs.

Chapitre 4: Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)

4.1. Organisation génomique et régulation de GILZ

Le gène GILZ a été isolé pour la première fois en 1997 par une analyse soustractive d'ARN messagers de thymocytes murins traités ou non par la DEX (329). La séquence humaine du gène a été publiée en 2001 (330). Le gène qui est organisé en 3 exons a été localisé dans le locus q22.2 du chromosome X par hybridation in situ. Une homologie de 89% avec l'ARNm murin a été identifiée, avec 97% d'homologie dans la partie codante (330).

La caractérisation du promoteur humain de GILZ a permis d'identifier des sites jouant un rôle clé dans la régulation de cette protéine. Une TATA box située à 23 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription (+1) a été identifiée. L'analyse de la séquence de nucléotides de 2,25Kb localisée en 5' de l'exon 1 du gène GILZ montre l'existence de 6 éléments de réponse aux GCs (GRE): 4 GREs (*Glucocorticoid-Responsive Element*) regroupées dans la région distale du promoteur et deux GRE dans la région proximale. Il existe également dans la région promotrice de GILZ des éléments de réponse pour STAT6, NF-AT (*Nuclear factor of activated T cell*), c-Myc, Oct-1/2 et des éléments de réponse FHREs (*ForkHead Responsive Elements*) pour les facteurs Foxo (figure 26) (331, 332).

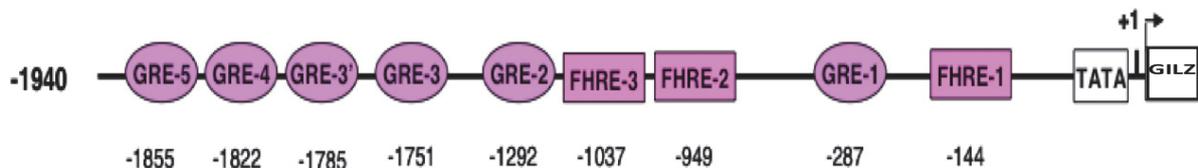


Figure 26. Localisation des séquences GREs et FHREs dans le promoteur du gène codant pour la protéine GILZ humaine.

Le promoteur de GILZ est composé de 6 GREs et 3 FHREs. Ces séquences jouent un rôle dans la régulation de l'expression de GILZ.

Adapté à partir de Asselin Labat et al, Molecular Endocrinology 2005.

GILZ est une petite protéine ubiquitaire de 135 acides aminés chez l'homme et de 137 acides aminés chez la souris. La protéine GILZ (TSC22D3-2) fait partie des membres de la famille de protéines leucine zipper appelée TSC-22D (*Transforming growth factor β 1-Stimulated Clone 22 Domain*). Cette famille comporte au moins six autres membres (TSC-22, THG-1,

KIAA0669, DIP, shc et drosophila bunched gene). Tous les membres de la famille TCS-22D partagent un fort degré d'homologie dans le domaine de dimérisation (TSC-box (*Tuberous Sclerosis Complex*)) et dans le domaine leucine zipper. En revanche, les domaines N et C terminaux diffèrent.

Le domaine leucine zipper de GILZ est situé entre les leucines 76 et 96. GILZ présente 64% d'homologie avec les autres membres de la famille TSC-22D au niveau de ce domaine. Ce domaine est un motif structural d'interaction protéique, consistant en une hélice α amphipatique. Cette hélice contenant des résidus leucine répétés régulièrement (tous les 7 résidus), est capable d'interagir fortement avec la même hélice d'un autre monomère formant une «glissière à leucine». GILZ a donc la capacité de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec les différents membres de la même famille.

GILZ est caractérisé par une région riche en résidus proline en position C-terminale capable d'interagir avec des protéines à domaine SH3 (*Src Homology domain*) et intervenant dans la fixation et l'inhibition de NF- κ B. Des sites consensus potentiels de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) (Thréonine 8, Sérine 88, Sérine 114), par la PKC (*Protéine Kinase C*) (Sérine 35), un site potentiel de sumoylation et un site consensus de glycosylation (Asparagine 19) (330) sont également décrits (figure 27).

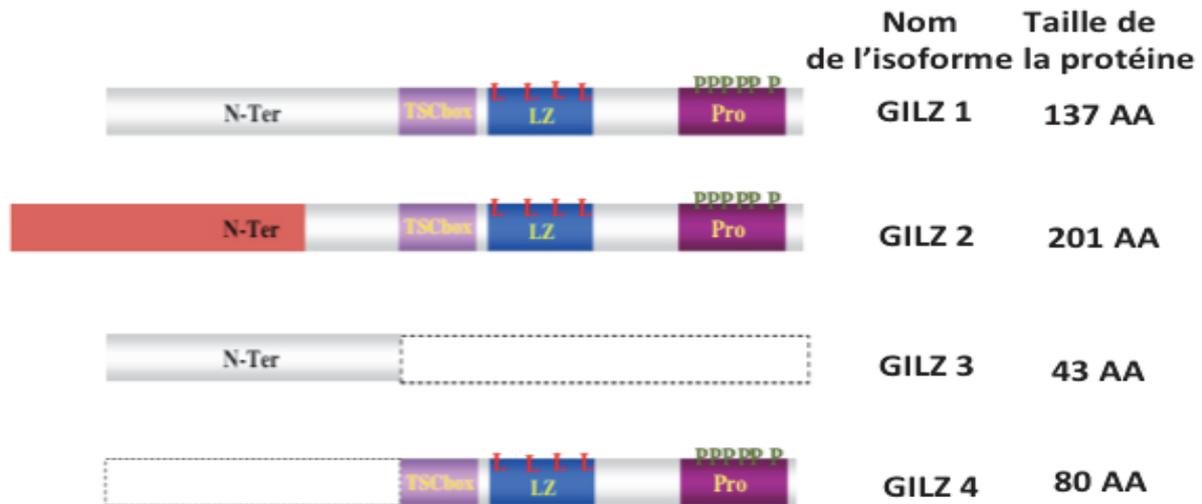


Figure 28. Représentation schématique de l'alignement des quatre différents isoformes de GILZ.

La région grisée représente la région identique entre les isoformes. La région en pointillé représente la partie non traduite de l'isoforme GILZ 3 ou de GILZ 4. TSC : tuberous sclerosis complex, LZ : domaine leucine zipper, AA : acides aminés.

Adapté à partir de Soundararajan et al, The journal of Biological Chemistry, 2007.

Un nouvel isoforme de GILZ murin appelée Long-GILZ (L-GILZ) a été récemment identifiée dans les cellules musculaires squelettiques et dans une lignée murine de myoblastes C2C12. L-GILZ est une protéine de 234 acides aminés avec un poids moléculaire de 28 KDa. Elle diffère de GILZ-1 par la partie N-terminale (*figure 29*) (333). L'induction de ces deux isoformes GILZ et L-GILZ dans les myoblastes C2C12 par la Dex a été associée avec une inhibition de la différenciation myogénique. GILZ et L-GILZ interagissent directement avec les facteurs de transcription MyoD et HDAC1 et inhibent leur activité transcriptionnelle (333).

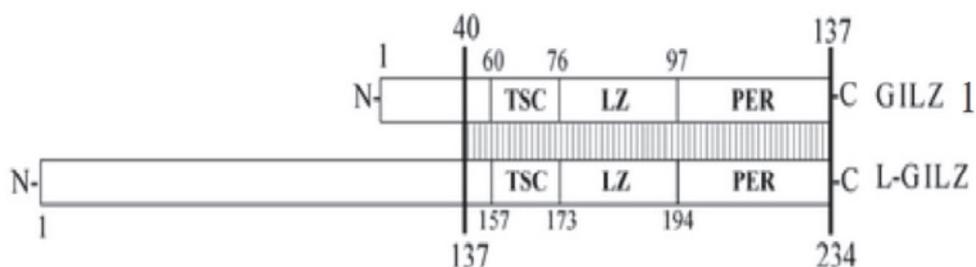


Figure 29. Représentation schématique de GILZ murin et d'un nouvel isoforme L-GILZ.

Les 2 isoformes partagent une séquence d'acides aminés qui comprend la TSC box, le domaine leucine zipper (LZ) et les régions riches en acide glutamique et en proline (région PER); la région rayée représente la région identique entre les deux isoformes.

Adapté à partir de Bruscoli D. et al, The journal of Biological Chemistry 2010.

GILZ est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus à l'exception du pancréas (330). L'expression basale de GILZ a d'abord été déterminée par Northern blot dans des tissus murins tels que le thymus, la rate, les ganglions lymphatiques et les reins (329) mais aussi dans les tissus humains (rate, reins, cœur, poumons, muscle squelettique) et les lignées humaines (HL60, Jurkat, THP-1, U937).

Par des analyses d'hybridation in situ, l'ARNm de GILZ a été détecté dans le cerveau et dans la moelle épinière. L'intensité du signal est variable selon les différentes régions du cerveau et de la moelle épinière. Une expression prédominante de l'ARNm de GILZ a été détectée dans les neurones moteurs (334). Les expériences de Western blot corrént avec l'expression de l'ARNm de GILZ dans la moelle osseuse et les cellules hématopoïétiques (les cellules souches CD34⁺, les LB et LT matures, les monocytes, les granulocytes, les cellules de Kupffer et les MCs humains) (330, 335, 336). L'expression de GILZ a également été observée dans d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales des bronches supérieures (337).

4.2. Les principaux inducteurs de GILZ

Les principaux inducteurs de GILZ sont les glucocorticoïdes (les GCs), des hormones circulantes indispensables au maintien de l'homéostasie. Ces hormones sont également utilisées en thérapeutique grâce à leur capacité d'induction de l'apoptose ou d'inhibition de la prolifération cellulaire.

Ces molécules ont un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur lié à l'activation du récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et à la régulation de l'expression de nombreux gènes. Le contrôle de l'expression de gènes par le GR dépend de sa liaison à l'ADN. Ce facteur de transcription se fixe directement sur les séquences GREs des promoteurs des gènes régulés par les GCs. Cette régulation de l'expression des gènes peut également se faire indépendamment de la liaison du GR à l'ADN, par des interactions protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription (338).

L'induction de l'expression de GILZ par les GCs s'explique par la présence de motifs GREs dans le promoteur de GILZ (332). De nombreuses équipes ont montré, chez l'homme et chez la souris, une induction de l'expression GILZ par les GCs dans différents types cellulaires, en particulier dans les cellules hématopoïétiques. Ainsi, l'expression de GILZ est induite par la DEX dans les LT de la rate, des ganglions lymphatiques, dans les thymocytes (330), dans les monocytes ou les macrophages in vitro et in vivo (339), les CD₄ dérivées de monocytes et de

cellules CD34⁺ (340) et les mastocytes (335). L'effet de la DEX sur l'expression de GILZ a été observé dans d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales des bronches supérieures (337) et les cellules embryonnaires de l'hypophyse de poulet (341). L'aldostérone qui utilise un récepteur aux minéralocorticoïdes, induit également l'expression de GILZ dans le rein et dans les tubules rénaux corticaux (342). De même, il a été démontré que la vasopressine et l'aldostérone stimulent l'expression de GILZ dans les cellules épithéliales rénales des mammifères (343). Grugan et al ont montré que l'expression de GILZ était induite dans les cellules de myélome multiple de patients traités par des GCs (dexaméthasone, hydrocortisone, bécloéthasone ou triamcinolone) provoquant la mort de ces cellules (344). Dans ce modèle, l'expression de GILZ peut être modulée par la voie PI3K (Phospho-inositide-3-kinase)/PKB (344). La présence d'inhibiteurs de cette voie augmente l'expression de GILZ et la combinaison de GCs et de ces inhibiteurs augmente encore plus l'expression de GILZ dans les cellules de myélome.

L'expression de GILZ peut être également modulée par les interleukines, le facteur de croissance TGF- β ou par des hormones comme les œstrogènes. Une augmentation de l'ARNm de GILZ a été détectée dans les cellules NK et dans les cellules NKT en présence d'hydrocortisone ou d'IL-15 (345). Dans les cellules dendritiques dérivées de monocytes ou de cellules souches CD34⁺, l'expression de GILZ est induite par l'IL-10 ou l'IL-4 et le facteur de croissance TGF- β (340). L'IL-10 induit aussi l'expression de GILZ dans les cellules endothéliales humaines (346). Il a été montré que l'expression de GILZ était induite lors de la déprivation en IL-2 dans les LT CD8⁺ murins CTLL-2. Ces cellules dépendent de l'IL-2 pour leur prolifération et leur survie (332).

Une augmentation de l'expression de GILZ en réponse aux œstrogènes a été rapportée dans les lignées cellulaires humaines de cancer du col de l'utérus Hela, dans les cellules tumorales cervicales et dans les cellules embryonnaires humaines de rein (347). L'éthanol augmente l'expression de GILZ dans les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines d'une manière dose-dépendante (348).

L'exposition des souris à un stress WRS (*Water-immersion Restreint Stress*) augmente significativement l'expression de l'ARNm de GILZ dans le cortex préfrontal médian et dans l'hippocampe de ces animaux, régions associées au stress mental. Cette augmentation de GILZ est dépendante de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (334).

En résumé, les GCs augmentent l'expression de GILZ dans toutes les cellules connues pour exprimer la protéine. Les autres facteurs inducteurs de l'expression de GILZ varient en

fonction du type cellulaire.

4.3. Les principaux inhibiteurs de GILZ

Les inhibiteurs de l'expression de GILZ dépendent du type cellulaire. Une activation de la voie PI3K/PKB par l'IL-6 ou par le facteur de croissance IGF-1 (*Insuline Like GrowthFactor I*) inhibe l'expression de GILZ induite les GCs dans les cellules de myélome (344). Il a également été montré que l'expression de GILZ induite par les GCs est inhibée par l'IL-2 dans les LT CTLL-2 (332). Enfin, l'expression de GILZ est réprimée lors de la phase d'expansion clonale des lymphocytes suite à l'activation du TCR par un anti-CD3 (329) ou du BCR (*B Cell Receptor*) par un anticorps IgM (349).

Dans les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines, l'expression de GILZ est diminuée par les cytokines inflammatoires IL-1, TNF- α et IFN- γ (337). Les oestrogènes inhibent l'expression de GILZ dans les cellules MCF-7 (lignée de cancer du sein humain) (347).

4.4. Rôle de GILZ dans le système hématopoïétique

4.4.1. Rôle de GILZ dans la génération de LTregs

Nous avons vu dans le chapitre 2 que les CD jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires en déterminant leur orientation vers une voie immunogène (activation de LT effecteurs) ou une voie tolérogène (activation de LTregs). Une CD qui exprime GILZ acquiert un phénotype tolérant caractérisé par une diminution de l'expression des molécules de CMH II, des molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86 et une augmentation de l'expression de molécules suppressives telles que IL-T3/CD85K et B7-H1/CD274 (340). L'expression de GILZ par les CD s'accompagne d'une diminution de l'expression des chimiokines pro-inflammatoires telles que CCL3, CCL5 et CXCL8 et d'une augmentation de la production d'IL-10 (340). Ce phénotype tolérant permet aux CD d'activer des LT régulateurs. Ces derniers expriment les marqueurs CTLA-4, Foxp3⁺ et CD25^{high}. Ils produisent de l'IL-10 et sont capables d'inhiber la prolifération des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ via cette sécrétion d'IL-10. Les LTregs induits par les CD exprimant GILZ sont spécifiques d'antigène. La capacité des CD exprimant GILZ à générer des LTregs est dépendante de la sécrétion d'IL-10 par ces CD.

Les GCs, l'IL-10 et le TGF- β , facteurs connus pour leurs propriétés immunosuppressives, augmentent l'expression de GILZ dans les CD et leurs effets immunosupresseurs sur ces cellules sont médiés par GILZ. Ainsi, la capacité des CD traités par les GCs à induire des LTregs est complètement abolie en présence d'un siRNA ciblant l'ARNm de GILZ (350) (figure 30). Ces observations permettent d'envisager de nouvelles stratégies d'immunomodulation des CD, centrées sur la régulation de l'expression de GILZ, avec des potentialités en vaccinologie, soit pour accroître l'immunogénicité des antigènes vaccinaux (inhibition de l'expression de GILZ), soit au contraire pour développer des « vaccins tolérogènes », spécifiques d'antigènes (augmentation de l'expression de GILZ), dans le cas des maladies allergiques, auto-immunes et dans le cas de rejet des greffes.

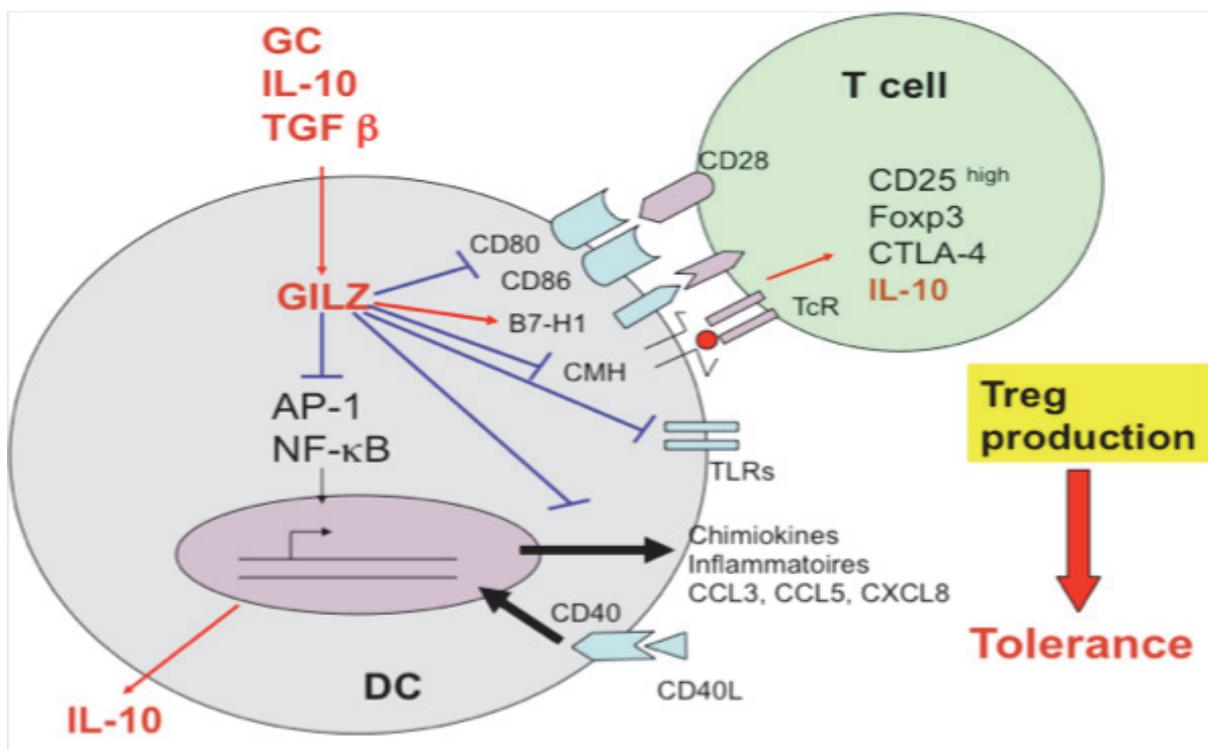


Figure 30. Les CD sur-exprimant GILZ présentent un phénotype tolérant.

GILZ inhibe l'expression de CD80, CD83, CD86 et stimule l'expression d'ILT-3 et de B7H1. Les CD qui surexpriment GILZ génèrent des lymphocytes Tregs CD25^{high} Foxp3⁺ CTLA4⁺ spécifiques de l'antigène. L'IL-10 joue un rôle majeur dans ce processus. L'induction des LTregs par les CD GILZ⁺ est dépendante de l'IL-10. Les fonctions suppressives des LTregs induites par les CD GILZ⁺ sont également dépendantes de l'IL-10.

4.4.2. Rôle anti-inflammatoire de GILZ

Mon équipe a montré que GILZ est induit dans les monocytes/macrophages humains traités par l'IL-10 et la DEX, et participe aux effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs de

ces molécules (339). Dans les THP-1 (lignée de type monocytaire), GILZ inhibe l'expression de CD80 et CD86, la production de chimiokines telles que RANTES, MIP1- α , et l'expression de TLR-2 induites par l'IFN- γ ou le LPS (*lipopolysaccharide*) (340). GILZ inhibe la production d'IL-6 et de TNF- α dans les macrophages activés par du LPS. Il a été démontré que l'annexine-1, médiatrice des actions anti-inflammatoires des GCs, régule négativement la production d'IL-6 et de TNF- α dans les macrophages en induisant l'expression de GILZ (351).

Nous avons observé *in vivo* chez l'homme que les macrophages activés au niveau des granulomes des patients atteints de la maladie de Crohn ou de tuberculose n'expriment pas GILZ. Au contraire, l'expression de GILZ persiste dans les macrophages infiltrant les tumeurs dans les lymphomes de Burkitt. Ces résultats suggèrent que l'extinction de GILZ est nécessaire à l'expression des propriétés pro-inflammatoires des macrophages, tandis que la persistance de son expression pourrait contribuer à l'ignorance des tumeurs (339). D'autre part, le traitement par les GCs des patients avec une hépatite alcoolique, caractérisés par un profil pro-inflammatoire induit l'expression de GILZ dans les monocytes et diminue ainsi la sensibilité de ces cellules au LPS c'est à dire leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et RANTES) en réponse au LPS (336).

Enfin, l'effet anti-inflammatoire de GILZ a été confirmé chez des souris déficientes en IL-10. Ces souris auxquelles une protéine de fusion Tat-GILZ a été administrée par voie sous-cutanée deviennent moins sensibles à l'induction de colite par l'acide sulfonique dinitrobenzène comparées aux souris contrôles. La diminution lésions intestinales est associée à une inhibition de la production de TNF- α , FN- γ et IL-1 β par les LT CD4⁺ des souris ayant reçu GILZ. Cette protection par GILZ se traduit par une réduction de la réponse immune Th1 (352, 353) en faveur de la réponse Th2. Toutes ces études ont montré que l'inhibition de la synthèse des cytokines pro-inflammatoires était liée à l'inhibition de la translocation nucléaire de NF- κ B par GILZ.

4.4.3. Rôle de GILZ dans l'apoptose cellulaire

La stimulation répétée du TCR par l'antigène sensibilise les LT activés à l'apoptose. Ce mécanisme est appelé AICD (*Activation-Induced Cell Death*). L'AICD a lieu en présence d'IL-2 et implique le récepteur de mort Fas, activé par la fixation de FasL et par la répression de l'inhibiteur de la caspase 8, FLIP (*Fllice Inhibitory Protein*) (354, 355). Les cellules 3DO (lignée d'hybridome de LT murins) sur-exprimant GILZ résistent à l'apoptose induite par la stimulation du TCR démontrant que GILZ a un rôle inhibiteur dans l'AICD (329).

GILZ s'oppose à l'AICD en inhibant les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB favorisant alors la diminution de la production d'IL-2 et de l'expression de l'IL-2Rα (356, 357). Lors de la stimulation du TCR, GILZ interagit directement avec la sous-unité p65 du facteur NFκB, le séquestre dans le cytoplasme et inhibe son activité transcriptionnelle. L'équipe de Riccardi a montré que GILZ interagissait avec NFκB *in vitro* et *in vivo* par son domaine leucine zipper et que la région riche en proline (entre les acides aminés 121 et 123) joue également un rôle dans cette interaction (*figure 31*) (358). L'inhibition d'AP-1 par GILZ provoque également la répression de l'activité du promoteur de FasL en inhibant la synthèse de novo des facteurs de transcription Egr2 et Egr3 responsables de l'activation de ce promoteur. Ainsi, Mittelstadt et Ashwell ont montré que la surexpression de GILZ dans les LT de Jurkat provoquait la diminution de l'expression de FasL (357).

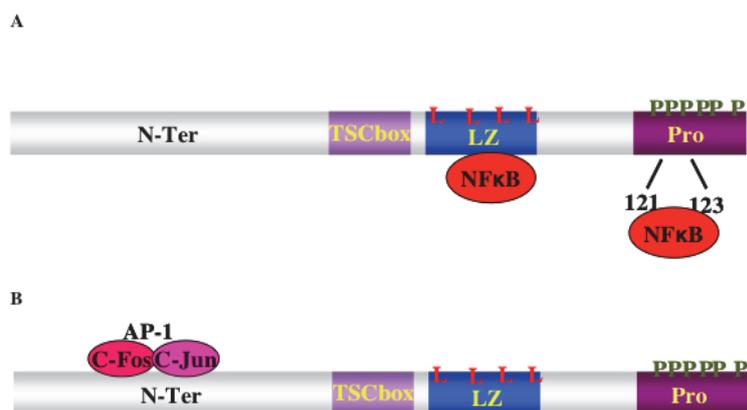


Figure 31. Les domaines d'interaction de GILZ.

A) GILZ interagit avec NF-κB via son domaine leucine zipper. La région riche en proline (acides aminés 121-123) est aussi importante dans la répression du facteur de transcription NF-κB. B) GILZ interagit avec AP-1 par son domaine N-terminal. LZ : leucine zipper, Pro : domaine riche en prolines.

Lors d'une stimulation antigénique, les LT prolifèrent principalement grâce à la présence de signaux extracellulaires délivrés par des facteurs solubles comme l'IL-2. La résolution de la réponse immunitaire se caractérise par une diminution de la stimulation du TCR d'où une diminution de la synthèse d'IL-2R et de la production d'IL-2. On observe alors une induction de l'apoptose des lymphocytes par déprivation en facteurs de croissance. Il a été montré que GILZ était également induit lors de la déprivation en IL-2 dans les cellules CTLL-2 et protège ainsi les cellules contre l'apoptose. Cette protection est due à l'inhibition indirecte de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim par GILZ. Le mécanisme d'action reposerait, au moins en partie, sur l'inhibition de l'activité du facteur de transcription Foxo3 par GILZ

(332). Foxo3 est responsable de l'expression de Bim dans les lymphocytes B et T (359, 360) (figure 32).

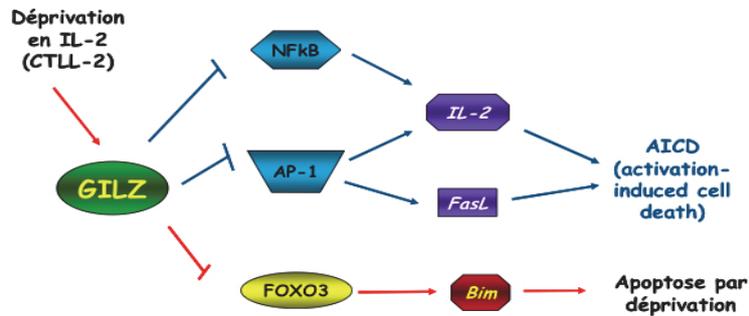


Figure 32. Facteurs de transcription régulés par GILZ dans les cellules CTLL-2 déprivées en IL-2.

GILZ inhibe l'activité des facteurs de transcription NFκB, AP-1 et Foxo3. Ceci aboutit à l'inhibition de l'expression de l'IL-2, de l'IL-2Rα, de FasL et de Bim. Par ces mécanismes GILZ s'oppose à l'AICD et à l'apoptose induite par déprivation en Il-2.

Adapté à partir de Asselin-Labat M.L. 2004.

GILZ a aussi été décrit comme inducteur de l'apoptose dans certains types cellulaires. Chez les souris transgéniques surexprimant constitutivement GILZ dans la lignée T, GILZ semble favoriser l'apoptose spontanée des thymocytes selon un mécanisme impliquant la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-XL et l'activation des caspases 8 et 3 (359).

L'ensemble de ces données montre que les effets anti-apoptotique ou pro-apoptotique de GILZ sont dépendant du type cellulaire.

4.4.4. Rôle de GILZ dans la prolifération cellulaire

Les études menées sur GILZ ont montré qu'il pouvait jouer un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Une surexpression de GILZ dans les cellules 3DO induit une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire. De plus, une diminution de la prolifération des cellules NIH-3T3 (lignée embryonnaire murine de fibroblastes) sur-exprimant GILZ a été décrite (361).

La phosphorylation de la protéine Erk induit dans les cellules l'activation des cyclines D jouant un rôle important dans la prolifération cellulaire. En inhibant cette phosphorylation, comme le font les GCs, GILZ favoriserait une inhibition de l'expression de la cycline D1 (361). GILZ reproduit les effets antiprolifératifs des GCs en interagissant avec la protéine

Raf-1 responsable de la phosphorylation de la protéine Erk (362). Cette interaction se fait par le domaine N-terminal de GILZ. GILZ peut aussi inhiber la prolifération en interagissant avec la protéine Ras. En 2007, Ayroldi *et al* ont étudié l'effet de GILZ en amont de la signalisation de Raf-1 pour comprendre le mécanisme d'inhibition de Raf-1. Cette équipe a montré une interaction entre GILZ et Ras *in vitro* et *in vivo* dans les cellules Cos-7 (lignée de fibroblastes rénales de singe) au niveau du domaine TSC-box de GILZ. Cette interaction a également été observée dans les cellules T 3DO traitées par la DEX. GILZ peut également former un complexe trimérique avec Ras et Raf-1. Le complexe trimérique coexiste avec les hétérodimères GILZ/Ras et GILZ/Raf-1. Il a été démontré que le complexe trimérique ou le complexe GILZ/Ras inhibe en aval les voies de signalisation de Erk et PKB et l'expression de la cycline D1, médiateurs importants de la prolifération cellulaire, tandis que l'hétérodimère GILZ/Raf-1 n'inhibe que la voie Erk (361-363) (figure 33).

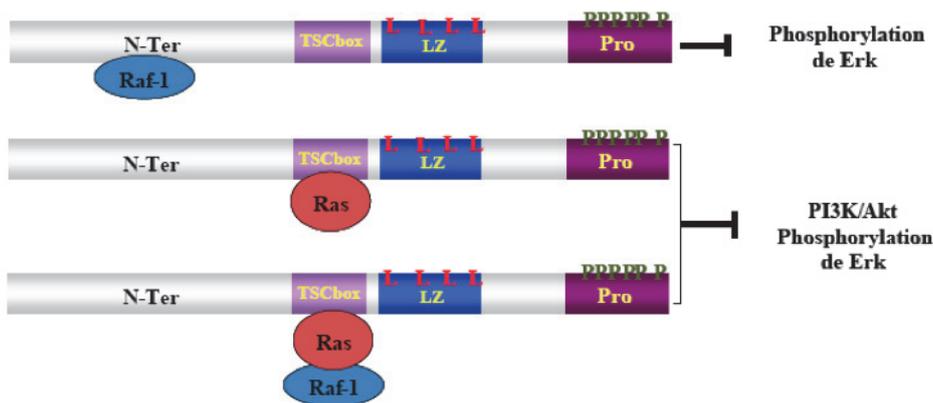


Figure 33. Domaines d'interaction de GILZ avec Raf-1 et Ras.

GILZ interagit avec la protéine Raf-1, Ras ou les 2 entraînant ainsi une inhibition de la phosphorylation de Erk et un effet antiprolifératif.

A l'inverse, Redjimi *et al* ont démontré que GILZ est exprimé par les cellules tumorales de cancer épithélial de l'ovaire et qu'une expression stable de GILZ dans des cellules BG-1 (lignée de tumeur ovarienne) augmente leur prolifération en phosphorylant les protéines kinases PKB/AKT, molécules impliquées dans la progression tumorale. GILZ diminue également l'expression de p21 et induit l'expression de la cycline D1 ce qui favorise l'entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire (364). Récemment, il a été démontré que l'expression de GILZ dans les cellules BG-1 augmente l'expression de la fraktalkine sous sa forme soluble et membranaire or la fraktalkine soluble phosphoryle également AKT (365). GILZ pourrait donc exercer des effets prolifératifs ou anti-prolifératifs selon le type cellulaire

étudié.

4.4.5. *GILZ et la différenciation vers les effecteurs LTh1 et LTh2*

Il a été démontré que la voie Th2 était favorisée par GILZ dans des souris transgéniques qui sur-expriment GILZ constitutivement dans les LT (353). En effet, ces souris transgéniques exprimant GILZ sécrètent plus de cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-10 et produisent moins de cytokines de la voie Th1 telle que l'IFN- γ par comparaison aux souris sauvages. L'augmentation des cytokines de type Th2 dans les thymocytes provenant de ces souris transgéniques corrèle avec l'augmentation de l'expression de GATA-3 et de STAT-6, deux facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des cellules vers le type Th2. L'expression du facteur de transcription T-bet nécessaire pour la différenciation vers la voie Th1 est réprimée dans les LT de ces souris transgéniques (353).

4.5. Rôle de GILZ dans le système non hématopoïétique

4.5.1. *Rôle de GILZ dans l'adipogenèse*

Il a été montré que les GCs favorisent l'adipogenèse en induisant l'expression de PPAR- γ 2 (*Perixosome Proliferator Activated Receptor Gamma-2*). Les GCs induisent l'expression de C/EBP- δ (*CCAAT-enhancer-binding proteins- δ*) qui se fixe sur le promoteur de *ppar- γ 2* et active son expression. Cet événement initie la différenciation des adipocytes (366). Or, GILZ inhibe la transactivation du promoteur de *ppar- γ 2*, ce qui suggère que GILZ inhibe la différenciation des adipocytes par ce mécanisme. Il a été montré que la différenciation des cellules pré-adipocytaires 3T3-C exprimant GILZ de façon stable était bloquée contrairement aux cellules pré-adipocytaires contrôles qui se différencient en adipocytes (366). Dans ce processus, il semble que l'expression de GILZ est un mécanisme de rétro-contrôle induit par les GCs afin de réguler la différenciation des adipocytes en réponse aux GCs.

4.5.2. *Rôle de GILZ dans le transport de sodium*

GILZ régule aussi le transport du sodium dans les cellules épithéliales rénales en inhibant la phosphorylation de la protéine Erk et en permettant l'augmentation de l'expression des canaux sodiques à la surface des cellules épithéliales rénales (343). La complexité de l'étude de la fonction de GILZ dans le rein a augmenté avec la découverte de différents isoformes de GILZ. Les isoformes GILZ 2 et GILZ 3 se comportent comme GILZ 1 et augmentent l'expression des canaux sodiques. Cependant, GILZ 1 reste l'isoforme principale contrôlant

l'expression des canaux sodiques dans les cellules épithéliales et le transport de sodium via ces canaux. Comme dans le cas de GILZ1, les effets de GILZ 2 et 3 sont médiés par l'inhibition de la phosphorylation de la protéine Erk. GILZ 4 n'a pas d'effet sur le transport du sodium dans ces cellules ni d'effet sur la phosphorylation de la protéine Erk mais inhibe efficacement la prolifération cellulaire (contrôlée également par GILZ1). GILZ2 et GILZ3 n'affectent pas la prolifération cellulaire (367). Ces données suggèrent que les isoformes de GILZ jouent des rôles différents dans la régulation des fonctions cellulaires, y compris le transport ionique et la prolifération cellulaire.

La *figure 34* permet de visualiser de façon synthétique l'ensemble des fonctions assurées par GILZ en prenant comme exemple cellulaire un lymphocyte T. Ce schéma intègre également les voies de signalisation de GILZ impliquées dans ses différents effets.

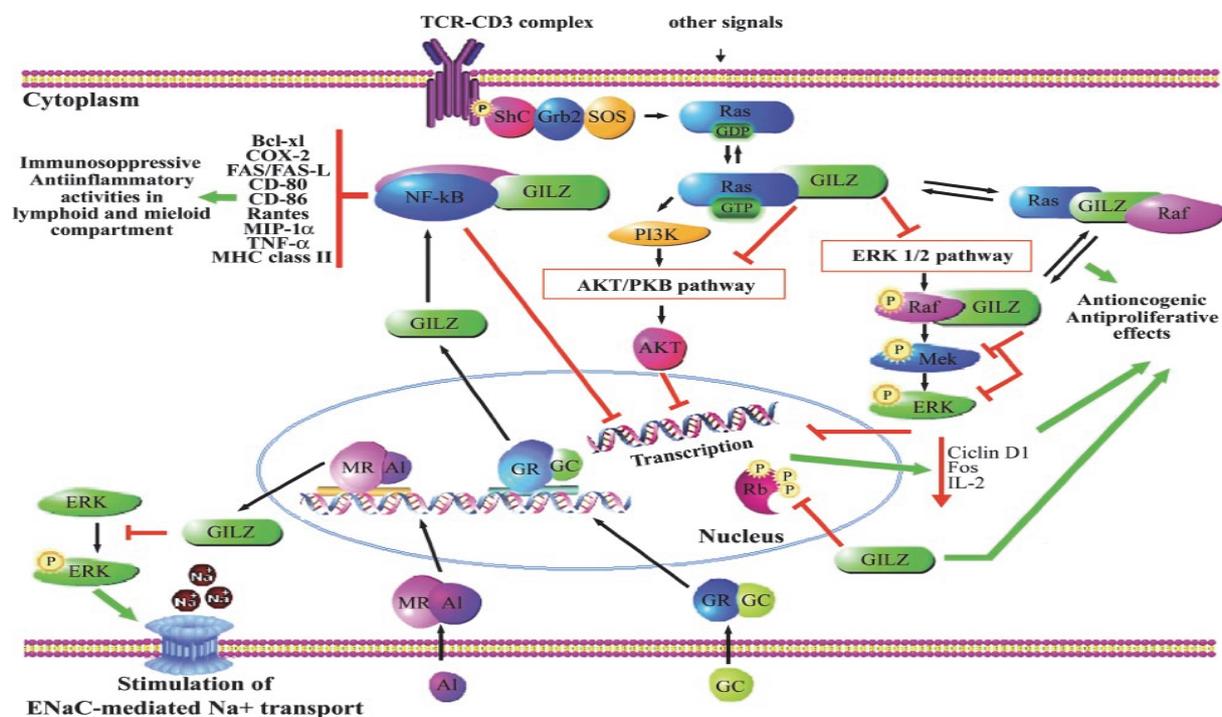


Figure 34. Représentation schématique des rôles de GILZ et des voies de signalisation impliquées.

GILZ induit par les GCs interagit directement avec NFκB et inhibe son activité transcriptionnelle. Le complexe Shc/Grb2/Sos convertit Ras en sa forme active Ras-GTP conduisant à l'activation des voies de signalisation ERK1/2 et AKT/PKB. GILZ peut former des complexes dimériques ou trimériques avec Ras et Raf ce qui diminue la prolifération cellulaire dépendante de Ras et Raf et la transformation induite par Ras. GILZ induite par l'aldostérone inhibe la phosphorylation de ERK 1/2 conduisant à une augmentation de l'expression membranaire de la sous-unité α de l'ENaC et par conséquent une augmentation du flux de Na⁺ par ce canal. MR, récepteur corticoïde minéral; Al, aldostérone; GR, récepteur corticoïde; GC, glucocorticoïde; Shc, Grb2; protéines adaptatrices; SOS, facteur d'échange GTP. Les flèches rouges indiquent l'inhibition; les flèches vertes indiquent l'activation.

Adapté à partir de Ayroldi et al, FASEBJ, 2009.

Au vu de l'ensemble de ces données, il apparaît que l'expression de GILZ contrôle l'état d'activation des cellules. Toutefois, dans les monocytes/macrophages et les CD4 le rôle de GILZ est plus complexe. Dans ces types cellulaires, GILZ ne doit pas être simplement considérée comme une molécule désactivatrice mais plus comme un facteur intra-cellulaire impliqué dans la décision de la cellule d'afficher soit un programme immunogène soit un programme tolérogène. L'expression de GILZ par les monocytes/macrophages ou les CD4 leur confère des propriétés anti-inflammatoires inductrices de tolérance.

Il a été démontré que GILZ est impliqué dans plusieurs pathologies humaines. L'expression macrophagique de GILZ est abolie dans des conditions associées avec des réponses immunitaires incontrôlées tels que la maladie de Crohn, la sarcoidose et l'inflammation hépatique alcoolique. Au contraire, l'expression de GILZ persiste dans les macrophages infiltrant les tumeurs dans les lymphomes de Burkitt.

Nous pensons que la modulation de l'expression de GILZ dans les CD4 et les monocytes/macrophages est une stratégie innovante soit pour induire une tolérance immunitaire spécifique d'antigène pour le traitement des maladies allergiques, des maladies auto-immunes, de l'inflammation chronique et dans le rejet de greffe soit pour induire une réponse immunitaire efficace dans le cas des réponses anti-tumorales.

Chapitre 5: Les nouvelles thérapies dans les maladies allergiques

Les corticoïdes inhalés, les agonistes des adrénorécepteurs β_2 à courte et à longue action et les anti-histaminiques sont actuellement les principaux traitements préconisés dans l'asthme allergique. Bien que les stéroïdes soient relativement peu coûteux et très efficaces ils ne contrôlent pas les symptômes chez presque la moitié de la population asthmatique et s'accompagne d'effets secondaires non négligeables à long terme (368). Une mauvaise observance du traitement est à prendre en compte dans les échecs thérapeutiques chez les patients asthmatiques (369).

La lutte contre la progression des allergies bénéficie de l'amélioration de l'immunothérapie spécifique de l'allergène, de la progression des connaissances sur les cytokine et leurs récepteurs qui conduisent à la polarisation Th2, et d'une compréhension plus claire des voies de recrutement des leucocytes et des voies de signalisation impliquées dans l'activation cellulaire et la sécrétion des médiateurs (figure 35).

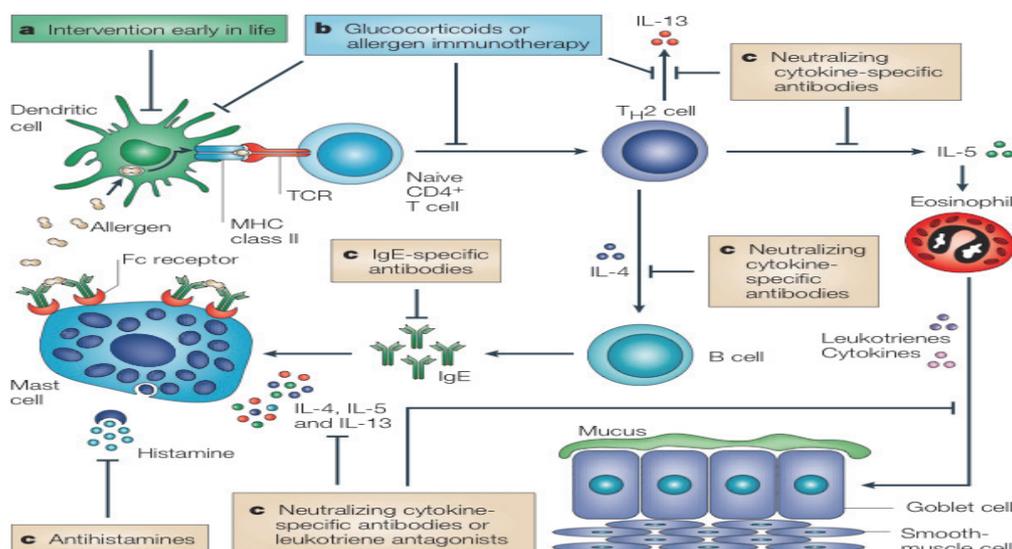


Figure 35. Les différents cibles d'intervention thérapeutique au cours de la réaction allergique.

Trois principales cibles sont proposées pour des interventions thérapeutiques. A) La première possibilité (cadre vert) est de bloquer l'initiation de la réponse immunitaire et par conséquent prévenir le développement de la maladie due aux réponses Th2. B) La 2^{ème} possibilité (cadre bleu) est de bloquer l'activation des LTh2 spécifiques de l'allergène soit directement ou indirectement en ciblant les cellules présentatrices de l'allergène (par exemple en administrant des drogues anti-inflammatoires tels que les glucocorticoïdes ou par l'immunothérapie). C) La 3^{ème} possibilité (cadre jaune) est de bloquer les molécules effectrices qui provoquent les symptômes cliniques de la maladie allergique : par exemple en administrant des antihistaminiques, des antagonistes de leucotriènes ou des anticorps neutralisant les cytokines Th2 ou les IgE. IL, interleukin ; TCR, T-cell receptor.

Adapté à partir de Hawrylowicz C.M. & O'Garra A. Nature Reviews of Immunology 2005.

5.1. Les immunothérapies ciblant les cytokines

La découverte de nouvelles sous-populations de LT et des voies alternatives d'induction des réponses de type Th2, de concert avec une meilleure compréhension du microenvironnement pulmonaire, a fourni de nouvelles informations sur la pathologie de l'asthme et par conséquent des opportunités d'innovation thérapeutique (370).

Quelques soient les nouvelles immunothérapies testées, il devient évident que leur impact sur le traitement des maladies allergiques doit être analysé non plus sur une population générale de patients asthmatiques mais en tenant en compte des différents phénotypes cliniques d'asthme allergique (371, 372).

Ainsi, les premiers essais cliniques chez des patients atteints d'asthme moyen ou sévère ont montré que les anticorps anti-IL-5 (mépouzimab et reslizumab), réduisent efficacement le nombre des éosinophiles dans le sang et les expectorations mais n'améliorent pas les autres symptômes de la maladie (373-375). Toutefois, dans ces premiers essais cliniques, une meilleure efficacité de cette thérapie était observée chez les patients ayant des exacerbations d'asthme. Des essais cliniques ultérieurs restreints à un phénotype clinique plus spécifique (inclusion de patients avec des taux élevés d'éosinophiles dans les expectorations) ont montré que le mépouzimab réduit significativement le nombre des éosinophiles dans le sang et les expectorations et permet de diminuer les doses de stéroïdes chez les patients inclus dans l'étude (376, 377).

Une nouvelle approche de thérapie dans l'asthme consiste à utiliser des anticorps ciblant l'IL-9. L'expression de l'IL-9 est détectée dans les biopsies de patients asthmatiques. Elle est produite par les LT CD4⁺, les MCs et les éosinophiles et plusieurs observations ont souligné un rôle de l'IL-9 dans le développement de l'inflammation allergique (378). Ce rôle a été déjà détaillé dans le chapitre 3. Des essais cliniques utilisant des anticorps anti-IL-9 sont en cours. Ces études devraient identifier le rôle précis de l'IL-9 dans la physiopathologie de la maladie asthmatique et révéler si le ciblage de l'IL-9 est bénéfique chez des patients asthmatiques avec certains phénotypes cliniques (379).

Comme la production de l'IL-17A et l'IL-17F est augmentée chez les patients ayant une neutrophilie et chez les patients asthmatiques résistants aux stéroïdes, les membres de la famille de l'IL-17 pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des asthmes sévères (216, 380). Les approches ciblant l'IL-17 à l'aide d'anticorps sont actuellement en cours de développement préclinique (370).

Cibler les cytokines impliquées dans la communication entre les cellules épithéliales et les CD4 comme l'IL-25, la TSLP et l'IL-33 pourrait également être une approche thérapeutique innovante dans les maladies allergiques (*tableau 5*).

Target	Mechanism of Action	Therapeutic Modality	Compound Name	Phase of Development	Progress in patient population -when reported
<i>Cytokine or receptor</i>					
IL-4	Inhibition of differentiation and expansion of T _H 2 cells, decreased IgE	IL-4-specific antibody	Pascolizumab	Phase I, development halted	Little effect in asthmatics
IL-4	Inhibition of differentiation and expansion of T _H 2 cells, decreased IgE	soluble IL-4R	Not known	Phase I, development halted	Little effect in asthmatics
IL-4R	Inhibition of differentiation and expansion of T _H 2 cells, decreased IgE	mutated IL-4	Pitrakinra or AER 001	Phase II	Decreased allergen response in asthmatics
IL-13	Decreased AHR, mucus secretion and IgE levels	IL-13-specific antibody	CAT-354 or Tralokinumab, Lebrikizumab, ABT-308, & QAX576	Phase I and II	Data not available
IL-13	Decreased AHR, mucus secretion and IgE levels	humanized IL-13Ra2-specific antibody	Not known	preclinical	Data not available
IL-4Ra	Inhibition of IL-4 and IL-13 actions	IL-4Ra-specific antibody	AMG-317 and SAR231893	Phases II and I, respectively.	Data not available
IL-4Ra	Inhibition of IL-4 and IL-13 actions	IL-4Ra antisense	AIR645	Phase II	Data not available
IL-5	Inhibits activation, maturation and recruitment of eosinophils	IL-5-specific antibody	Mepolizumab, Reslizumab	Phase II	Mepolizumab: steroid-sparing and inhibition of eosinophilia in asthmatics
IL-5R	Inhibits activation, maturation and recruitment of eosinophils (depletes cells)	IL-5Ra-specific antibody	MEDI-563 or Benralizumab	Phase II	Data not available
IL-9	Inhibits eosinophil recruitment and mast cell growth	IL-9-specific antibody	MEDI-528 or Enokizumab	Phase II	Data not available
IL-25	Inhibition of alternative T _H 2 pathways; decreases AHR, eosinophilia and IgE levels.	IL-25-specific antibody	Not known	preclinical	Data not available
IL-33	Inhibition of alternative T _H 2 pathways; decreases AHR, eosinophilia and IgE levels.	IL-33-specific antibody	Not known	preclinical	Data not available
IL-17 and IL-17R	Inhibition of AHR and neutrophilic inflammation	IL-17-specific antibody and IL-17R-specific antibody	Not known	preclinical	Data not available
TSLP	Inhibition of alternative T _H 2 pathways; decreases eosinophilia and IgE levels.	TSLP-specific antibody	AMG-157	Phase I	Data not available
TSLPR	Inhibition of alternative T _H 2 pathways; decreases eosinophilia and IgE levels.	TSLPR-specific antibody	Not known	preclinical	Data not available

Tableau 5. Les cytokines qui peuvent être des cibles thérapeutiques dans l'asthme et dans l'allergie.

Adapté à partir de Lloyd C.M. & Hessel E.M., Nature Reviews Immunology 2010.

5.2. Les immunothérapies ciblant les LTregs

Tout l'enjeu des immunothérapies est de réorienter durablement les réponses immunitaires inappropriées des patients asthmatiques vers une tolérance immune vis-à-vis de leur(s)

allergène (s). De ce fait, les LTregs sont devenus une cible cruciale dans le développement de nouvelles thérapies innovantes.

L'immunothérapie spécifique des allergènes qui consiste à injecter par voie sous-cutanée des doses croissantes d'un allergène spécifique au patient permet d'augmenter à la fois le nombre de LTregs CD25⁺ et celui des LTregs producteurs d'IL-10 (381, 382). Comme les LTregs sont maintenus par une exposition antigénique continue, une injection fréquente d'allergène est exigée (273, 383). Malheureusement, ce traitement ne s'applique qu'aux patients monosensibilisés et atteints de rhinites. Son efficacité est loin d'atteindre les 100% de patients traités.

Une meilleure compréhension des mécanismes responsables de l'inhibition à long terme observés chez les patients ainsi traités, permettrait d'améliorer l'immunothérapie spécifique dans l'asthme allergique.

Le traitement par corticostéroïdes améliore la fonction et augmente le nombre de LTregs CD4⁺CD25⁺ in vivo. En combinaison avec la vitamine D, les corticostéroïdes induisent également les LTregs producteurs d'IL-10 in vitro. Il est à noter que les β2-agonistes augmentent ainsi la production d'IL-10 par ces cellules (289). Il est bien connu que les effets bénéfiques des corticostéroïdes sont transitoires et disparaissent à l'arrêt du traitement. Le traitement par la vitamine D peut être lui même une approche particulièrement prometteuse dans le traitement des patients atteints d'asthme sévère résistant aux corticostéroïdes. Le traitement avec le calcitriol (la forme active de la vitamine D) restore ex-vivo la réponse des patients aux stéroïdes. Un essai portant sur l'efficacité du calcitriol chez des patients atteints d'asthme sévère est en cours.

5.3. Les immunothérapies ciblant les CDs

Cibler les CDs pulmonaires avec des composants inhalés et modifier ainsi leur fonction est le saint Graal de la recherche dans les maladies allergiques mais il est difficile de trouver des composants qui n'augmentent pas simultanément la sensibilité des patients aux infections respiratoires (384). Les corticostéroïdes inhalés réduisent le nombre des CDs dans les poumons des patients asthmatiques sans toutefois provoquer une immunodéficience sévère (93). Les stratégies qui déplètent les CDs ne sont probablement pas les plus intéressantes à développer. En revanche, contrôler la fonction des CDs et ainsi l'orientation des réponses immunitaires de façon antigène spécifique semble plus prometteur.

Un de champ d'exploration consiste donc à identifier les sous-populations de CD_s naturellement inductrices de tolérance et à cibler ces cellules dans les immunothérapies. Ainsi, il a été démontré que les CD_s plasmacytoïdes jouent un rôle important dans la tolérance aux antigènes inhalés et l'homéostasie pulmonaire. La déplétion des CD_s plasmacytoïdes durant l'instillation intra-nasale d'antigènes inoffensifs s'accompagne d'une perte de la tolérance aux antigènes inhalés et les souris développent les caractéristiques d'un asthme sévère et ce en absence d'adjuvant. A l'inverse, une tolérance est induite suite à une injection intra-trachéale de CD_s plasmacytoïdes (110) via la différenciation de LTregs (110, 385). Ces données pourraient être utilisées pour développer des traitements ciblant les CD_s plasmacytoïdes pulmonaires et permettant ainsi leur expansion et activation *in vivo* suite à un traitement cytokinique (111) où à l'utilisation d'adjuvants microbiens qui stimule spécifiquement la fonction des CD_s plasmacytoïdes (386).

Cette dernière décennie a été le témoin d'une expansion des connaissances des mécanismes impliqués dans les réactions allergiques et ce grâce à des données épidémiologiques et des observations expérimentales chez l'homme et dans les modèles murins. Le rôle majeur des CD_s a ainsi été mis en avant. Il apparaît clairement aujourd'hui que les CD_s travaillent en étroite collaboration avec les cellules épithéliales bronchiques et les cellules immunes avoisinantes. Ces interactions sont autant de nouvelles pistes à explorer pour le développement de nouvelles immunothérapies innovantes dans le traitement de l'asthme.

5.4. Défis à venir

Malgré tous ces progrès, nous n'avons toujours pas déterminé comment un individu devient allergique et nous n'avons aucun moyen de prédire quelle stratégie thérapeutique permettra de modifier l'histoire naturelle des maladies allergiques. En revanche, nous savons aujourd'hui que l'expression de GILZ dans les CD_s induit de la tolérance immune et permet de générer des lymphocytes Tregs spécifiques de l'antigène. Nous pensons que la modulation de l'expression de GILZ dans les CD_s dans le but d'induire une tolérance immune vis-à-vis des allergènes inoffensifs est une piste thérapeutique innovante et très prometteuse. La mise au point de techniques qui permettraient d'apporter à la CD un inducteur de GILZ et l'allergène permettraient de restaurer la tolérance immunitaire des patients asthmatiques allergiques vis

à-vis de l'allergène sans toutefois modifier ou altérer leurs réponses immunes vis-à-vis de pathogènes agressifs.

Objectifs

Ce travail de thèse vise à définir de nouvelles approches d'immunothérapie qui permettraient d'induire chez les sujets allergiques une tolérance immunitaire vis-à-vis des allergènes. Les cellules dendritiques (CDs) jouent un rôle primordial dans les réactions allergiques dictant en tant que cellules présentatrices de l'allergène, au système immunitaire s'il doit répondre ou non à l'allergène. Notre équipe a démontré préalablement que la décision des CDs de présenter ou non un antigène selon un mode tolérogène dépend en partie de sa production d'une protéine intracellulaire dénommée GILZ (*Glucocorticoid induced leucine zipper*) dont la synthèse est induite par les glucocorticoïdes (GCs), l'IL-10 et le TGF- β . Une CD qui exprime GILZ durant l'apprêtement de l'antigène et sa présentation aux lymphocytes T effecteurs génère des lymphocytes T régulateurs (LT CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺IL-10⁺). En revanche, une CD qui n'exprime pas GILZ active des lymphocytes T effecteurs. En se basant sur ces observations, nous avons évalué une nouvelle stratégie thérapeutique dans les maladies allergiques basées sur la modulation de l'expression de GILZ dans les CDs présentatrices de l'antigène.

Mon projet de thèse se divise en trois parties et repose à la fois sur des études effectuées chez l'homme et dans un modèle murin d'asthme allergique.

La 1^{ère} partie de ma thèse consiste à démontrer que les GCs in vivo chez les patients allergiques, induisent une tolérance spécifique de l'allergène et la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques de cet allergène en stimulant la production de GILZ par les CDs.

La 2^{ème} partie de ma thèse consiste à vérifier l'hypothèse selon laquelle l'histamine libérée principalement par les mastocytes au cours des réactions allergiques active les CDs en inhibant la production de GILZ et de ce fait participe à la perpétuation de la réponse immune inadaptée contre les allergènes.

La 3^{ème} partie de ma thèse vise à valider in vivo les concepts précédents. Des souris transgéniques qui sur-expriment GILZ constitutivement dans leurs CDs ont été élaborées par

Dominique Emilie et Roman Krzysiek (INSERM UMR_S U996). Chez ces souris, le gène codant pour GILZ est placé sous le contrôle du promoteur CD11c (souris transgéniques CD11c-GILZ). Ce modèle permettra de démontrer in vivo l'effet inducteur de tolérance de GILZ au cours d'une réponse aux allergènes inhalés, d'impliquer la génération de LT régulateurs/ suppresseurs dans ce phénomène, et de caractériser les propriétés fonctionnelles de ces cellules.

En résumé, cette thèse s'articule autour d'un thème central qui consiste à évaluer de nouvelles immunothérapies dans les maladies allergiques fondées sur l'immunomodulation des CD.

Résultats

**Partie 1: Rôle de GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper)
dans l'induction de cellules dendritiques régulatrices chez les
patients allergiques traités par corticothérapie orale.**

Avant-propos

Nous avons vu qu'un des mécanismes qui permet aux CD_s d'orienter la réponse immunitaire vers une voie immunogène ou une voie tolérante dépend en partie de l'expression de la protéine intracellulaire GILZ. La production de GILZ est dépendante de l'action des GCs et des cytokines tels que l'IL-10 et le TGF- β ce qui explique le rôle anti-inflammatoire et immunosuppresseur de ces composés, thérapeutique pour les GCs, physiologique pour les seconds. Il a été démontré que le traitement oral des patients asthmatiques par des GCs conduit à la différenciation de LTregs de type Tr1. Or les LTregs induits par les CD_s exprimant GILZ sont de type Tr1.

Nous avons donc exploré l'hypothèse selon laquelle le traitement de patients allergiques par GCs oraux induit des lymphocytes T régulateurs/suppresseurs spécifiques de cet allergène en stimulant la production de GILZ par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA).

Afin de valider notre hypothèse, des CPA isolées à partir de patients allergiques traités par GCs oraux ont été analysées ex vivo (expression de GILZ et la capacité à induire des LTregs spécifiques de l'allergène). Huit patients allergiques ont été inclus dans cette étude. Deux patients sensibilisés au pollen des graminées (Phlp; Phelum Pratense), 3 sensibilisés aux acariens (Derp; Dermatophagoides pteronyssinus) et 3 sensibilisés à la fois aux pollens des graminées et aux allergènes d'acariens. L'expression de GILZ a été analysée par western-blot dans les CPA isolées du sang avant et 48h après le début du traitement oral par les GCs (prednisone 0,5mg/kg/jour). La capacité des CPA à induire des lymphocytes T régulateurs/suppresseurs spécifiques de l'allergène a été testée dans des systèmes de co-cultures. Les CPA ont été isolées avant et 48h après traitement, chargées aux allergènes (Derp ou Phlp selon le statut allergique des patients) et co-cultivées avec des lymphocytes T CD4⁺ autologues (isolés du sang périphérique des patients avant traitement, et congelés jusqu'à leur

utilisation). 7 jours après le début de cette première co-culture, une partie des lymphocytes T CD4⁺ a été analysée par cytométrie en flux pour évaluer l'expression des marqueurs de LTregs Foxp3, CD25 et la sécrétion d'IL-10. Une autre partie a été purifiée, irradiée et ajoutée à une culture de PBMC autologues (isolés avant le traitement des patients et congelée jusqu'à leur utilisation) en présence de l'allergène. A la fin de cette seconde co-culture nous avons évalué le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺ ayant proliféré parmi les PBMC. Cette 2^{ème} co-culture permet d'évaluer la fonction suppressive des LT activés par les CPA isolées avant et après traitement.

Pour déterminer l'implication de l'expression de GILZ dans les effets observés, les mêmes expériences ont été réalisées après transfection des CPAs isolées de patients avec des siRNA dirigés contre l'ARNm de GILZ ou des siRNA contrôles.

Cette étude a démontré chez les patients allergiques que la corticothérapie orale augmente la capacité des CPA circulantes à générer des lymphocytes Tr1 spécifiques de l'allergène en induisant l'expression de GILZ. Cette augmentation de l'expression de GILZ dans les CPA, observée après un traitement par GCs oraux permet de rediriger la réponse immunitaire des patients d'une réponse effectrice spécifique de l'allergène vers une réponse régulatrice spécifique de cet allergène et ce en induisant des lymphocytes T régulateurs CD25^{high} Foxp3⁺ IL-10⁺.

Cette étude permet de valider le concept qu'il est possible d'induire des lymphocytes T régulateurs spécifiques d'un allergène chez les patients allergiques en modulant l'expression de GILZ dans les CPAs. Dans cette étude, l'augmentation de l'expression de GILZ dans les CPAs est obtenue en traitant les patients par des GCs. Ces résultats pourraient suggérer des approches plus rationnelles de désensibilisation aux allergènes. Ces approches pourraient consister à administrer simultanément l'allergène et des substances inductrices de l'expression de GILZ, ou à utiliser des vecteurs codant pour l'allergène et pour GILZ.

**Glucocorticoids generate regulatory-dendritic cells in allergy via
glucocorticoid-induced leucine zipper**

Soumaya Karaki, PhD,^{a,b} Gilles Garcia, MD, PhD,^{b-d} Francis Capel,^{a,b} Thi Tran,^{a,b} Colas Tcherakian, MD,^{e,f} Marc Humbert, MD, PhD,^{b-d} Dominique Emilie, MD, PhD,^{a,b} & Véronique Godot, PhD^{a,b}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U996, Clamart, France.

^bUniversité Paris-Sud 11, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France.

^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U999, Le Plessis Robinson, France.

^dAssistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine Bécclère, Service de Pneumologie, Clamart, France.

^eHôpital Foch, Service de Pneumologie, Suresnes, France.

^fUniversité Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Faculté de médecine Paris-Île-de-France-Ouest, Guyancourt, France.

Corresponding author: Véronique Godot, INSERM UMR_S 996, 32 rue des Carnets, 92 140 Clamart, France. Phone: (33.1) 41.28.80.24; fax: (33.1) 46.32.79.93; veronique.godot@u-psud.fr

This study was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale (DAL20041203167) and the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Contrats d'Initiation à la Recherche Clinique, CIRC 2005 CRC 05058). Soumaya Karaki holds fellowships from INSERM, Région Ile-de-France and Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-GENO-030-01).

Total word count: 3396 words

Abstract

Background: Glucocorticoid-treatment promotes the differentiation of regulatory-T lymphocytes in allergic patients. We previously demonstrated in vitro that dendritic cells (DCs) over-expressing the protein GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) following glucocorticoid stimulation acquire a regulatory phenotype and generate regulatory-T cells.

Objective: The present study investigates whether GC-treatment of allergic patients induces GILZ expression in antigen presenting cells (APCs) such as DCs and whether this contributes to the increase in the fraction of regulatory-T cells described after GC-treatment.

Methods: Circulating APCs isolated from allergic patients before, and 48h after, oral GC-therapy were tested for their expression of GILZ (by Western-blot analysis) and their ability to induce regulatory or effector allergen-specific CD4⁺ T cells in autologous co-cultures. The role of GILZ in the observed effects has been formally demonstrated by using specific siRNA.

Results: We confirmed that oral GC-therapy up-regulates the expression of GILZ in circulating APCs of allergic patients. Furthermore our data show that GC-treatment drives the differentiation of allergen-effector T cells towards allergen-regulatory T cells by up-regulating GILZ expression in APCs and mainly in DCs (the principal circulating APCs able to present antigen to T cells).

Conclusion: The present study supports the concept of an immune regulation of allergic responses through the modulation of GILZ expression by DCs and opens new perspectives in the development of innovative immunotherapies in the treatment of allergic diseases.

Key messages.

In allergic asthma, glucocorticoid-treatment is not only anti-inflammatory but also able to increase the frequency of regulatory-T lymphocytes in the peripheral blood of patients.

We previously demonstrated that glucocorticoids, by up-regulating the expression of the intracellular immuno-regulatory protein GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper), polarize dendritic cells towards a regulatory phenotype.

The present study demonstrates in allergic patients that oral corticotherapy enhances the ability of circulating antigen-presenting cells to generate allergen-specific regulatory-T cells by up-regulating the expression of GILZ and supports the concept of an immune regulation of allergic responses through the modulation of GILZ expression in DCs.

Capsule summary.

We demonstrated that glucocorticoids enhance the frequency of allergen-regulatory T-cells in allergy by controlling the expression of GILZ, a key protein in the generation of regulatory-dendritic cells. GILZ, the new target of immunotherapy in allergy.

Key words.

Allergy, antigen-specific regulatory T cells, regulatory dendritic cells, GILZ, glucocorticoids, Foxp3, IL-10.

Abbreviations:

APC: Antigen-presenting cell

DC: Dendritic cell

GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper

GC: Glucocorticoid

Tr1: T regulatory type 1

Treg: regulatory CD4⁺ T cells

PPD: Purified protein derivative

Introduction

Dendritic cells (DCs), as pre-eminent antigen-presenting cells (APCs), discriminate pathogens and harmless environmental antigens by integrating multiple information such as pro- or anti-inflammatory signals delivered by neighboring cells.^{1, 2} Depending on this information, they activate subsets of effector cells involved in the removal of pathogens or regulatory cells for immune responses.² The outcome is a fine balance between protective immunity and central or peripheral tolerance. A dysfunction of this equilibrium can lead to diseases such as allergy and asthma both characterized by a defective tolerant state.^{3, 4} There is compelling evidence that DCs are major players in the development or regulation of allergic diseases.⁵ To elucidate mechanisms whereby DCs make the right decision to activate effector or regulatory cells will provide useful information that will be used to design innovative and efficient immunotherapies.

We previously identified one of the mechanisms active in DC decision-making. We demonstrated that the expression of an intracellular protein named GILZ (the acronym for glucocorticoid-induced leucine zipper) determines the immunogenic or tolerogenic phenotype of human DCs.^{6, 7} DCs with a high level of GILZ during antigen processing and presentation stimulate antigen-specific regulatory CD4⁺ T cells (Treg), whereas DCs with low level of GILZ activate antigen-specific effector CD4⁺ T cells.⁷ The secretion of IL-10 by GILZ-expressing DCs is essential for the induction of Treg and is under the control of GILZ.⁷ The Treg phenotype activated by GILZ-expressing DCs is similar to Tr1 with an expression of CD25^{high} Foxp3⁺ and suppressive functions dependent on IL-10 production.⁷

GILZ is largely expressed in hematopoietic cells and some structural cells such as epithelial cells.⁸ Its expression is frequently associated with the refractory state of immune cells.⁶⁻⁹ Therefore, glucocorticoids (GCs) are the common inducer of GILZ expression in all cells.⁶⁻⁹ The other inducers of GILZ are dependent on the cellular type.⁸ We demonstrated in

DCs that GILZ up-regulation is under the control of GCs and also IL-10 and TGF β , both physiological immunosuppressive agents.^{6,7}

IL-10 and TGF β have been shown to induce regulatory DCs and are highly expressed in lungs and gut where it is essential to maintain a tolerant state against environmental harmless antigens.^{2, 10, 11} GCs are potent immunosuppressive drugs used for the treatment of diseases linked to chronic inflammation or defective peripheral tolerance such as allergic diseases and asthma.¹² In allergic asthma, GC-treatment is not only immunosuppressive and anti-inflammatory but also at least temporarily able to increase the frequency of Treg in the peripheral blood of patients.¹³ It has been shown that GCs given orally to asthmatic patients trigger the differentiation of T cells towards Tr1 cells.¹³

Therefore the present study analyses the expression of GILZ in antigen presenting cells (APCs) isolated from the peripheral blood of patients with allergic respiratory diseases (rhinitis or asthma) before, and 48h after, oral GC-therapy. We also investigated whether GILZ production by APCs contributes to the increase in the fraction of Tr1 cells described after GC-treatment. We show that GC-therapy promotes activation of Tr1 cells in allergic patients by a GILZ dependent mechanism. APCs isolated 48h after oral GC-therapy express a higher level of GILZ that is required to enhance their regulatory properties and the number of allergen-specific Tr1 cells. These data support the possibility of an immune regulation in allergic diseases by modulating GILZ expression in DCs and open the way to new perspectives of immunotherapies targeting DCs.

Methods

Allergic patients

This study was approved by the Ethics Committee of our institution (CPP Paris-Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France) and informed consent was obtained from each patient before inclusion. Blood samples were obtained from eight non-smoking patients with symptomatic allergic rhinitis and/or asthma before and after two days of oral GC-therapy. In order to obtain homogenous results all patients received prednisolone 0.5mg/kg/day at D1 and D2 and blood sample was collected on day three, before drug intake.

Allergologic assessment included a medical interview which helps to identify specific allergens for each patient. Patients were therefore tested for identified allergies with skin prick tests and specific serum IgE tests. Patients' characteristics are presented in Table I. It should be noted that the patients included had not received a steroid course in the previous three months. The patients with allergic rhinitis received oral steroids in case of uncontrolled rhinitis despite the maximal treatment as recommended by J Bousquet et al.¹⁴ including at least oral antihistamines and intra-nasal steroids. The patients with asthma received oral steroids in case of asthmatic exacerbation (as defined in GINA classification 2008).¹⁵

Isolation of APCs and T cells

Blood was collected from patients during the first pre-inclusion visit for CD4⁺ T cells and PBMC isolation and immediately before and 48 hours after oral GC-therapy (0.5 mg/kg of body weight/day) for APC isolation. APCs were obtained by negative magnetic selection (Dyna, Compiegne, France), as previously described.⁷ Cell composition of APCs determined in two experiments was consistent with our previously published data (almost 91% CD14⁺ cells and 3% CD11c⁺ ILT3⁺ cells).^{6, 7} To avoid any alteration of the phenotype acquired *in vivo* by circulating DCs, manipulation of cells was restricted to the minimum. Therefore, this study was carried out with circulating APCs instead of DCs purified by cell sorting or positive

magnetic selection. However, it has been shown that DCs among circulating APCs are the principal cells able to present antigen to T cells.^{16, 17}

A negative selection CD4⁺ T lymphocyte kit was used for CD4⁺ T cell purification (Dyna, Compiegne, France). Purified CD4⁺ T lymphocytes comprised more than 96% of CD3⁺ CD4⁺ cells. CD4⁺ T lymphocytes and PBMCs were kept frozen until used.

Western-blot

Detection of GILZ by Western blotting and by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as previously described.¹⁸ The anti-GILZ antibody used was a polyclonal antibody obtained from Santa-Cruz (sc 33780). Western blot results were quantified using ScanAnalysis software (BioSoft, Cambridge, United Kingdom).

Culture

The antigens used were the recall antigen purified protein derivative (PPD, 1 µg/mL; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* (Derp; 5 µg/ml, Stallergènes, Antony, France) and extract of *Phleum pratense* (Phlp; 5 µg/ml, Stallergènes, Antony, France). Circulating APCs (1.0×10^5) were loaded with allergen (according to the patients' allergic status) or PPD during four hours, washed and co-cultured during seven days with 1.0×10^5 autologous CD4⁺ T lymphocytes labeled with 2.5 µM CFSE (5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) according to the manufacturer's instructions (Vybrant kit; Molecular Probes, Eugene, OR). The phenotype and proliferation of CD4⁺ T cells (by CFSE dilution) were determined at the end of cultures by flow cytometry.

In experiments using siRNA, APCs were nucleofected with siCtrl or siGILZ, as previously described.^{6, 7} The fraction of transfected cells, determined using fluorescent siRNA, was from

70% to 80%. Four hours after nucleofection, APCs were pulsed with allergen for four hours, washed, and co-cultured with autologous CD4⁺ T lymphocytes.

Flow cytometry

The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used: anti-CD4-PC5, anti-CD4-PE, anti-CD3-APC, anti-CD25-APCs, (BD Pharmingen, Pont-De-Claix, France), anti-IL-10-PE (25209) (R&D Systems, Lille, France), and rat anti-human Foxp3-PE (PCH101) (eBioscience, Montrouge, France). Negative controls were irrelevant isotype-matched mAbs. For combined detection of membrane and intracellular antigens, cell surface staining was performed first. Then, intracellular staining was performed as recommended by the manufacturer. The data presented are gated for viable cells using light scatter. At least 2×10^4 events were acquired by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson, Rungis, France) and analyzed using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Functional studies of Treg

APCs (1.0×10^5) were co-cultured for seven days with 1.0×10^5 autologous CD4⁺ T lymphocytes in 200 μ L RPMI +10% human AB serum (ABCYS, Paris, France) as previously described.⁷

At the end of the stimulation, less than 2% of the cells were CD11c⁺ILT3⁺. CD4⁺ T lymphocytes were purified, then irradiated (16 Gy), and added with allergen or PPD to autologous 10^5 PBMCs labeled with 2.5 μ M CFSE (5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) according to the manufacturer's instructions (Vybrant kit; Molecular Probes, Eugene, OR). CFSE dilution in CD4 responders was determined seven days later. The numbers of CD4⁺ T lymphocytes added to CFSE-labeled PBMC was 5×10^4 . This optimal ratio CD4⁺ T: PBMC (1:2) was determined in our previous study.⁷

Statistics

The nonparametric Wilcoxon test was used for statistical evaluation of data. Results were considered significant when $p < 0.05$. Throughout the text, data are expressed as mean \pm sem.

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Results

APCs isolated from allergic patients after a course of oral GCs up-regulate GILZ expression and induce a weak T cell proliferative response against allergens

To investigate whether systemic oral GCs up-regulate the expression of GILZ in APCs, cells were isolated from the peripheral blood of allergic patients just before (APCs pre-GC) and 48h after prednisone therapy (APCs post-GC).

A higher expression of GILZ was confirmed by Western-blot analysis in APCs post-GC compared with circulating APCs pre-GC (Fig 1). APCs were composed of monocytes and DCs. We previously demonstrated that GCs up-regulate GILZ expression in both human monocytes and DCs.^{6,7,9}

To evaluate the antigen presenting functions of APCs isolated before and after GC-treatment and so expressing a low or high level of GILZ respectively, cells were co-cultured with autologous CD4⁺ T cells labeled with CFSE. CD4⁺ T cells were purified from the peripheral blood of patients before prednisone treatment. In these co-cultures only circulating APCs obtained after oral GC-therapy came into contact with GCs.

All allergic patients included in the study were sensitized against Derp or Phlp, so APCs were pulsed with the specific allergen for each patient and the recall antigen PPD as a control antigen. APCs were then used to stimulate autologous CD4⁺ T cells. Seven days later, the proliferative response of CD4⁺ T cells was evaluated by flow cytometry on the basis of CFSE labeling. A high proliferative response of CD4⁺ T cells against allergens and PPD was confirmed for all patients when lymphocyte activation was triggered with APCs pre-GC (Fig 2). On the other hand, APCs post-GC induce only low proliferation in CD4⁺T cells (Fig 2, *A*; $\text{allergenAPC pre-GC: } 11.6\% \pm 5.9\%$ CD4 proliferating cells and $\text{allergenAPC post-GC: } 1.2\% \pm 0.5\%$ CD4 proliferating cells, respectively, $P < 0.05$; Fig 2, *B*; $\text{PPDAPC pre-GC: } 25.1\% \pm 8.1\%$ CD4 proliferating cells and $\text{PPDAPC post-GC: } 6.6\% \pm 4.6\%$ CD4 proliferating cells, respectively). Therefore, APCs obtained from all allergic patients following prednisone treatment merely stimulate low proliferation of allergen-specific CD4⁺ T lymphocytes.

APCs from allergic patients treated with GCs increase Foxp3 expression and IL-10 production in activated CD4⁺ T cells

In order to clarify the inhibition of allergen-specific lymphocyte proliferation after GC- therapy, we then investigated whether circulating APCs from GC-exposed allergic patients stimulate the expression of Treg markers by CD4⁺ T lymphocytes. APCs purified pre- and post-GC treatment were loaded for four hours with Derp or Phlp and were then used to stimulate autologous CD4⁺ T cells. After seven days of co-culture, the expression of CD25, Foxp3 and IL-10 by CD4⁺ T cells was analyzed. Compared with APCs pre-GC, APCs post-GC increased the fraction of CD25^{high} Foxp3⁺ CD4⁺ T lymphocytes (Fig 3, *A*). This augmentation was more robust when allergens were used to trigger CD4⁺ T cells (Phlp response: 2.3 ± 0.4 -fold increase, Derp response: 1.8 ± 0.2 -fold increase, PPD response: 0.5 ± 0.5 -fold increase).

We previously demonstrated that Treg activated by GILZ-expressing DCs exert their suppressive functions through the production of IL-10. We then evaluated the fraction of cells producing IL-10 in this set of experiments and confirmed that APCs post-GC enhanced the fraction of CD25^{high} IL-10⁺ CD4⁺ T cells in co-cultures in comparison with their control counterparts isolated before treatment (Fig 3, B). This outcome was confirmed after lymphocyte stimulation with both allergens or recall antigen PPD (Phlp response: 3.2 ± 1.3 -fold increase, Derp response: 2.4 ± 1.1 -fold increase, PPD response: 2.1 ± 1.4 -fold increase).

Expression of Foxp3 and IL-10 is restricted to antigen-proliferating CD4⁺ T cells

During oral GC-therapy, circulating APCs from allergic patients increase the fraction of CD25^{high}Foxp3⁺ cells among CD4⁺ T lymphocytes. We investigated whether this effect was restricted to antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes. APCs pre- and post-GC were pulsed with allergen or PPD and added to autologous CD4⁺ T lymphocytes labeled with CFSE to identify antigen-specific T lymphocytes. The phenotype of CFSE^{high} and CFSE^{low} CD4⁺ T lymphocytes (corresponding to non-proliferating and proliferating cells, respectively) was compared at the end of cultures. Few CFSE^{high} CD4⁺ T lymphocytes co-expressed CD25^{high} and Foxp3⁺ in co-cultures stimulated with allergens (Fig 4, A) or PPD (data not shown). This fraction did not substantially differ between cells activated with APCs pre- or post-GC (allergens: $0.22\% \pm 0.09\%$ and $0.25\% \pm 0.11\%$, respectively, n=4; PPD: 0.1% and $0.2\% \pm 0.1\%$, respectively, n=2). In contrast, a significant fraction of CFSE^{low} CD4⁺ T lymphocytes co-expressed CD25^{high} and Foxp3⁺ in co-cultures stimulated with allergens (Fig 4, B) or PPD (data not shown). There were more CD25^{high}Foxp3⁺ cells among CFSE^{low} CD4⁺ T lymphocytes when circulating APCs post-GC were used to trigger T cells (allergens: 2.3 ± 0.4 -fold increase, n=4; PPD: 1.2 ± 0.1 -fold increase, n=2).

As APCs obtained after prednisone-treatment increased the expression of IL-10 by CD25^{high} CD4⁺ T lymphocytes, we tested whether this induction was also restricted to antigen-specific cells. Relative to control APCs, APC post-GC significantly increased the co-expression of IL-10 and CD25^{high} only in the CFSE^{low} fraction of CD4⁺ T lymphocytes responding to allergens (Fig 4, C-D; 3.2 ± 1.0 -fold increase, n=7, P < 0.05) or PPD (data not shown; 2.4 ± 1.3 -fold increase, n=4). Therefore, circulating APCs from allergic patients orally treated with GCs and over-expressing GILZ increased the expression of CD25^{high}, Foxp3⁺, and IL-10 secretion only on antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes.

GILZ-expressing APCs from GC-treated allergic patients induce activation of CD4⁺ T cells which display allergen-specific immunosuppressive functions

We next evaluated whether circulating APCs from allergic patients purified after oral GC-treatment generated CD4⁺ T lymphocytes with immunosuppressive properties. To test suppressive functions, CD4⁺ T lymphocytes were purified at the end of the APCs/CD4⁺ T cell co-cultures, irradiated, and added to CFSE-labeled autologous PBMCs stimulated with Phlp or Derp. The proliferation of CFSE-labeled CD4⁺ T lymphocytes among PBMC (CD4 responders) was evaluated. The percentage of CD4 responders was significantly reduced when T lymphocytes activated by allergen-loaded APCs post-GC were added to PBMC cultures compared to results obtained with control lymphocytes activated by allergen-loaded APCs pre-GC (Fig 5, A; P < 0.05).

The selective induction of Treg markers on antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes suggested that the inhibitory effects of these cells could also be antigen specific. To address this issue, APCs were purified from allergic patients sensitized against both allergens Phlp and Derp. APCs were loaded with one of the allergens and used to trigger autologous CD4⁺ T cells. The regulatory function of these cells was then evaluated on CD4 responders stimulated with the

same allergen (Fig 5, *B*; condition Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen a}) or the other one (Fig 5, *B*; condition Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen b}). Compared with controls, the Treg induced by allergen-loaded APCs post-GC inhibited the proliferation of CD4 responders to the same allergen, but not to the other one (Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen a}: 35.1% ± 8.1% inhibition, and Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen b}: 9.6% ± 4.8% inhibition).

Thus, APCs from GC-treated allergic patients with high levels of GILZ induced CD4⁺ T lymphocytes with phenotype and functional properties of Treg. Moreover these Treg are antigen-specific.

GILZ up-regulation in APCs from GC-treated allergic patients is necessary for the generation of allergen-specific Tregs

We then evaluated, using small interfering RNA (siRNA), whether inhibition of GILZ production by APCs post-GC prevented the induction of Tregs. APCs purified from patients pre- and post-GC treatment were nucleofected with control (siCtrl) or GILZ-specific (siGILZ) siRNA and were pulsed with allergens. Western-blot analysis confirmed an up-regulation of GILZ expression between APCs nucleofected with siCtrl and obtained from patients following GC-treatment versus just before treatment (Fig 6, *A*). No increased expression of GILZ was detected in APCs post-GC nucleofected with siGILZ (Fig 6, *A*). Therefore, GILZ siRNA efficiently inhibited GILZ expression by APCs. The different groups of APCs were pulsed with allergens and used to trigger autologous CFSE-labeled CD4⁺ T lymphocytes. APC_{siCtrl} post-GC greatly enhanced the number of CD25^{high}IL-10⁺ allergen-specific T lymphocytes compared to APC_{siCtrl} pre-GC. This difference was not observed with APCs nucleofected with siGILZ (Fig 6, *B*). Therefore, the production of GILZ by APCs isolated from allergic patients following oral GC therapy was required to stimulate allergen-specific Tregs.

Discussion

The present study demonstrated in allergic patients that oral GC-therapy enhances the ability of circulating APCs to generate allergen-specific Tr1 cells by up-regulating the expression of the intracellular factor GILZ.

Karagiannidis et al. were the first to describe an increased number of blood Tr1 in asthmatic patients treated with oral GCs.¹³ In this study, the cellular target of GCs was not identified.¹³ Our results obtained with circulating APCs isolated before and after oral GC-treatment of allergic patients confirm their data and reveal a beneficial effect of GCs on regulatory APC function mediated by GILZ.

GILZ is expressed in almost all hematopoietic cells and its expression level controls the activation of cells.⁶⁻⁹ A high level of GILZ maintains cells in a refractory state towards external stimuli.^{6-9, 19} We previously showed that GILZ play a critical role in the development of regulatory DCs in vitro and in the induction of antigen-specific, IL-10-secreting, CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs.⁷ Thus in DC, GILZ should not be considered simply as a "desactivating" molecule, but rather as an intracellular factor involved in the decision of the cell to switch from one program of differentiation to another. Hence GILZ expression promotes anti-inflammatory and tolerance-inducing properties of DCs. We identified natural (IL-10 and TGFβ) as well as therapeutic (GCs) molecules able to up-regulate GILZ expression in human DCs.^{6, 7} Therefore GILZ induction in DCs appears to be a common pathway used by different immunosuppressive agents to control immune responses.

When human DCs expressing GILZ present recall antigens (such as PPD or CMV) to memory CD4⁺ T lymphocytes, the proliferating T lymphocytes are switched from a Th1-type response to Tregs.⁷ This suppression is antigen-specific, as induced Tregs inhibit only the response of cells stimulated with the same antigen as that presented by GILZ-expressing DC.⁷

The present study extends these findings to the anti-allergen response in allergic patients. Treatment of allergic patients with GCs increases production of GILZ by circulating APCs and switches the T lymphocyte response from allergen-specific effectors towards allergen-specific Tregs, with proliferating CD4⁺ T lymphocytes expressing CD25^{high}, Foxp3 and IL-10 and inhibiting response of autologous cells towards this allergen. Abrogation of GILZ expression by specific siRNA in post-treatment APCs prevents generation of regulatory cells. The immunosuppressive functions of Tregs generated by GILZ-expressing APCs from GC-treated allergic patients are antigen-specific. Tregs induced by Phlp-pulsed/GILZ-expressing APCs inhibit response to Phlp, but not to Derp, and reciprocally. This indicates that GILZ-expressing DCs also influence the balance between Th2 and Treg lymphocytes and redirect dysregulated immune responses in allergic patients towards allergen-specific immune tolerance, at least *ex vivo*.

In allergic patients, the frequency and efficacy of allergen-specific Tregs is impaired compared to non-allergic subjects.^{3,4} Patients with mutations of the Foxp3 gene and with the IPEX syndrome (immune dysregulation, polyendocrinopathy, X-linked syndrome) display auto-immunity, but also food allergy and eczema.²⁰ A beneficial role of Tregs in the resolution of allergic diseases has been confirmed in murine models and human studies. Depletion or adoptive transfer of Tregs in murine models of asthma indicates that both natural and adaptive Tregs prevent inappropriate immune responses to allergens.²¹⁻²³ In humans, immunotherapy of allergic diseases performed by the subcutaneous administration of increasing doses of allergen over a 3-5 year period, is mediated by a restoration of allergen-specific CD4⁺ Tregs producing IL-10.²⁴

The development of antigen-specific Tregs involves specific subsets of DCs.²⁵ Plasmacytoid DCs mediate respiratory tolerance in murine models of allergic asthma.²⁵ In other studies, this role is played by pulmonary DCs secreting IL-10.²⁶ Thus, IL-10 produced by both DCs and

Tregs plays a role in asthma prevention. Because we showed in humans that GILZ stimulates IL-10 production by DCs,^{6,7} and that Tregs induced by GILZ-expressing DCs inhibit immune response by secreting IL-10,⁷ this is consistent with a role of GILZ in protection against asthma.

Our findings are encouraging for the potential development of GILZ-inducing adjuvants in the treatment of allergic disorders. To identify factors modulating the expression of GILZ in DCs combined with methods that deliver antigens to the cells in vivo would provide an elegant solution to treat allergic diseases and asthma.

Acknowledgments

We thank Dr Roman Krzysiek for the management of specific IgE tests. A special thanks to Polly Gobin for helpful comments on the manuscript and for her great interest in our research.

References

1. Belkaid Y, Oldenhove G. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 2008; 29:362-71.
2. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in immunology* 2010; 108:111-65.
3. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, 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. *The Journal of experimental medicine* 2004; 199:1567-75.
4. Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363:608-15.
5. Lombardi V, Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma. *Drug news & perspectives* 2009; 22:445-51.
6. Cohen N, Mouly E, Hamdi H, Maillot MC, Pallardy M, Godot V, et al. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 2006; 107:2037-44.
7. Hamdi H, Godot V, Maillot MC, Prejean MV, Cohen N, Krzysiek R, et al. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 2007; 110:211-9.
8. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009; 23:3649-58.

9. Berrebi D, Bruscoli S, Cohen N, Foussat A, Migliorati G, Bouchet-Delbos L, et al. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 2003; 101:729-38.
10. Li Q, Guo Z, Xu X, Xia S, Cao X. Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. *European journal of immunology* 2008; 38:2751-61.
11. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. *Nature immunology* 2001; 2:671-2.
12. Umland SP, Schleimer RP, Johnston SL. Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2002; 15:35-50.
13. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P, Woolley NJ, Hense G, Ruckert B, et al. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004; 114:1425-33.
14. Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2001; 108:S147-334.
15. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, et al. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2008; 31:143-78.
16. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90:3245-87.

17. Van Voorhis WC, Valinsky J, Hoffman E, Luban J, Hair LS, Steinman RM. Relative efficacy of human monocytes and dendritic cells as accessory cells for T cell replication. *The Journal of experimental medicine* 1983; 158:174-91.
18. Godot V, Garcia G, Capel F, Arock M, Durand-Gasselín I, Asselin-Labat ML, et al. Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* 2006; 61:886-90.
19. Hamdi H, Bigorgne A, Naveau S, Balian A, Bouchet-Delbos L, Cassard-Doulicier AM, et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2007; 46:1986-92.
20. Umetsu DT, McIntire JJ, Akbari O, Macaubas C, DeKruyff RH. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nature immunology* 2002; 3:715-20.
21. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunological reviews* 2006; 212:238-55.
22. Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, et al. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 2008; 28:546-58.
23. Henry E, Desmet CJ, Garze V, Fievez L, Bedoret D, Heirman C, et al. Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *Journal of immunology* 2008; 181:7230-42.
24. Francis JN, Till SJ, Durham SR. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2003; 111:1255-61.
25. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine* 2004; 200:89-98.

26. Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology* 2001; 2:725-31.

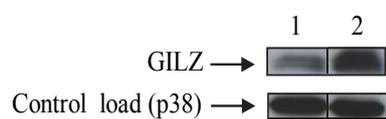


FIG 1. *Ex vivo* GILZ gene expression in circulating APCs from GC-treated allergic patients

Evaluation of GILZ production by Western-blot in human APCs isolated from the peripheral blood of allergic patients before (1) and 48 hours after (2) oral treatment with prednisone (0.5 mg/kg of body weight/day). Results are representative of 3 experiments.

	Gender	Age	Allergic status	Allergen-specific IgE levels (KUa/L)	Rhinitis	Asthma
B-D	M	28	Der p, Der f, Phl p	Der p : 28.1 Der f : 28.2 Phl p : 2.8	+	-
A-Z	M	43	Der p, Der f	Der p : 5.3 Der f : 8.3	+	-
M-H	M	46	Phl p	Phl p : 11.7	+	-
B-S	M	34	Der p, Der f,	Der p : 11.0 Der f : 11.0	+	-
O-B	F	53	Phl p	unknown	+	-
F-S	M	36	Der p, Der f, Phl p	Der p : 20.3 Der f : 16.1 Phl p : 21.2	+	+
A-D	F	25	Der p, Der f, Phl p	Der p : 15.9 Der f : 12.7 Phl p : 10.2	+	-
X-J	M	36	Der p, Phl p	Der p : 4.6 Phl p : 10.1	+	+

Der p: Dermatophagoides pteronyssinus
 Der f: Dermatophagoides farinae
 Phl p: Phleum pratense

Table 1. Demographic, allergic status and clinical characteristics of allergic patients

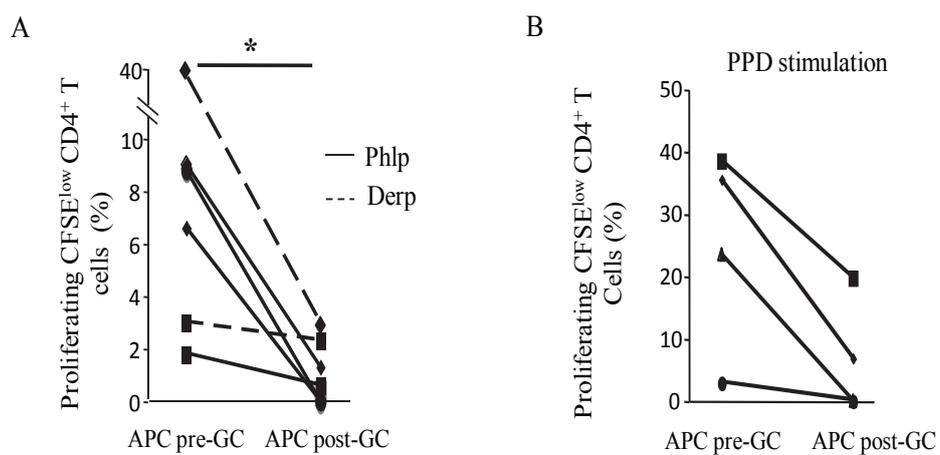


FIG 2. Circulating APCs from GC-treated allergic patients stimulate the proliferation of antigen-specific CD4⁺ T lymphocytes in a lesser extent

APCs isolated before (APC pre-GC) and 48 after GC-treatment (APC post-GC) were pulsed with allergens (A) or PPD (B) and used to stimulate CFSE-labeled CD4⁺ T lymphocytes.

The percentage of proliferating CD4⁺ T cells among total CD4⁺ T lymphocytes was evaluated. A line connects respective values obtained with APC pre- and post-GC for each patient. *P < 0.05, Wilcoxon test.

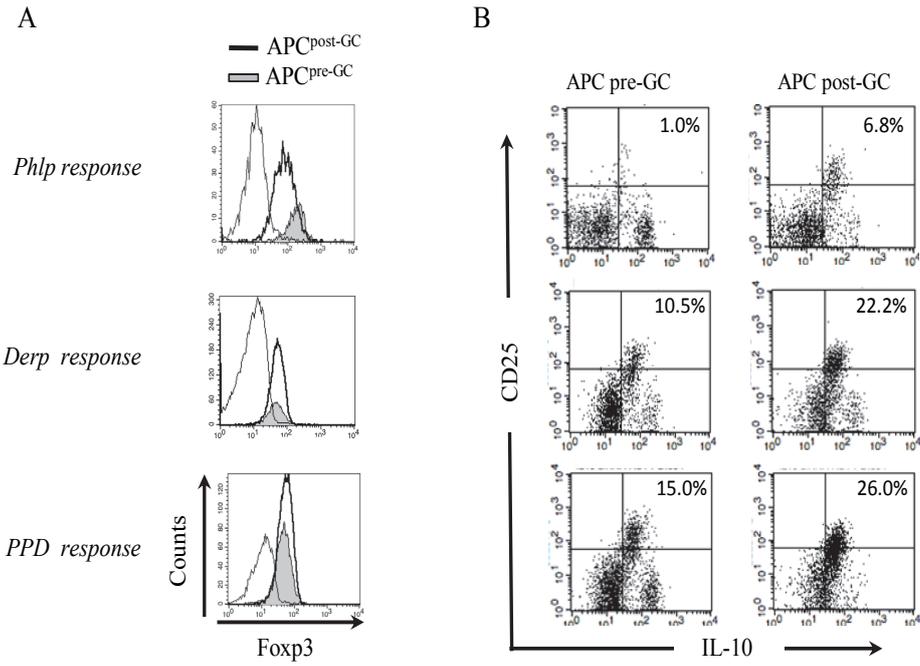


FIG 3. The fraction of CD25^{high}Foxp3⁺ CD4⁺ T cells is increased in lymphocytes stimulated with APCs from GC-treated allergic patients

APCs pre- and post-GC were pulsed with allergen (Phlp or Derp) or recall antigen (PPD) and used to trigger autologous CD4⁺ T lymphocytes. After 7 days of cultures, expression of Foxp3 on CD25^{high}CD4⁺ T cells (A) and the fraction of CD25^{high}IL-10⁺ CD4⁺ T cells (B) were analyzed by flow cytometry. All results are representative of 3 to 5 experiments.

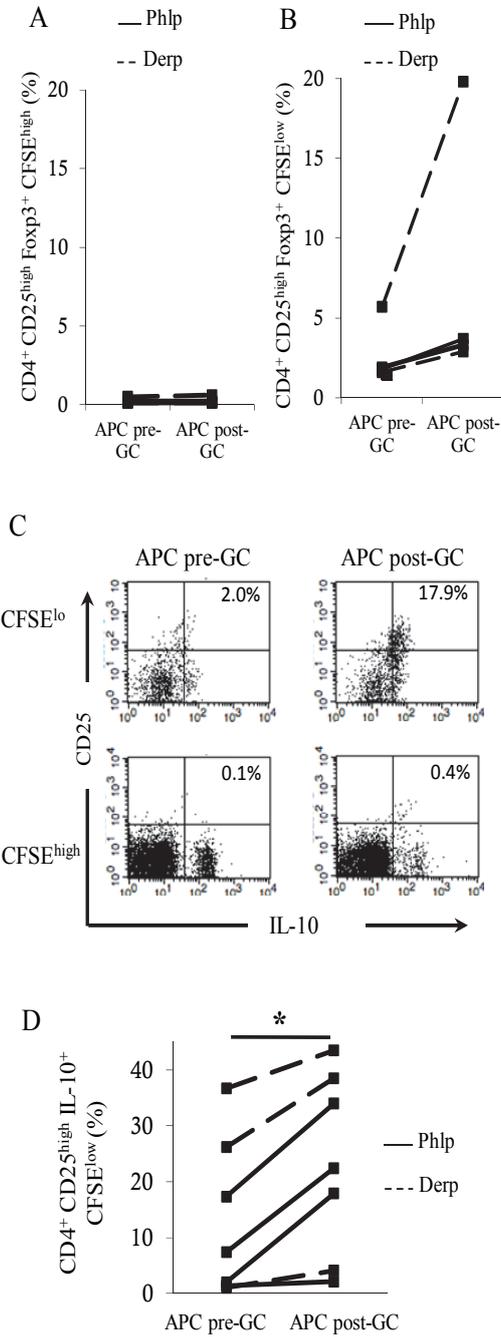


FIG 4. APCs from GC-treated allergic patients stimulate the expression of Treg markers on antigen-specific CD4+ T lymphocytes

APCs pre- and post-GC were loaded with allergen (Phlp or Derp) and co-cultured 7 days with CFSE-labeled CD4+ T lymphocytes. Expression of CD25^{high} Foxp3 (A, B) and IL-10 (C, D) Treg markers by CFSE^{low} proliferating- and CFSE^{high} non-proliferating CD4+ T cells was compared at the end of cultures. (C) Results are representative of 7 experiments. *P < 0.05, Wilcoxon test.

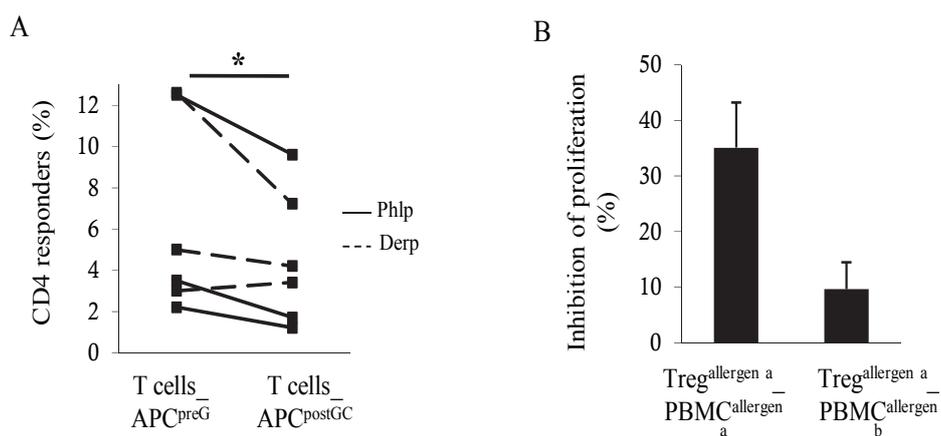


FIG 5. Suppressive functions of CD4⁺ T lymphocytes triggered with APCs from GC-treated allergic patients

After co-cultures with APCs, CD4⁺ T lymphocytes were irradiated and added with Phlp or Derp to CFSE-labeled PBMC. Proliferation of CD4 responders among PBMC was assessed (A). (B) APCs from patients sensitized to both Phlp or Derp were loaded with one of the allergens and used to trigger CD4⁺ T cells which were then added to CFSE-labeled PBMC stimulated with the same allergen (Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen a}) or the other one (Treg^{allergen a}_PBMC^{allergen b}). The inhibition of the CD4 responder proliferation compared to relative control (co-cultures with PBMC and T lymphocytes activated by APCs pre-GC) was calculated. Results are expressed as mean ± sem of 4 experiments. *P < 0.05, Wilcoxon test.

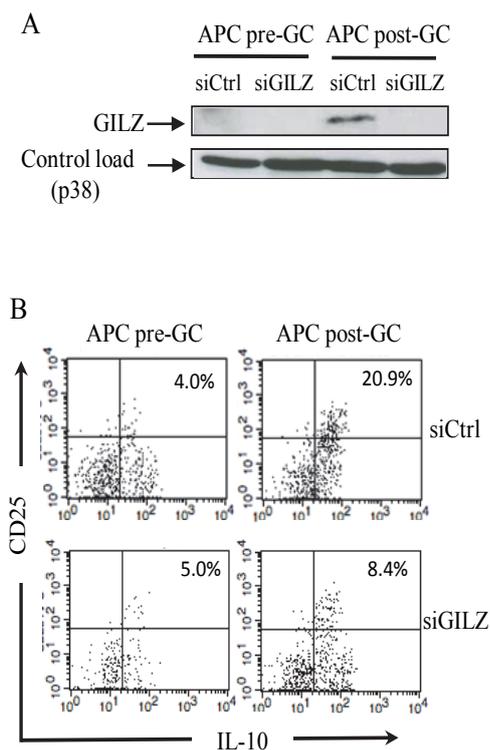


FIG 6. GILZ expression by APCs from GC-treated allergic patients is necessary for the generation of allergen-specific Treg

(A) Evaluation of GILZ production by Western-blot in APCs pre- and post-GC transfected with random siRNA (siCtrl) or GILZ siRNA (siGILZ). (B) Transfected APCs were pulsed with allergen and used to activate CFSE-labeled autologous CD4⁺ T lymphocytes. After 7 days, the expression of CD25 and IL-10 by CFSE^{low} proliferating CD4⁺ T cells was analyzed. Results are representative of 3 experiments.

**Partie 2: L'histamine puissant inhibiteur de l'expression de GILZ
(Glucocorticoid-induced leucine zipper) dans les cellules
dendritiques humaines.**

Avant-propos

Mon équipe a déjà démontré que l'induction de lymphocytes T régulateurs (LTregs) ou de lymphocytes T effecteurs (LTeffs) dépend de l'expression de la protéine intracellulaire GILZ par les cellules dendritiques (CDs). Selon notre hypothèse, les CDs quiescentes exprimeraient des taux élevés de GILZ sous l'influence des GCs endogènes, de l'IL-10 et du TGF- β et participeraient ainsi au maintien de la tolérance dans les tissus périphériques vis-à-vis d'antigènes inoffensifs comme les antigènes inhalés dérivés de notre alimentation ou de la flore commensale. L'IL-10 et le TGF- β sont des cytokines produites en quantité élevée dans le tube digestif et les poumons, deux organes ouverts sur le milieu extérieur. Nous avons identifié des molécules immunosuppressives capables d'induire l'expression de GILZ dans les CDs. Les facteurs qui inhibent l'expression de GILZ dans les CDs n'ont pas encore été identifiés.

Durant les réactions allergiques, les mastocytes (MCs) situés à proximité des CDs sont activés via leur récepteur de haute affinité aux IgE et libèrent différents médiateurs capables d'interférer avec la fonction des CDs. Il a été démontré *in vivo* que les médiateurs libérés par les MCs exercent un effet adjuvant sur les CDs (175). Nous pensons que les MCs activés participent à la création d'un microenvironnement inflammatoire autour des CDs favorable à la présentation des allergènes selon un mode immunogène en inhibant leur production de GILZ. Parmi les médiateurs libérés par les MCs, nous pensons que l'histamine pourrait inhiber l'expression de GILZ dans les CDs. L'histamine, d'après les travaux de l'équipe de Caron G. (2001), est capable d'activer *in vivo* les CDs humaines et d'induire leur maturation (156, 157). Une étude complémentaire a également démontré *in vivo* le rôle de l'histamine dans l'activation des cellules de Langerhans et dans leur migration vers les ganglions drainant le tissu au cours d'une sensibilisation des souris par voie sous-cutanée (163).

Il nous semblait donc pertinent de vérifier si certains médiateurs libérés par les MCs dont l'histamine après une activation par des IgE étaient capables de contrôler négativement l'expression de GILZ dans les CD_s.

Pour aborder cette question, nous avons étudié l'expression de GILZ et l'induction de LTregs par les CD_s différenciées à partir de monocytes circulants (Mo-DCs) de sujets sains. Ces Mo-DCs ont été traitées par la dexaméthasone (un puissant inducteur de l'expression de GILZ) en présence ou non de l'histamine ou des surnageants de culture de MCs activés via le FcεRI. Les MCs humains utilisés dans cette étude ont été différenciés à partir de cellules souches CD34⁺ isolées de sang de cordon.

Nos résultats révèlent que l'histamine et les surnageants de culture récoltés après l'activation des MCs humains par le biais du récepteur de haute affinité aux IgE diminuent significativement l'expression de GILZ dans les CD_s humaines. Ces résultats sont confirmés par RT-PCR en temps réel et par western blot. Cette diminution de l'expression de GILZ provoquée par l'histamine et par les médiateurs de MCs s'accompagne d'une altération de la capacité des CD_s à activer des LTregs. De plus, cette diminution de l'expression de GILZ par les CD_s est nécessaire pour médier les effets adjuvants de l'histamine.

Nous avons également identifié le mécanisme par lequel l'histamine diminue l'expression de GILZ dans les CD_s humaines. L'histamine augmente la phosphorylation de la voie ERK et par conséquent la phosphorylation de Foxo3 sur la sérine 294 ce qui provoque sa relocalisation du noyau dans le cytoplasme des CD_s. La localisation cytoplasmique de Foxo3 empêche sa fixation sur le FHRE (Forkhead responsive element) du promoteur de GILZ et par conséquent une diminution de l'expression de GILZ (331).

Cette étude démontre que les médiateurs libérés par les MCs exercent un effet adjuvant sur les réponses immunitaires en diminuant l'expression de GILZ dans les CD_s. L'activation des

MCs au cours des réactions allergiques pourrait contribuer à l'entretien d'une réponse immunitaire inadaptée vis-à-vis des allergènes par le biais de ce mécanisme.

Article en préparation

**Histamine impairs Dendritic Cell capacities to induce regulatory T cells by
modulating the expression of a key immunoregulatory protein : GILZ
(Glucocorticoid-induced leucine zipper)**

S. Karaki^{1,2}, F. Capel^{1,2}, T. Tran^{1,2}, A. Biola-Videmann^{1,2}, M. Dy³, M. Arock⁶, M.
Humbert^{4,5}, D. Emilie^{1,2} & V. Godot^{1,2}.

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U996, Clamart, France.

²Université Paris-Sud 11, Faculté de Médecine, Le Kremlin Bicêtre, France.

³Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8147, Paris

⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Antoine Bécère, Service de Pneumologie,
Clamart, France.

⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U999, Le Plessis Robinson,
France.

⁶Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8113, Cachan,
France.

Correspondance: Véronique Godot, MCF, INSERM U996, 32 rue des Carnets 92 140

Clamart, France Phone: (33.1) 41.28.80.24 ; fax: (33.1) 46.32.79.93; veronique.godot@u-
psud.fr

This study was supported by grants from Fondation pour la Recherche Médicale
(DAL20041203167). Soumaya Karaki was supported by a grant from INSERM.

Abbreviations used:

DC: Dendritic cells

FHRE : Forkhead Responsive Elements

GILZ: Glucocorticoid-induced leucine zipper

GCs: Glucocorticoids

FcεRI: High affinity IgE receptor

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase

mAb: Monoclonal antibody

MCs: Mast cells

Treg: Regulatory T cells

Abstract

The tolerant- or immunogenic-priming of T cells by dendritic cells (DCs) depends on GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper), an intracellular protein with immunoregulatory properties. DCs with high levels of GILZ acquire a tolerant phenotype and secrete IL-10. They induce antigen-specific regulatory T cells (Treg) of a Tr1 type. The downregulation of GILZ drives DC towards an immunogenic phenotype. DCs with low levels of GILZ activate effector T cells. Soluble factors present in the microenvironment of DCs regulate the expression of GILZ. The immunosuppressive agents, glucocorticoids (GCs), IL-10 and TGF- β are potent inducers of GILZ. Factors that negatively control GILZ expression are not yet identified in DCs.

In mucosal mast cells (MC) are part of the DC neighborhood and their mediators have been recently identified as a new class of highly effective vaccine adjuvants. Histamine is a preformed mediator rapidly released by allergen-activated mast cells (MC). This key mediator of allergic reactions has been reported to promote the maturation and migration of DCs to secondary lymphoid organs. Here we show that histamine, together with a maturation signal, acts directly upon human DCs, inhibiting GILZ expression and their Treg polarizing capacity. We also report that culture-supernatants collected after MCs activation through their high affinity receptor of IgE negatively regulate GILZ expression in DCs and their capacity to polarize T CD4⁺ towards a Tr1 phenotype.

Histamine modulates GILZ expression through the activation of the ERK signaling pathway leading to the phosphorylation of Foxo3. Phosphorylation of Foxo3 promotes its cytoplasmic exclusion and inhibits its participation in the full activation of GILZ promoter.

We propose that allergen-activated MC by releasing mediators among them histamine contribute to the unsuited allergic immune response by down-regulating GILZ expression in DCs thus polarizing DC towards immunogenic phenotype.

Introduction

Antigen presentation by dendritic cells (DC) leads to either immune stimulation or tolerance. The mechanisms underlying the decision of DC to orientate the immune response towards one of these two opposite outcomes are not fully understood (1-3). Tolerance-inducing DC are also called regulatory DC (regDC). One method used by regDC to prevent immune activation is to trigger T lymphocyte anergy or apoptosis during antigen presentation. This involves production of the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and of nitric oxide by DC. The other method is to generate regulatory cells, including regulatory T lymphocytes (Treg). Although IDO production by DC may play a role in the induction of Treg, additional mechanisms are presumably involved. The state of maturation and activation of DC is critical to Treg development: DC activated and maturing in response to inflammatory stimuli trigger immune responses, but immature or “semi-mature” DC, in contrast, induce tolerance, and this is in part mediated by the generation of Treg. Phenotypically mature DC can also be tolerogenic, and certain environmental signals can induce maturation of DC in a tolerogenic mode (4). IL-10, TGF β , glucocorticoids (GC), vasoactive intestinal peptide, vitamin D3 and anti-oxidative vitamins, used alone or in combination, orientate DC maturation to induce tolerance, and Treg development has been demonstrated for several of these agents (5-10).

IL-10, TGF β and glucocorticoids (GC) are potent inducers of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expression in DCs (11). Their immunosuppressive effects on DCs are mediated by GILZ (2). We previously demonstrated that this intracellular protein GILZ polarize DCs towards a regulatory phenotype (2). High levels of GILZ in DCs lead to a decreased expression of co-stimulatory molecules such as CD80, CD86 and CD83, while expression of co-inhibitory molecules (immunoglobulin like transcript 3 : ILT3, programmed death ligand 1 : PD-L1) and IL-10 secretion are increased (11). Antigen presentation by GILZ-expressing DCs generates CD25^{high}Foxp3⁺CTLA4/CD152⁺ and IL-10 producing Tregs

inhibiting the response of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. This suppression is antigen specific, as induced Tregs inhibit only the response of cells stimulated with the same antigen than that presented by GILZ-expressing DC (2). Down-regulation of GILZ expression requires to develop effective immune response should be under the control of pro-inflammatory factors or danger signals like those induced through pathogen recognizing receptors. In an attempt to identify factors inhibiting GILZ expression, we already tested the effect of CD40L, IFN- γ , TNF- α and IL-1 β , and observed that none agent was efficient to negatively regulate GILZ synthesis in DCs (unpublished data).

In mucosal immature DCs are located in the vicinity of mast cells a source of histamine. Therefore, histamine may effectively influence the immune system through DCs (12). Many studies in human and experimental murin models have shown that histamine induces DC maturation and activation (13). Data show that histamine acting on DCs drives T helper-2 cell polarization both in human and mouse through H1 and H4 receptors (14). It can also drive migration of human DCs, which is primarily mediated by H4 receptor with some contribution attributed to H1 receptor (15). Histamine that has well defined role in allergy, can also exert antitumor effects by promoting the differentiation of myeloid cells CD11c⁺ LY6G⁺ (16-18).

Taken together these findings, it appears that histamine exerts major regulatory functions affecting the immune responses. Therefore we sought to investigate whether histamine exerts its immunostimulatory effects by down-regulating GILZ expression in DCs and thus their Treg polarizing capacities.

Material and Methods

MC differentiation and activation

Highly purified cord-blood-derived MCs were obtained by long-term cultures of human umbilical cord blood progenitor cells as previously described (19). Mouse anti-chymase monoclonal antibody (mAb) (Millipore, Molsheim, France) and mouse anti-tryptase (Chemicon International Incorporation, Temecula, California, USA) were used to analyse the mature phenotype of MCs (supplemental Figure 1C-1E). At the end of culture, more than 98% of differentiated cells were mature MCs. Cord blood MCs (1×10^6 cells/ml) were incubated for 4 days at 37°C with human myeloma IgE (2,5µg/ml) and IL-4 (20 ng/ml). Then cells were harvested and washed in complete Iscove's Modified Dulbecco's medium, and incubated with 1µg/ml goat anti-human IgE (Vector Laboratories, Biovalley, Marne la Vallée, France) for 30 minutes or 24h. Some cells were treated with human myeloma IgE alone to control basal secretion of mediators. MCs incubated with IgE (2,5µg/ml) and goat anti-human IgG (1 µg/ml) served as controls for the cross-linking. The supernatants were collected by means of centrifugation and frozen at -20°C until use. Histamine levels were determined by using a specific immunoassay kit (Immunotech, Lumigny, France).

Cell purifications and DC generation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from healthy donors (Etablissement français du sang, Rungis, France) by standard density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Science AB). To obtain monocytes-derived dendritic cells (Mo-DCs), monocytes were purified from PBMCs by positive selection using the human CD14 Microbeads Kit (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) and the autoMACS Separator according to the manufacturer's instructions. Purified monocytes comprised more than 98% of CD14⁺ cells. Monocytes were plated in culture flasks at 1×10^6 cell in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 10% human AB serum (ABCYS, Paris, France), IL-4 (50 ng/mL; ABCYS, Paris, France) and GM-CSF (50 ng/ml; ABCYS,

Paris, France). At day 6, cells were analyzed by FACS. More than 98% of cells expressed the myeloïd marker CD11c and lacked the monocyte marker CD14. Among them more than 90% of cells expressed HLA-DR. Negative selection CD4⁺ T lymphocytes Kit was used for CD4⁺ T cell purification (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany). Purified CD4⁺ T cells comprised more than 96% of CD3⁺ CD4⁺ T cells. CD4⁺ T lymphocytes and PBMC were kept frozen at -80°C until used. Mo-DCs were incubated with Dexamethasone (10^{-7} M; Sigma, St Quentin Fallavier France) overnight with histamine (10^{-7} M; a kind gift from Michel Dy) or with culture-supernatants (diluted at 1/100) from mast cells activated 30 min (S1) and 24 hours (S2) through FcεRI. To evaluate GILZ expression in immature and LPS-matured Mo-DCs, lipopolysaccharide from E.Coli 055:B5 (LPS; Sigma, St Quentin Fallavier France) was added or not at 1 μg/ml during incubation time.

In DC/CD4⁺ T cells co-cultured experiments Mo-DCs, cells were first stimulated overnight with Dex and others factors then pulsed with PPD (2 μg/ml; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) for 2 hours. LPS was added for additionnal 2 hours to provide maturation signals.

Gene transfer experiments used the control vector pcDNA3 (pCTRL) and the GILZ-encoding vector (pGILZ), which were introduced to Mo-DCs by nucleofection as described by the kit manufacturer (Lonza, Basel, Switzerland). Nucleofection efficiency, assessed using a green fluorescent protein (GFP)-reporter, was tested by flow cytometry 24 hours later: 50% of cells were GFP positive.

To study signalling pathways activated in Mo-DCs, cells were incubated for 30 min at 37°C with LY294002 (20 μM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), SB 203500 (20 μM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), PD (50 μM, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or DMSO after a short-pre-treatment (1hour) with LPS (100 ng/ml). Cells were then cultured with Dex (10^{-7} M) and histamine (10^{-7} M) for 1 hour at 37°C.

Functionnal studies of Treg function

Mo-DCs ($2,5 \times 10^4$) were co-cultured for 7 days with 10^5 autologous CD4⁺ T lymphocytes labeled with 2,5 μ M CFSE (5-(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) according to the manufacturer's instructions (Vybrant kit; Molecular Probes, Eugene, OR). At the end of the co-culture, cells were assessed by flow cytometry for Treg markers (CD25^{high}, IL-10⁺, FOXP3⁺) among proliferating cells (CFSE low). In other experiments, Mo-DCs ($2,5 \times 10^4$) were co-cultured for 7 days with 10^5 autologous non-labelled CD4⁺ T lymphocytes. At the end of the co-culture, CD4⁺ T lymphocytes were purified, irradiated (16 Gy) and added with PPD (1 μ g/ml) to 10^5 autologous PBMCs labeled with 2,5 μ M CFSE. After 7 days, CFSE dilution in CD4⁺ responders was evaluated by flow cytometry. Irradiated CD4⁺ T lymphocytes did not proliferate in the co-culture with PBMCs, and less than 2% of CD4⁺ responders proliferated in the absence of antigen addition.

Western blot analysis

Cells lysates (250 μ g) were separated by 6-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-ECL; Amersham Pharmacia Biotech Europe). The protein were probed with anti-GILZ antibody (1/500; Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), anti-p-AKT (1/1000; Cell Signaling, Danvers), anti-p-ERK^{1/2} (1/1000, Cell Signaling), anti-phospho-Serine 294 Foxo3 (1/1000; Cell Signaling) and anti-phospho-Threonine 24 Foxo3 (1/1000; Cell Signaling). Blots were reprobed with an antibody to total AKT (1/200; Santa Cruz Biotechnology, Tebu), ERK^{1/2} (1/1000; Cell Signaling), Foxo3 (1/1000; Cell Signaling), p38 (1/500; Santa Cruz Biotechnology, Tebu). Primary antibodies were visualized with appropriate peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-goat IgG used at 1/5000 dilution (Santa-Cruz Biotechnologies,

Tebu). Immunoreactivity was detected using chemiluminescence kit according to the instructions of the manufacturer (Pierce). Membranes were developed by using the ECL system. Densitometric analysis was performed using the ScanAnalysis software (Biosoft, Cambridge, United Kingdom).

Antibodies and flow cytometry

The following mAbs coupled with fluorescein-isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), or phycoerythrin-cyanin-5 (PE-Cy5) were used in this study : anti-CD3^{PE}, anti-CD4^{PC5}, anti-CD11c^{PE}, anti-CD14^{APC}, anti-HLA-DR^{PC5} (BD Biosciences, San Diego, California, USA), anti-IL10^{PE} (R&D systems, Lille, France), anti-FOXP3^{PE} (clone PCH101 ; e-Biosciences, Montrouge, France). Negative controls were irrelevant isotype-matched mAbs. For combined detection of membrane and intracellular antigens, cell surface was performed first. Then intracellular staining was performed with a cytofix/cytoperm Kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions for IL-10 staining and with a Foxp3 fixation/permeabilization concentrate and diluent (e-Biosciences) according to the manufacturer's instructions for Foxp3 staining. The data presented are gated for viable cells using light scatter. At least 10⁴ events were acquired by flow cytometry (FACS Calibur ; Becton Dickinson, Rungis, France) and analyzed using Cell Quest software (Becton Dickinson).

Measurement of transcriptionnel activity using Dual-Luciferase Reporter assay

Mo-DCs were transiently co-transfected by nucleofection using lonza Kit with 10µg of Firefly luciferase reporter plasmid (p-1940) and 0,1 µg of Renilla luciferase reporter plasmid (pCMV-Renilla) used as an internal control for normalization. After 1 hour of rest, co-transfected cells were pre-treated for 1h with LPS (100ng/ml) then stimulated or not with DEX (10⁻⁷ M) or histamine (10⁻⁷ M) overnight. Protein extracts were prepared using the

Passive lysis buffer provided in the Dual-luciferase assay (Promega). Equal amounts of protein extracts were plated into a 96 wells plate. Firefly luciferase activity was measured for 12 seconds using the Micolumat Plus LB 96V luminometer (Berthold Technologies, Thoiry, France). To assess the internal standard activity, Stop and Glo reagent was added and the peak of the Renilla luciferase activity was then measured. Relative Luciferase Units (RLU) were normalized as follow : Firefly luciferase units of protein extracts of treated or untreated cells / Renilla lucifera units of protein extracts of untreated cells.

Quantitative Real-time RT-PCR

Total RNA from Mo-DCs was extracted by using Trizol reagent (Invitrogen) and treated with DNase (Roche Diagnostics, Meylan, France) to remove any genomic DNA contamination. cDNA was prepared with Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The resulting cDNA was amplified by quantitative real-time PCR on a light cycler instrument (Roche Diagnostics), with the FastStart DNA Master SYBER Green Kit (Roche Diagnostics), and carried out an absolute quantification. GILZ was amplified using the following primers (Forward: 5'-TCTGCTTGGAGGGGATGTGG-3' and Reverse: 5'-ACTTGTGGGGATTCGGGAGC-3'). β -actin was also amplified to serve as normalization control (Forward: 5'-TTCCTACTCCCCCTGCTCAT-3' and Reverse: 5'-CCTGTATGGGAAATGCCTGG-3').

Elisa assays

Production of IL-10 was assessed using commercially available enzyme-linked immunoabsorbent (ELISA) kit (Diaclone, Besançon, France).

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm sem. Unless specified, the t-test was used to analyse results. The non-parametric Wilcoxon test was used to analyse some experiments. A $p < 0,05$ was considered as significant.

Results

Histamine down-regulates GILZ expression in human DCs.

To characterize the ability of histamine to perpetuate through DC activation enhanced immune responses, we first examined its capacity to negatively regulate GILZ expression in human DCs. We used DCs derived from human monocytes (Mo-DCs). Human monocytes freshly isolated from peripheral blood expressed high levels of GILZ (11) which are progressively diminished upon culture conditions with IL-4 and GM-CSF to become negative in fully differentiated Mo-DCs (11). Mo-DCs were incubated with dexamethasone (Dex, a synthetic glucocorticoid) to restore GILZ expression. Effects of histamine were tested on Dex-induced GILZ expression both in immature (iMo-DCs) and LPS-matured Mo-DCs (m-Mo-DCs). Western blot analysis revealed that histamine reduced Dex-induced GILZ expression in human m-Mo-DCs in a dose-dependent with optimal and statistically significant effects observed at 10^{-7} M (Figure 1A and 1B). Histamine had no effect on GILZ expression in iMo-DCs (data not shown). We verified that down-regulation of GILZ expression observed in m-Mo-DCs was not due to the presence of maturation signals delivered by LPS. Levels of GILZ analyzed by quantitative real time RT-PCR were similar between Dex-treated iMo-DCs and Dex-treated m-Mo-DCs after 18h, 24h, 48h, and 72h of culture (data not shown).

In order to verify that histamine was able to modulate GILZ expression induced by another physiological immunosuppressive agent, m-Mo-DCs were treated with IL-10 instead of Dex in the presence or not of histamine. We then confirmed an inhibitory effect of histamine on IL-10-induced GILZ expression (Figure 1C).

Data indicated that histamine a major mediator in allergic responses is a potent inhibitor of GILZ expression in m-Mo-DCs.

Histamine impairs m-Mo-DCs capacities to polarize CD4⁺ T cells towards a regulatory phenotype.

We next verified if under-expression of GILZ mediated by histamine was characterized by impairment of m-Mo-DCs to generate T cells with regulatory phenotype. DCs treated overnight with Dex in association with histamine or not were loaded with the recall antigen PPD for 2 hours then LPS was added to the cultures for additional 2 hours. We confirmed with this stimulation procedure, a reduced expression of GILZ mRNA in m-Mo-DCs in contact with histamine (data not shown). After washing steps, PPD-pulsed m-Mo-DCs were used to stimulate autologous CFSE-labeled CD4⁺ T cells. CFSE-labeling is used to discriminate antigen-specific T lymphocytes (identified as proliferating CFSE^{low} cells) from non-specific T cells (non-proliferating CFSE^{high} cells). After 7 days of coculture, the expression of Treg markers by proliferating CFSE^{low} CD4⁺ T cells was analyzed. We previously demonstrated that m-Mo-DCs with Dex-induced GILZ expression present recall antigen to memory CD4⁺ T lymphocytes and polarize them towards a regulatory phenotype characterized by expression of CD25^{high} and Foxp3 and the secretion of IL-10.

As expected, fraction of CD25^{high}Foxp3⁺ (Figure 2A) and CD25^{high}IL10⁺ cells (Figure 2B) among proliferating CD4⁺ T cells were lower when PPD was presented by m-Mo-DCs treated with Dex plus histamine compared to results obtained with Dex-treated m-Mo-DCs.

We have previously demonstrated that induction of Treg by GILZ-expressing DCs was dependent on the production of IL-10 (2). In support of this, we found a significant diminution of IL-10 in cultures containing m-Mo-DCs m-Mo-DCs treated with Dex and histamine (Figure 2C).

Histamine abrogates DC capacities to activate T cells with immunosuppressive functions

We next studied the suppressive functions of CD4⁺ T lymphocytes stimulated by

differentially treated-DCs. m-Mo-DCs loaded with PPD after overnight treatment with Dex in the presence or absence of histamine were used to activate autologous non-labeled CD4⁺ T cells for 7 days. T cells were then purified, irradiated and added to CFSE-labeled autologous PBMC stimulated with PPD. Proliferation of CD4 responders (CFSE^{low}) among PBMC was assessed in this second co-culture. CD4⁺ T cells primed with Dex-treated DCs exhibited suppressive functions whereas CD4⁺ T cells primed with Dex+histamine-treated DCs did not inhibit the proliferation of PBMC in response to PPD (Figure 3A).

These data confirmed that the decrease in GILZ expression by histamine is associated with impaired ability of m-Mo-DCs to generate CD4⁺ T lymphocytes with functional properties of Tregs.

Histamine fails to induce immunogenic phenotype in GILZ-transfected DCs.

To determine whether the adjuvant effects of histamine on DCs was mediated by the reduction in GILZ expression, DCs were nucleofected with a control vector (pCTRL) or the GILZ encoding vector (pGILZ) and treated or not with histamine overnight. m-Mo-DCs were then pulsed with PPD and used to activate autologous CD4⁺ T cells. CD4⁺ T cells were purified at the end of DC/CD4⁺ T cell co-cultures, irradiated, and added to CFSE-labeled autologous PBMC stimulated with PPD. Proliferation of CD4 responders among PBMC was then assessed by flow cytometry.

We confirmed by quantitative real-time RT-PCR that the nucleofection of m-Mo-DCs with pGILZ induced extremely high levels of GILZ compared to using pCTRL (data not shown). CD4⁺ T cells primed with PPD-loaded DC^{pGILZ} treated or not with histamine inhibited the proliferation of lymphocytes to the recall antigen PPD (Figure 3B).

These data demonstrated that histamine polarized DCs from a regulatory phenotype towards an immunogenic phenotype by negatively regulating GILZ expression.

Mediators released by IgE-activated MCs negatively regulate GILZ expression in DCs thus promoting their immunogenic properties

We then tested whether mediators produced by IgE-activated MCs modulate GILZ expression in m-Mo-DCs. To reproduce MC activation, human MCs derived from cord-blood progenitors were first incubated 4 days with IL-4 and IgE to induce over-expression of FcεRI (Supplemental Figure 1A and 1B). Dimerisation of FcεRI was then obtained by incubating MCs with monoclonal antibody (mAb) directed against human IgE. MCs thus activated through FcεRI released histamine within minutes and secreted within hours of activation lipid-derived mediators such as leukotriene B4 (LTB4), cytokines including TNFα and IL-10 and chemokines (Supplemental Table 1).

The impacts of MC-mediators were first tested on Dex-induced GILZ expression in both iMo-DCs and m-Mo-DCs. Western-blot analysis confirmed that treatment of m-Mo-DCs with MC-supernatants collected 30 min (s1) and 24 hours (s2) after FcεRI engagement reduced Dex-induced expression of GILZ (Figure 4A). The mediators of MCs did not modulate the expression of GILZ in iMo-DCs (densitometric analysis of immunoblot, ratio GILZ/p38: medium: 0.12 UA ± 0.09 UA; Dex: 0.39 UA ± 0.15 UA; Dex+s1: 0.25 UA ± 0.10 UA; Dex+sn24hrs: 0.43 UA ± 0.26 UA; n=2). To verify that the decrease in GILZ expression was the result of MC activation and release of mediators through FcεRI, m-Mo-DCs were treated with control MC-supernatants collected after IgE incubation and before addition of anti-IgE mAb (ratio GILZ/βactin: medium: 0.13 UA ± 0.07 UA; Dex: 1.04 UA ± 0.05 UA; Dex+ctrl sn: 0.88 UA ± 0.31 UA; means ± sem, n=3) or collected after IgE incubation and addition of control IgG (data not shown). In both cases, control MC-supernatants have no regulatory effects on GILZ expression in DCs. We also ensure that the decreased expression of GILZ was not due to a direct binding of free anti-IgE present in the supernatants on the Fcγ

receptors expressed by DCs (supplemental Figure 2). Among the mediators released by IgE-activated MCs, we identified the LTB₄ as an inhibitor of GILZ expression (supplemental Figure 3).

We then assessed whether MC-mediators influence the capacity of m-Mo-DCs to generate regulatory T cells by using autologous DC/CD4⁺ T cell co-cultures. Fractions of CD25^{high} Foxp3⁺ and CD25^{high} IL-10⁺ T lymphocytes induced in response to PPD were significantly lower when antigen was presented by m-Mo-DCs treated with Dex plus MC-supernatants compared to Dex-treated m-Mo-DCs (Figure 4B and 4C). This result was consistent with the decrease in IL-10 secretion detected in co-culture supernatants when m-Mo-DCs pre-stimulated with Dex plus MC-supernatants were used to activate CD4⁺ T cells (Figure 4D). As expected CD4⁺ T cells primed by these m-Mo-DCs failed to display suppressive functions compared to lymphocytes activated by Dex-treated DCs (Figure 4E).

Collectively, these data demonstrated that down-regulation of GILZ expression in DCs by MC mediators including histamine and LTB₄ results in impairment of Treg expansion.

Histamine regulates the expression of GILZ through ERK signaling pathway.

It was previously demonstrated that the binding of Foxo3 (a transcription factor) to forkhead responsive elements (FHRE) on the promoter of GILZ is required for the full GCs-induced GILZ expression. It was also reported that Foxo3 phosphorylation causes its relocation of the nucleus in the cytoplasm and regulates its transcriptional activity (20). PI3K/AKT and the MAPK (P38, ERK) pathways are known to phosphorylate Foxo3 (21-27).

In order to clarify the signaling pathways involved in the control of GILZ expression by histamine, we first used specific inhibitors of the PI3K/AKT and the MAPK pathways. Histamine was still able to down-regulate GILZ expression in m-Mo-DCs in the presence of LY 294002 (inhibitor of PI3K/AKT pathway) and SB 203500 (inhibitor of p38 pathway) as

the ratio of GILZ expression in Dex-treated m-Mo-DCs / DEX+histamine-treated m-Mo-DCs was greater than 2 in the presence of both inhibitors (Figure 5A). PD 98059 (inhibitor of ERK^{1/2} pathway) blocked the down-regulation of GILZ expression by histamine (ratio of GILZ expression in Dex-treated m-Mo-DCs / Dex+histamine-treated m-Mo-DCs <1 in the presence of PD 98059 ; Figure 5A).

This results suggested that histamine interferes with the ERK^{1/2} signaling pathway to down-regulate GILZ expression in DCs.

Histamine by signalling through the ERK^{1/2} signaling pathway enhances Foxo3 phosphorylation at Serine 294.

To confirm data obtained using signaling pathway inhibitors, we investigated the phosphorylation of ERK^{1/2} and Foxo3 proteins. We studied two sites of phosphorylation for Foxo3, one located on Serine 294 (known to be phosphorylated by the ERK^{1/2} pathway, our target of interest) the other located on Threonine 24 which is known to be a downstream target of PI3K/AKT pathway (our negative control) (22, 25, 27).

Histamine clearly enhanced ERK^{1/2} phosphorylation in Dex-treated m-Mo-DCs (Figure 5B). This increase in the ERK^{1/2} phosphorylation was completely abrogated in the presence of PD 98059. As a result of ERK^{1/2} phosphorylation, histamine also increased phosphorylation of Foxo3 on Serine 294 but not on Threonine 24, as expected (Figure 5B). The enhancement of Foxo3^{Ser294} phosphorylation observed in Dex+histamine-treated DCs compared with Dex-treated DCs was abolished by the specific inhibitor of ERK^{1/2} pathways (Figure 5B).

These data demonstrated that histamine by activating ERK^{1/2} signaling pathway induces Foxo3 phosphorylation on Serine 294 and thus should lead to its cytoplasmic localization.

Histamine by signaling through the ERK^{1/2} pathway regulates the activity of the promoter of GILZ.

The increase in phosphorylation of Foxo3^{Ser294} monitored by histamine should result in a reduction of its transcriptional activity and in our study by a decreased activity of the promoter of GILZ. To address this issue the GILZ promoter (genomic DNA corresponding to the region between -1940 and +19) was subcloned into pGL3 luciferase reporter vector (p-1940). The luciferase activity was then measured in extracts of m-Mo-DCs transfected with the p-1940 and treated with Dex in the presence or not of histamine. As shown in Figure 6, histamine totally inhibited Dex-induced luciferase activity of the p-1940 construct.

These data indirectly suggested that histamine negatively controls the synthesis of GILZ in human DCs by activating the ERK^{1/2} signaling pathway and thus contributes to the inhibition of the transcriptional activity of Foxo3, a transcription factor known to regulate the expression of GILZ.

Discussion

Expression of GILZ in DCs polarizes them from an immunogenic to a tolerogenic phenotype. DCs with high levels of GILZ activate antigen-specific Tregs. Conversely, DCs with under-expression of GILZ induce effector T cells (2). We already identified immunosuppressive factors (glucocorticoids, IL-10 and TGF- β) as potent inducers of GILZ expression (28). Identifying factors that negatively regulate GILZ expression in DCs is important to better understand the role of GILZ in the function of DCs and thus the mechanisms involved in the induction of regulatory- or immunogenic-DCs. We report here for the first time that MC mediators among them histamine and LTB₄ together with a maturation signal downregulate GILZ expression in human DCs and their ability to activate regulatory T cells. Effects of histamine were observed at physiological dose reaches in vivo after MC activation such as in acute allergic reactions. Thereby, histamine promotes immunogenic functions of DCs. DCs overexpressing GILZ treated with histamine or culture-supernatants from IgE-activated MCs, when presenting an antigen to CD4⁺ T lymphocytes generate lesser proliferating cell with the expression of Treg markers CD25^{high}Foxp3⁺IL-10⁺. In addition, these CD4⁺ T lymphocytes stimulated by histamine- or MC-supernatants-treated DCs failed to display suppressive functions when tested on antigen-specific T cell response assays. Previous studies reported that histamine induces maturation of DCs towards an effector DC2 phenotype, leading to the polarization of naïve T cells to Th2 cells (14, 29). Furthermore, histamine derived from IgE- and antigen-stimulated skin mast cells promotes the migration of Langerhans cells to draining lymph nodes. Thus there is evidence that at least in some circumstances, MCs can influence the functions of DC (30). A complementary study demonstrated that mediators of MCs can be considered as a new class of adjuvants targeting DCs (31). A subcutaneous or nasal administration of chemical activators of MCs with antigen evokes a potent protective antigen-specific immune responses by inducing enhanced mobilization of DCs to draining lymph

nodes (31). Chemical MC activators did not induce optimal immune responses in MC-deficient mice (31). Our results suggest that the adjuvant effects of histamine and MC mediators are not limited to the control of DC migration and maturation toward secondary lymphoid organs but also polarize DC from tolerogenic towards immunogenic phenotype.

In the context of allergic-reactions, MC mediators including histamine and LTB₄, secreted after FcεRI engagement could down-regulate GILZ expression in DC and promote their ability to present antigen in an immunogenic way leading to induction of allergen-specific Th2 cells. This indicates that histamine released during allergic reactions affects the balance between Tregs and Th2 lymphocytes. This result could offer a possible explanation of the role of MC-mediators including histamine and LTB₄ in the maintenance of allergic diseases.

In a context of anti-tumoral immune responses, it was previously reported that the overexpression of GILZ in tumor infiltrating cells was associated with the failure of the immune system to reject the tumor (28). Recently, it has been shown in a murine model that GILZ is highly up-regulated in DCs in the tumor microenvironment and that blockade of GILZ in antigen-presenting DCs significantly prolonged survival of mice with a preexisting tolerogenic tumor (32). We could speculate that the down-regulation of GILZ expression in DCs by histamine also explain the anti-tumor effects of histamine described in the literature (16, 17).

It was reported that Foxo3 and GC-receptors synergized to induce maximal GILZ expression (20), so we investigated whether histamine could regulate Dex-induced GILZ promoter transactivation through the inhibition of Foxo3 activity. Our results show that histamine increase the phosphorylation of ERK1/2 and consequently the phosphorylation of Foxo3 on Serine 294. This event leads to Foxo3 cytoplasmic localization, prevents its fixation on the FHRE of GILZ promoter and downregulate Dex-induced GILZ expression (20). The receptor of histamine implied in this process is being identified.

This study reveals that histamine is able to tune the fine balance between immunity and tolerance by negatively regulating GILZ expression in DCs. Our results offer an explanation for the role of histamine in the perpetuation of allergic reactions. Identification of the adjuvant properties of histamine and MCs products will help to optimize vaccine-induced immune responses which could be benefic in the treatment of cancer and vaccine-induced tolerant responses in the case of allergic and auto-immune diseases.

References

1. Belkaid, Y., and Oldenhove, G. 2008. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29:362-371.
2. Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M.C., Prejean, M.V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F.M., Zou, W., and Emilie, D. 2007. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110:211-219.
3. Morelli, A.E., and Thomson, A.W. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* 7:610-621.
4. Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology* 6:476-483.
5. Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology* 2:725-731.
6. Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., Greenfield, E.A., Chang, T.T., Sharpe, A.H., Berry, G., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 8:1024-1032.
7. Banerjee, D.K., Dhodapkar, M.V., Matayeva, E., Steinman, R.M., and Dhodapkar, K.M. 2006. Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108:2655-2661.

8. Martin, E., O'Sullivan, B., Low, P., and Thomas, R. 2003. Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 18:155-167.
9. Tan, P.H., Sagoo, P., Chan, C., Yates, J.B., Campbell, J., Beutelspacher, S.C., Foxwell, B.M., Lombardi, G., and George, A.J. 2005. Inhibition of NF-kappa B and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells. *Journal of immunology* 174:7633-7644.
10. Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F.M., Foxwell, B.M., and Feldmann, M. 2001. Role of NFkappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. *European journal of immunology* 31:1883-1893.
11. Cohen, N., Mouly, E., Hamdi, H., Maillot, M.C., Pallardy, M., Godot, V., Capel, F., Balian, A., Naveau, S., Galanaud, P., et al. 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 107:2037-2044.
12. Jutel, M., Akdis, M., and Akdis, C.A. 2009. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 39:1786-1800.
13. Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Herbault, N., Magistrelli, G., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J., and Jeannin, P. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *Journal of immunology* 166:6000-6006.
14. Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J., and Jeannin, P. 2001. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *Journal of immunology* 167:3682-3686.
15. Gutzmer, R., Diestel, C., Mommert, S., Kother, B., Stark, H., Wittmann, M., and Werfel, T. 2005. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology* 174:5224-5232.
16. Hellstrand, K., Brune, M., Dahlgren, C., Hansson, M., Hermodsson, S., Lindner, P., Mellqvist, U.H., and Naredi, P. 2000. Alleviating oxidative stress in cancer immunotherapy: a role for histamine? *Medical oncology* 17:258-269.

17. Johansson, M., Henriksson, R., Bergenheim, A.T., and Koskinen, L.O. 2000. Interleukin-2 and histamine in combination inhibit tumour growth and angiogenesis in malignant glioma. *British journal of cancer* 83:826-832.
18. Yang, X.D., Ai, W., Asfaha, S., Bhagat, G., Friedman, R.A., Jin, G., Park, H., Shykind, B., Diacovo, T.G., Falus, A., et al. 2011. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+Ly6G+ immature myeloid cells. *Nature medicine* 17:87-95.
19. Godot, V., Garcia, G., Capel, F., Arock, M., Durand-Gasselien, I., Asselin-Labat, M.L., Emilie, D., and Humbert, M. 2006. Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* 61:886-890.
20. Asselin-Labat, M.L., Biola-Vidamment, A., Kerbrat, S., Lombes, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. 2005. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Molecular endocrinology* 19:1752-1764.
21. Roy, S.K., Srivastava, R.K., and Shankar, S. 2010. Inhibition of PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways causes activation of FOXO transcription factor, leading to cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer. *Journal of molecular signaling* 5:10.
22. Yang, J.Y., Zong, C.S., Xia, W., Yamaguchi, H., Ding, Q., Xie, X., Lang, J.Y., Lai, C.C., Chang, C.J., Huang, W.C., et al. 2008. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature cell biology* 10:138-148.
23. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
24. Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J.V., Dalal, S.N., DeCaprio, J.A., Greenberg, M.E., and Yaffe, M.B. 2002. 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology* 156:817-828.
25. Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A., and Greenberg, M.E. 2001. Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Molecular and cellular biology* 21:952-965.

26. Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L., and Burgering, B.M. 1999. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398:630-634.
27. Salih, D.A., and Brunet, A. 2008. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current opinion in cell biology* 20:126-136.
28. Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M.C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., et al. 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101:729-738.
29. Mazzone, A., Young, H.A., Spitzer, J.H., Visintin, A., and Segal, D.M. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *The Journal of clinical investigation* 108:1865-1873.
30. Jawdat, D.M., Albert, E.J., Rowden, G., Haidl, I.D., and Marshall, J.S. 2004. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *Journal of immunology* 173:5275-5282.
31. McLachlan, J.B., Shelburne, C.P., Hart, J.P., Pizzo, S.V., Goyal, R., Brooking-Dixon, R., Staats, H.F., and Abraham, S.N. 2008. Mast cell activators: a new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nature medicine* 14:536-541.
32. Lebson, L., Wang, T., Jiang, Q., and Whartenby, K.A. 2011. Induction of the glucocorticoid-induced leucine zipper gene limits the efficacy of dendritic cell vaccines. *Cancer gene therapy* 18:563-570.

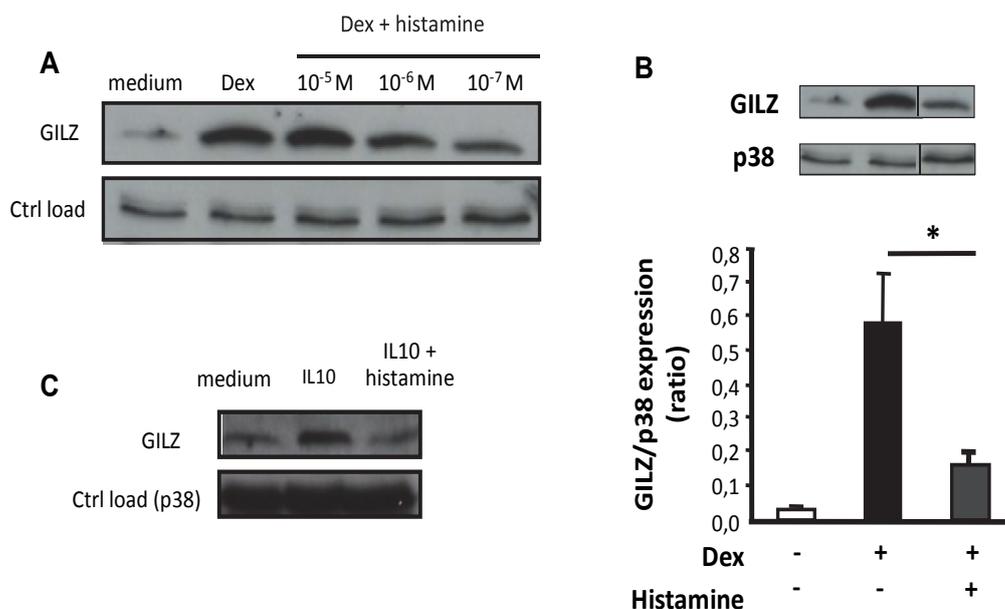


Figure 1: Histamine down-regulates GILZ gene expression in human mature Mo-DCs.

Immunoblot analysis of GILZ expression in human Mo-DCs matured by LPS derived from *E. coli*. Cells were incubated overnight with Dex alone (10⁻⁷M) or in association with histamine at decreasing doses (A) or at 10⁻⁷M (B). LPS (1µg/mL) was added together with other stimulants and in all culture conditions. Mo-DCs cultured with LPS alone served as control. Expression of GILZ was analysed at the end of culture period by western-blot.

(A) Data are representative of two independent experiments. (B) The ratio of GILZ expression (upper blot) over control load (p38) expression (lower blot) is plotted. Data (mean ± sem) are from seven independent experiments. *p<0.05.

(C) LPS-matured Mo-DCs were incubated with IL-10 (100 ng/mL) and treated or not with histamine (10⁻⁷M). After 18h of incubation, GILZ expression was determined by immunoblot analysis. Data are representative of two independent experiments.

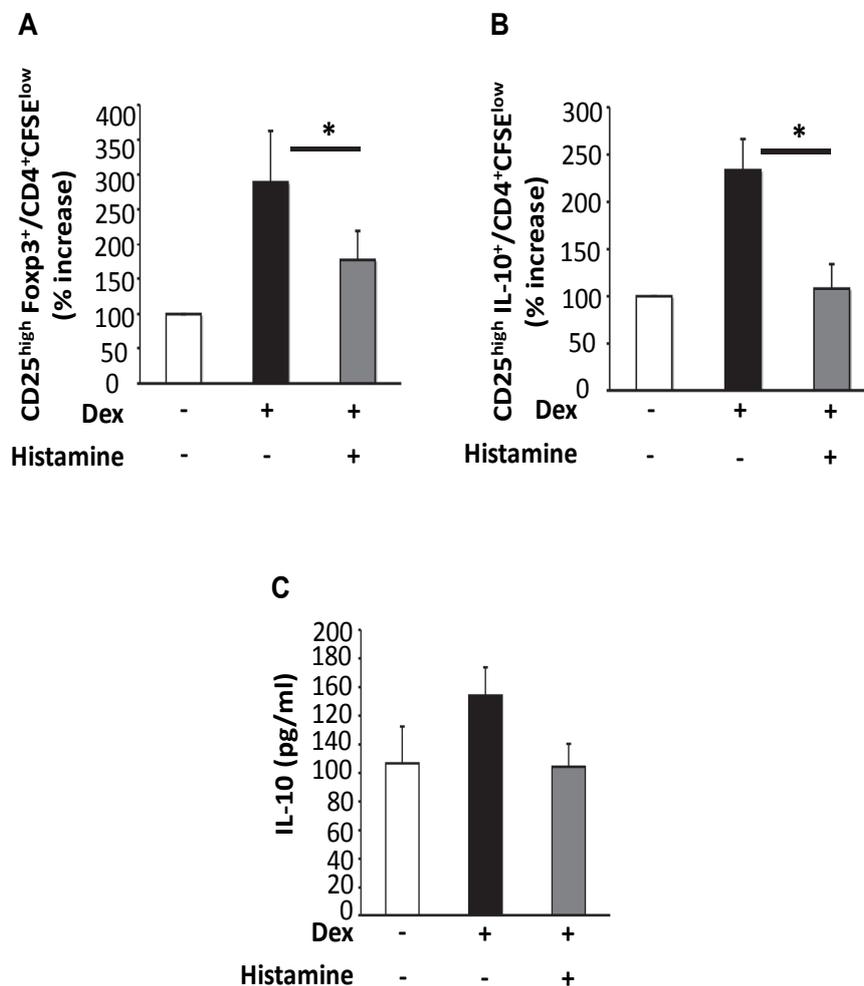


Figure 2: Histamine alters the capacity of DCs to polarize CD4⁺ T cells towards a regulatory phenotype

(A-C) m-Mo-DCs (2.5×10^4) treated or not overnight with Dex (10^{-7} M) alone or in association with histamine (10^{-7} M) were loaded with recall antigen (PPD) 4h and used to stimulate 1.0×10^5 CFSE-labeled autologous CD4⁺ T lymphocytes. After 7 days, expression of regulatory markers were analysed on proliferating CFSE^{low} CD4⁺ T cells (A-B) and IL-10 secretion in culture supernatants (C).

(A) Fraction of CD25^{high} Foxp3⁺ T cells and CD25^{high} secreting-IL-10 T cells (B) in DC/CD4⁺ co-cultures. Results are expressed as percentage increase of T cells with regulatory phenotype in co-cultures realized with treated-m-Mo-DCs compared to those obtained with control untreated-m-Mo-DCs. (C) IL-10 production in culture supernatants determined by Elisa.

Data (mean \pm sem) are from five (A-B) or four (C) independent experiments. * $p < 0.05$ using one-tailed-Wilcoxon test.

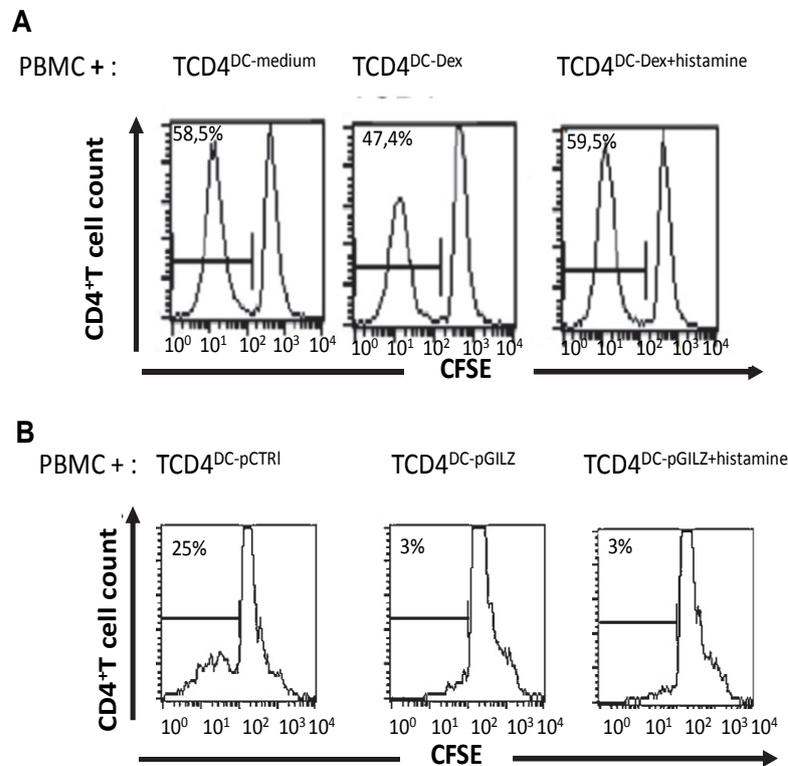


Figure 3: Histamine alters the capacity of DCs to generate CD4⁺ T cells with immunosuppressive functions by negatively regulate GILZ expression

(A) m-Mo-DCs treated overnight with Dex (10^{-7} M) in association or not with histamine (10^{-7} M) were pulsed with PPD 4 hours and used to activate autologous CD4⁺ T cells. Non labeled-CD4⁺ T cells were recovered after 7 days of culture, irradiated and added at 2.5×10^4 to CFSE-labeled autologous PBMC (10^5) stimulated with PPD ($1 \mu\text{g/mL}$). Proliferation of CD4 responders among PBMC was assessed by flow cytometry. Similar results were obtained in three separate experiments. Percentages represent the fraction of CD4 responders (with low expression of CFSE) among PBMC.

(B) m-Mo-DCs were nucleofected with a control vector (pCTRL) or the GILZ encoding vector (pGILZ). m-Mo-DCs nucleofected with pGILZ (DCs^{pGILZ}) were treated or not with histamine (10^{-7} M) overnight. m-Mo-DCs nucleofected with pCTRL (DCs^{pCTRL}) were incubated in medium and served as control. CD4⁺ T cells primed with transfected and PPD-loaded DCs were purified at the end of DC/CD4⁺ T cell co-cultures. They were irradiated and added to CFSE-labeled autologous PBMC stimulated with PPD. Proliferation of CD4 responders among PBMC was assessed by flow cytometry. Results shown are representative of two independent experiments. Percentages represent the fraction of CD4 responders (with low expression of CFSE) among PBMC.

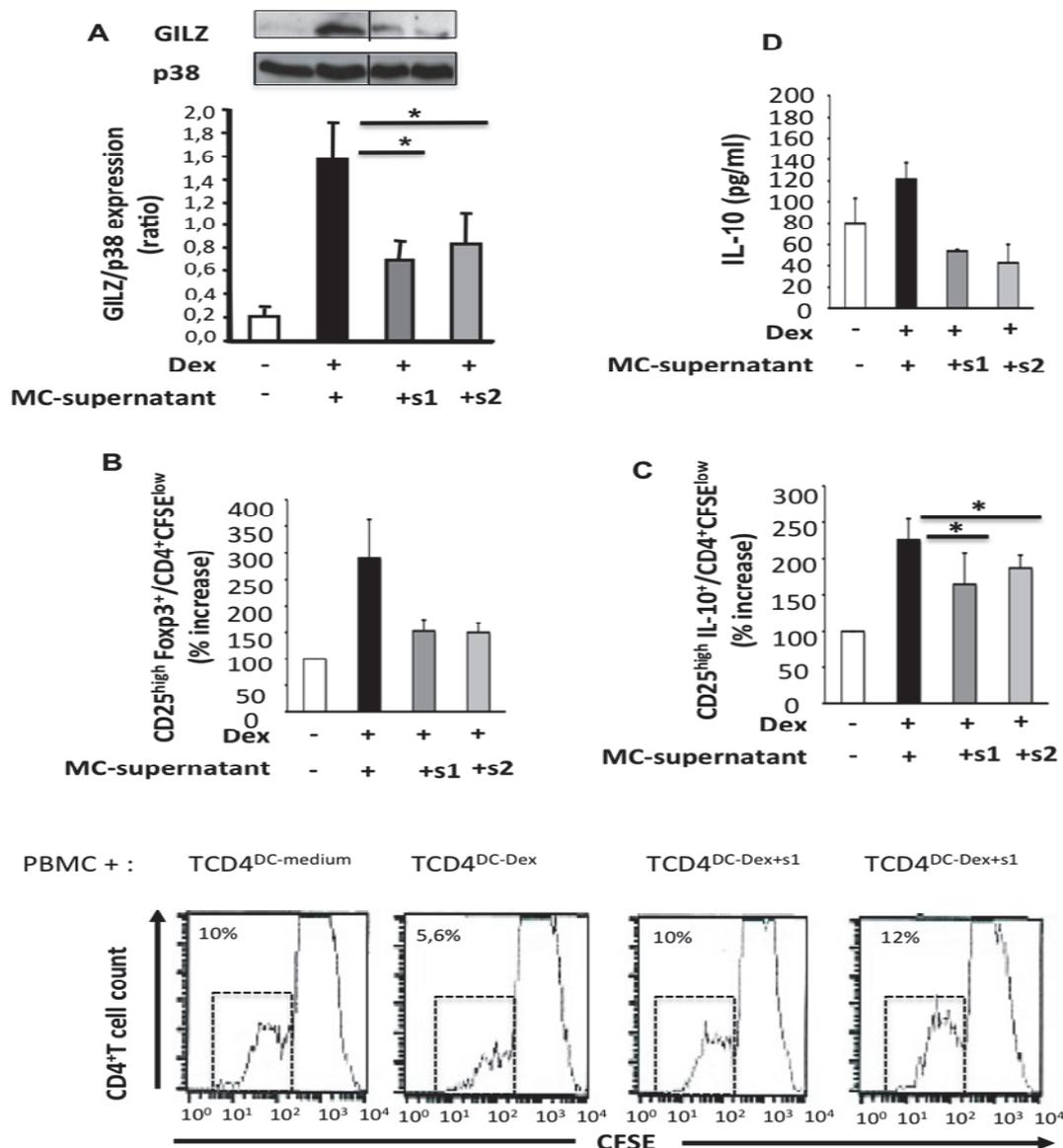


Figure 4. Mediators released by IgE-activated MCs inhibit GILZ expression in DCs and thus their regulatory functions.

(A) Immunoblot analysis of GILZ expression in m-Mo-DCs incubated overnight with Dex (10^{-7} M) in combination with culture-supernatants (1:100 dilution) from MCs activated 30 min (s1) and 24 hours (s2) through FcεRI. m-Mo-DCs cultured with Dex alone or without any stimulation served as control. Expression of GILZ was analysed at the end of culture period by western-blot. The ratio of GILZ expression (upper blot) over control load (p38) expression (lower blot) is plotted. Data (means ± sem) are from five independent experiments. * $p < 0.05$.

(B-D) m-Mo-DCs treated with Dex (10^{-7} M) alone or in the presence of MC supernatants (1:100 dilution) were pulsed with recall antigen (PPD) and co-cultured 7 days with CFSE-labeled autologous CD4⁺ T lymphocytes. (B-C) Expression of CD25, Foxp3 and intracellular IL10 CFSE^{low} proliferating CD4⁺ T cells was determined by flow cytometry at the end of the culture. Results are expressed as percentage increase of T cells with regulatory phenotype in co-cultures realized with treated- m-Mo-DCs compared to those obtained with control untreated- m-Mo-DCs (n=5, mean ± sem). (D) IL-10 production in culture supernatants determined by Elisa.

Data (mean ± sem) are from five independent experiments. * $p < 0.05$ using one-tailed-Wilcoxon test.

(E) Immunosuppressive functions of CD4⁺ T cells activated by differentially treated DCs on autologous PBMC proliferative responses to PPD. Proliferation of CD4 responders among PBMC was assessed by flow cytometry. Results shown are representative of three independent experiments. Percentages represent the fraction of CD4 responders (with low expression of CFSE) among PBMC.

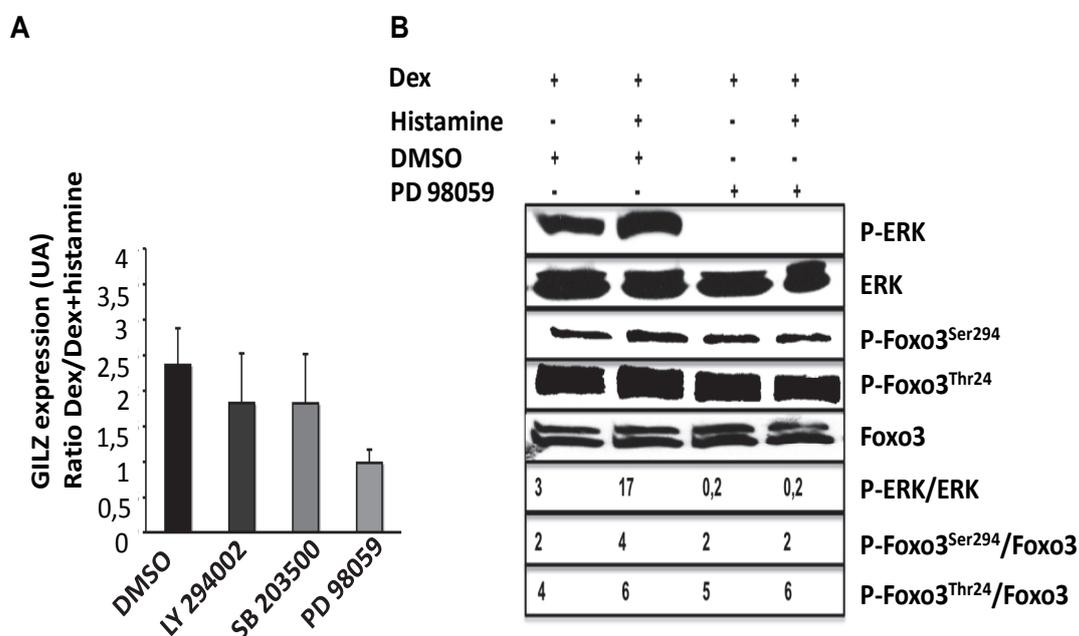


Figure 5: Inhibitor of the ERK1/2 pathway abolishes negative regulation of GILZ expression by histamine.

(A) Mo-DCs were incubated for 30 min at 37°C with LY 294002 (20µM), SB 203500 (20µM), PD 98059 (50µM) or appropriate dilution of DMSO after a short-pre-treatment (1 hour) with LPS (100 ng/ml). Cells were then cultured with Dex (10⁻⁷M) in the presence or absence of histamine (10⁻⁷M). After an overnight incubation at 37°C, GILZ expression was measured with quantitative real time RT-PCR. Results are expressed the ratio of GILZ expression in Dex-treated m-Mo-DCs / Dex+histamine-treated m-Mo-DCs and represent the mean ± sem of 2-3 independent experiments. (B) Mo-DCs were incubated for 30 min at 37°C with PD 98059 (50µM) after a short-pre-treatment (1hour) with LPS (100 ng/ml). Cells were then cultured with Dex (10⁻⁷ M) with or without histamine (10⁻⁷M) for 1 hours at 37°C. At the end of the culture period, the phosphorylation of ERK^{1/2} (P-ERK^{1/2}), Foxo3 on its Serine 294 (P-Foxo3^{Ser294}) and on its Threonine 24 (P-Foxo3^{Thr24}) was analyzed by western blot. After stripping, the membrane was reblotted with an anti-ERK^{1/2} and an anti-Foxo3 as loading controls. P-ERK^{1/2}, P-Foxo3^{Ser294} and P-Foxo3^{Thr24} expression was quantified by densitometric analysis and normalized respectively to the densitometric value of ERK^{1/2} and Foxo3 (ratio P-ERK^{1/2}/ERK^{1/2}, ratio P-Foxo3^{Ser294}/Foxo, ratio P-Foxo^{Thr24} /Foxo3). Results shown are representative of 2 independent experiments.

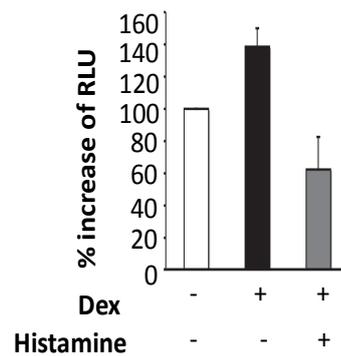
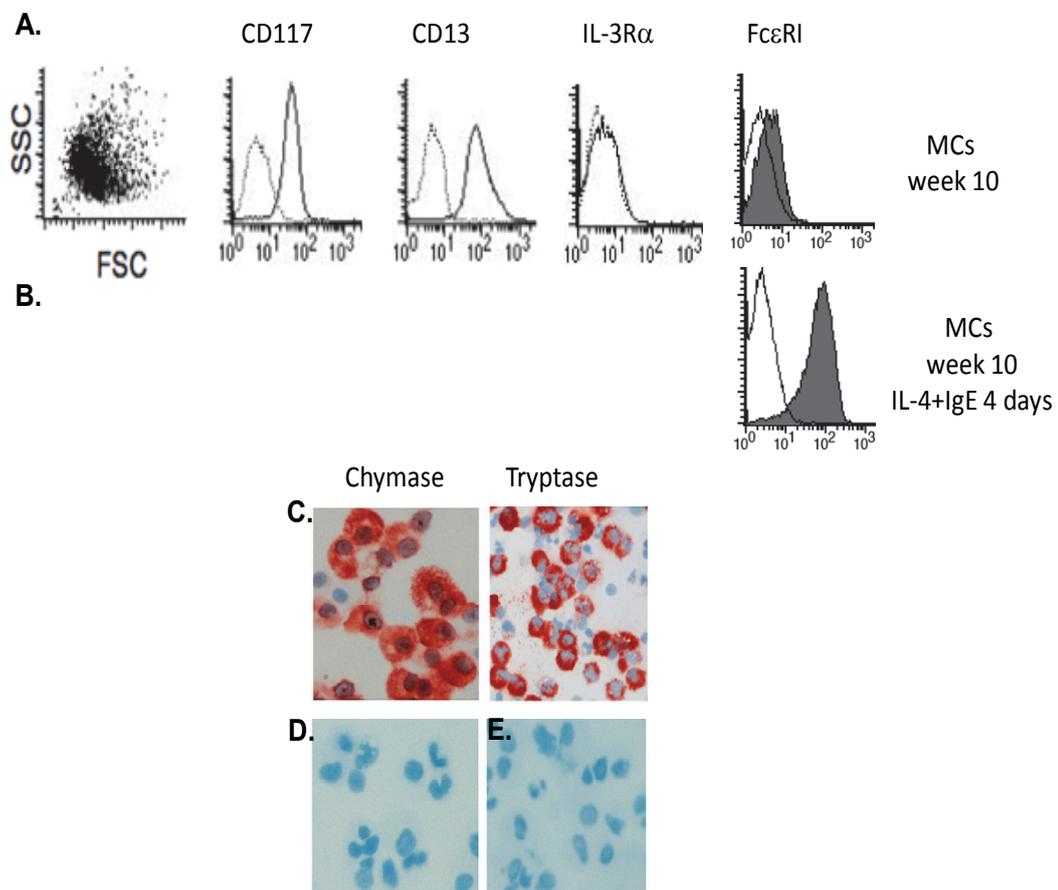


Figure 6: Histamine by activating ERK^{1/2} signaling pathway modulates GILZ promoter activity

Mo-DCs were transiently transfected with 10 μ g of p-1940 Firefly luciferase reporter vector or 0,1 μ g of Renilla luciferase reporter plasmide (pCMV-Renilla), treated with LPS (100 ng/ml) for 1 hour and then cultured with or without Dex (10^{-7} M) or histamine (10^{-7} M) for 18 hours. Relative Luciferase Units (RLU) were normalized as follow : Firefly luciferase units of protein extracts of treated or untreated cells / Renilla lucifera units of protein extracts of untreated cells. Then fold increase of RLU was calculated as follow : normalized RLU of treated cells / normalized RLU of untreated cells, with 100% being attributed to control condition. Data represent the mean \pm sem of 2 independent experiments, each performed in duplicate.



Supplemental figure1: Characterization of human mature MCs at the end of culture period.

Mature MCs were obtained by long term culture (8-9 weeks) of cord blood progenitor cells from healthy donors. Phenotype of mature MCs in term of CD117 (c-kit), CD13, IL-3R α , Fc ϵ RI (A, B), chymase and tryptase (C-E) expression was systematically checked at the end of culture period.

(A, B) Expression of MC markers analyzed by flow cytometry. The open histograms correspond to the staining obtained with the control isotype mAbs and solid histograms to cells labeled with anti-Fc ϵ RI, anti-CD117, anti-CD13 and anti-IL-3R α mAbs. (B) Expression of Fc ϵ RI on mature MCs after 4 days of incubation with human myeloma IgE (2.5 μ g/mL) and human recombinant IL-4 (20 ng/mL).

Chymase (C) and tryptase (D) immunoreactivity of human mature MCs. The negative control performed using MCs was omission of the primary antibody (D) and substitution of the primary antibody by the same isotype (E).

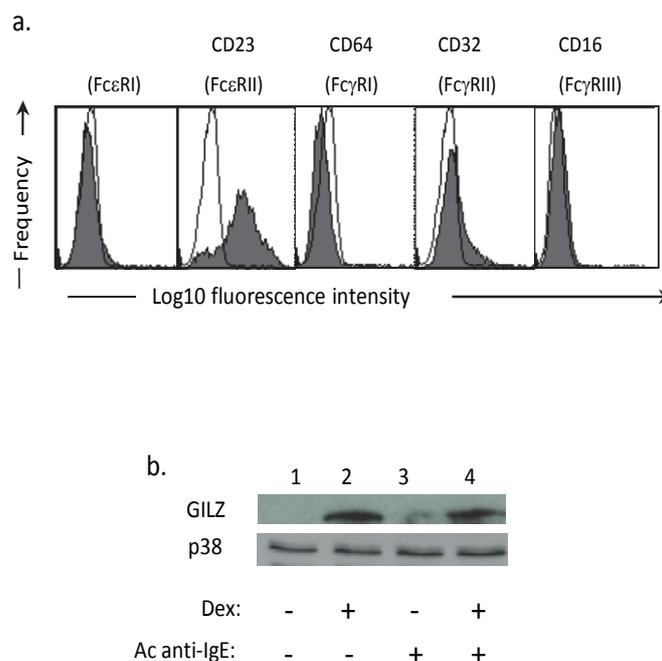
(A-E) A typical example of data obtained with 5 different batches of MCs is shown.

Stimulation after FcεRI induction	Histamine (pg/mL)	TNF (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	LTB4 (pg/mL)
Medium (sT)	99 ± 29	ND	61 ± 17	ND
α IgE 30' (s1)	1469 ± 330	ND	129 ± 32	590
α IgE 1 hr	1695 ± 388	ND	469 ± 152	1210
α IgE 4 hrs	1897 ± 402	2722 ± 984	1843 ± 523	1250
α IgE 24 hrs (s2)	2298 ± 407	3196 ± 1150	2167 ± 503	1670
Control IgG 30'		ND	62 ± 17	

ND : not detectable

Supplemental table 1: Release of histamine, LTB4 and cytokines by MCs activated through FcεRI.

Mature MCs were first incubated 4 days with human myeloma IgE (2.5 µg/mL) and human recombinant IL-4 (20 ng/mL) to induce optimal expression of FcεRI. After a washing step, cells (10⁶/mL) were stimulated or not with goat mAbs anti-human IgE (1 µg/mL). Culture supernatants were collected after different period of time. Levels of histamine, TNF, IL-10 and LTB4 were determined by ELISA. Data (mean ± sem) are from 5 different batches of human MCs.

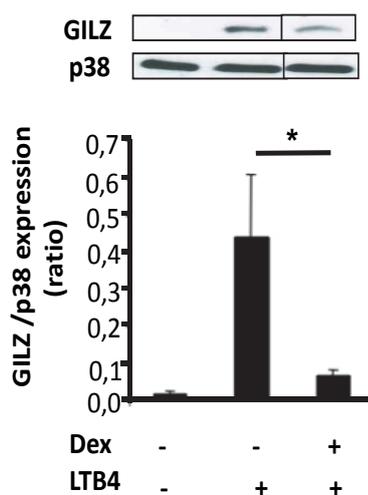


Supplemental figure 2: Activation of DCs through Fc receptors do not down-regulate GILZ expression.

(a). Expression of Fcε and Fcγ receptors on Mo-DCs analysed by flow cytometry. The open histograms correspond to the staining obtained with the control isotype mAbs and solid histograms correspond to cells labeled with anti-FcεRI, anti-CD23, anti-CD64, anti-CD32 or anti-CD16 mAb. Results shown are from 1 experiment of 4.

(b). Immunoblot analysis of GILZ expression in human m-Mo-DCs after activation through Fc receptors. Cells were incubated or not with anti-IgE mAbs (1μg/mL) and Dex (10⁻⁷M) overnight. LPS (1μg/mL) was added together with other stimulants and in all culture conditions. Mo-DCs cultured with LPS alone served as control. Expression of GILZ was analysed at the end of culture period by western-blot.

The ratio of GILZ expression (upper blot) over control load (p38) expression (lower blot) is plotted. Results shown are from 1 experiment of 2.



Supplemental figure 3: LTB4, another mediators of MCs negatively regulating GILZ expression in m-Mo-DCs

Immunoblot analysis of GILZ expression in human m-Mo-DCs. Mo-DCs were treated overnight with Dex (10^{-7} M) in the presence or absence of LTB4 (100 ng/mL). LPS (1 μ g/mL) was added together with other stimulants and in all culture conditions. Mo-DCs cultured with LPS alone served as control. Expression of GILZ was analysed at the end of culture period by western-blot. The ratio of GILZ expression (upper blot) over control load (p38) expression (lower blot) is plotted. Data (mean \pm sem) are from four independent experiments. * $p < 0.05$

Partie 3: Induction de la tolérance immunitaire par des cellules dendritiques surexprimant GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) dans un modèle murin d'asthme allergique

Avant-propos

La prévalence et la sévérité de l'asthme allergique ont augmenté d'une façon alarmante durant les dernières décennies. Les caractéristiques pathophysiologiques de l'asthme allergique telles que l'hyper-éosinophilie pulmonaire, l'hyperréactivité bronchique à une variété de stimuli non spécifiques, la production excessive de mucus et l'augmentation des taux sériques des IgE, ont été liées à des réponses lymphocytaires CD4⁺ de type Th2 vis-à-vis des antigènes communément inhalés.

Ces LTh2 spécifiques de l'antigène exercent leurs fonctions effectrices critiques en produisant un répertoire de cytokines dont les plus importantes sont l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. Les maladies allergiques sont également caractérisées par un défaut dans le nombre et dans la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs (LTregs). Les données actuelles dans la littérature ont suggéré que les LTregs CD4⁺CD25⁺ et les LTregs producteurs d'IL-10 sont capables de supprimer les réponses Th2 spécifiques des allergènes. Les traitements actuels disponibles de l'asthme sont principalement basés sur des interventions pharmacologiques tels que les glucocorticoïdes (les GCs) ou les β 2-agonistes. Bien que ces traitements soient hautement efficaces dans le contrôle de la maladie chez la plupart des individus, ces derniers présentent des effets secondaires non négligeables à long terme. De plus, une grande partie des patients ne contrôle pas de façon optimale leur maladie avec ces drogues. De nouvelles stratégies inductrices de tolérance dans les maladies allergiques doivent donc être développées.

Les cellules dendritiques (CDs), en tant que cellules présentatrices de l'antigène dictent au système immunitaire s'il doit répondre ou non à un antigène. Elles jouent un rôle majeur dans les réponses immunitaires en déterminant leur orientation vers une voie immunogène (activation de lymphocytes T effecteurs, LTeffs) dans le cas des antigènes agressifs ou une

voie tolérogène (activation de lymphocytes T régulateurs, LTregs) dans le cas des antigènes inoffensifs tels que les autoantigènes et les allergènes. Une dérégulation de cette fine balance peut conduire à des déficits immunitaires (persistance des infections, tolérance vis-à-vis des antigènes) ou à l'inverse à des réponses inappropriées exacerbées (maladies allergiques, auto-immunes et inflammatoires chroniques).

La modification génétique des CD avec des gènes codant pour des molécules immunorégulatrices est une stratégie attrayante pour la génération artificielle de CD tolérants. Cette approche pourrait être utilisée pour développer de nouvelles thérapies cellulaires dans le rejet des greffes, les maladies auto-immunes et les maladies allergiques. Cette approche a fait ses preuves dans des modèles murins mais semble moins accessible chez l'homme. La stratégie que nous avons choisi de tester consiste à contrôler les propriétés tolérantes des CD en modulant leur expression de la protéine GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper). L'expression de GILZ est augmentée par des facteurs exogènes comme les GCs, l'IL-10 et le TGF- β .

Pour rappel: une CD exprimant GILZ acquiert un phénotype tolérogène qui se traduit par une diminution de l'expression de molécules de CMH II, CD80, CD86, CD40 et une augmentation des molécules de tolérance tels que B7H1 et IL-T3. Une CD qui exprime GILZ durant l'apprêtement de l'antigène génère des LTregs CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺IL-10⁺ spécifiques de l'antigène, capables d'inhiber la réponse des lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺ en réponse à cet antigène. Nous pensons qu'en absence d'infection les CD tissulaires expriment des taux élevés de GILZ sous l'influence de différents facteurs comme le TGF- β dans le tube digestif et l'IL-10 dans les poumons. Par ce biais, le système immunitaire maintient un état de tolérance vis-à-vis des antigènes inhalés dans le cas des poumons et de la flore commensale dans le cas du tube digestif. La détection de signaux de danger au cours d'une infection s'accompagne d'une diminution de l'expression de GILZ dans les CD. La réponse

immunitaire s'oriente ainsi vers la voie immunogène, efficace dans la lutte contre les pathogènes virulents. Au cours des réactions allergiques, nous pensons que l'allergène est perçu dans un contexte inflammatoire comme un antigène virulent entraînant une diminution de l'expression de GILZ dans les CD4 et par conséquent une rupture de tolérance. Les CD4 présentent alors l'allergène selon un mode immunogène et activent des LTeffs spécifiques de l'allergène. Cette étude a consisté à démontrer qu'il est possible de forcer in vivo les CD4 à reconnaître l'allergène comme une substance inoffensive en modulant l'expression de GILZ et de restaurer ainsi in vivo un état de tolérance immunitaire. Pour vérifier la validité de ce concept, nous avons généré des souris transgéniques qui sur-expriment GILZ exclusivement dans leur CD4: souris CD4-GILZ.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé, dans différents organes et dans un contexte physiologique non inflammatoire, le phénotype et les fonctions des CD4 et des différentes sous-populations lymphocytaires issues de ces souris transgéniques CD4-GILZ.

Dans un second temps, nous avons évalué les réponses immunitaires de ces souris CD4-GILZ dans un contexte pathologique : un modèle d'asthme allergique expérimental. Selon notre hypothèse ces souris transgéniques CD4-GILZ devront être protégées contre le développement de l'asthme allergique.

Résultats

Dans cette 3^{ème} partie, le matériel et les méthodes utilisés ont été détaillés dans l'annexe 1.

1. Validation du modèle des souris transgéniques CD11c-GILZ

Afin d'appréhender le rôle de l'expression de GILZ in vivo par les CD dans l'induction de la tolérance immunitaire, nous avons généré des souris génétiques qui sur-expriment GILZ dans leurs CD. Les séquences codantes pour le gène GILZ murin ont été placées en aval du promoteur CD11c qui est couramment utilisé dans la génération de souris génétiquement modifiées afin de cibler l'expression d'un transgène exclusivement dans les CD. Les souris transgéniques CD11c-GILZ ont été obtenues sur un fond génétique C57BL/6J et également sur un fond génétique Balb/c. Les souris transgéniques CD11c-GILZ C57BL/6J et CD11c-GILZ Balb/c sont viables, fertiles, et présentent une croissance normale. Elles ne présentent pas de signes de déficit immunitaire ni de développement de pathologies détectables pendant les premiers mois de vie.

En utilisant la technologie Speedy Mouse (Nucleis, Lyon, France), une seule copie du transgène CD11c-GILZ par génome diploïde a été insérée dans le locus *hprt* sur le chromosome X (insertion ciblée). Comme le transgène est présent dans le chromosome X, seuls les mâles ont été utilisés dans nos expériences.

Pour valider le modèle de souris transgéniques CD11c-GILZ, nous avons comparé l'expression de GILZ entre les mâles transgéniques CD11c-GILZ (désignés dans ce rapport par TG+) et les mâles contrôles de la même portée n'ayant pas hérité du transgène CD11c-GILZ (désigné dans ce rapport par TG-).

Comme attendu, nous avons confirmé par western blot et RT-PCR en temps réel que les CD fraîchement isolées de la rate des souris CD11c-GILZ TG+ expriment des taux plus élevés de GILZ comparées aux souris contrôles TG- (figure 36A et 36B). De même, les CD dérivées de cellules souches de la moelle osseuse (BM-DC) issues des souris CD11c-GILZ TG+

expriment plus de GILZ par rapport aux BM-DCs issues des souris contrôles TG- (figure 36C).

Le traitement par la dexaméthasone (DEX) des BM-DCs des souris contrôles induit un niveau d'expression de GILZ équivalent à celui observé dans les BM-DCs des souris transgéniques GILZ non traitées. Ce résultat confirme que le transgène induit un niveau d'expression de GILZ maximal et comparable à celui induit par la DEX, un puissant inducteur de GILZ (figure 36C).

Il a été démontré qu'une stimulation par un antigène entraîne une diminution de l'expression du CD11c et donc potentiellement une diminution de l'expression du transgène. Après stimulation avec de l'OVA (100µg/ml) pendant 18h, nous avons observé une diminution de l'expression de GILZ dans les BM-DCs de souris TG+ et TG-. Toutefois, le taux d'expression de GILZ reste significativement plus élevé dans ces conditions chez les souris transgéniques CD11c-GILZ TG+ par rapport aux souris contrôles TG- (figure 36D).

CD11c est une intégrine constitutivement exprimée par les CD, mais aussi à un faible niveau par les LB, les LT CD8⁺ activés, les macrophages alvéolaires, les cellules NK, en particulier les cellules NK du foie où environ 8% des NK sont CD11c⁺ (figure 36F). Nous avons évalué l'expression de GILZ dans les NK totaux du foie des souris CD11c-GILZ TG⁺. Elles semblent exprimer plus de GILZ par rapport aux souris contrôles TG-, bien que la différence ne soit pas significative (figure 36E). Nous prévoyons d'évaluer l'expression de GILZ plus finement dans la sous-population NK⁺CD11c⁺ hépatique.

La surexpression de GILZ est bien restreinte aux cellules CD11c⁺, puisque que nous n'observons pas de surexpression dans les autres populations leucocytaires tels que les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ isolés de ganglions lymphatiques et de la rate (figure 36G et 36H). L'ensemble de ces résultats valide dans le modèle de souris transgéniques CD11c-GILZ une augmentation de l'expression de GILZ dans les cellules dendritiques CD11c⁺.

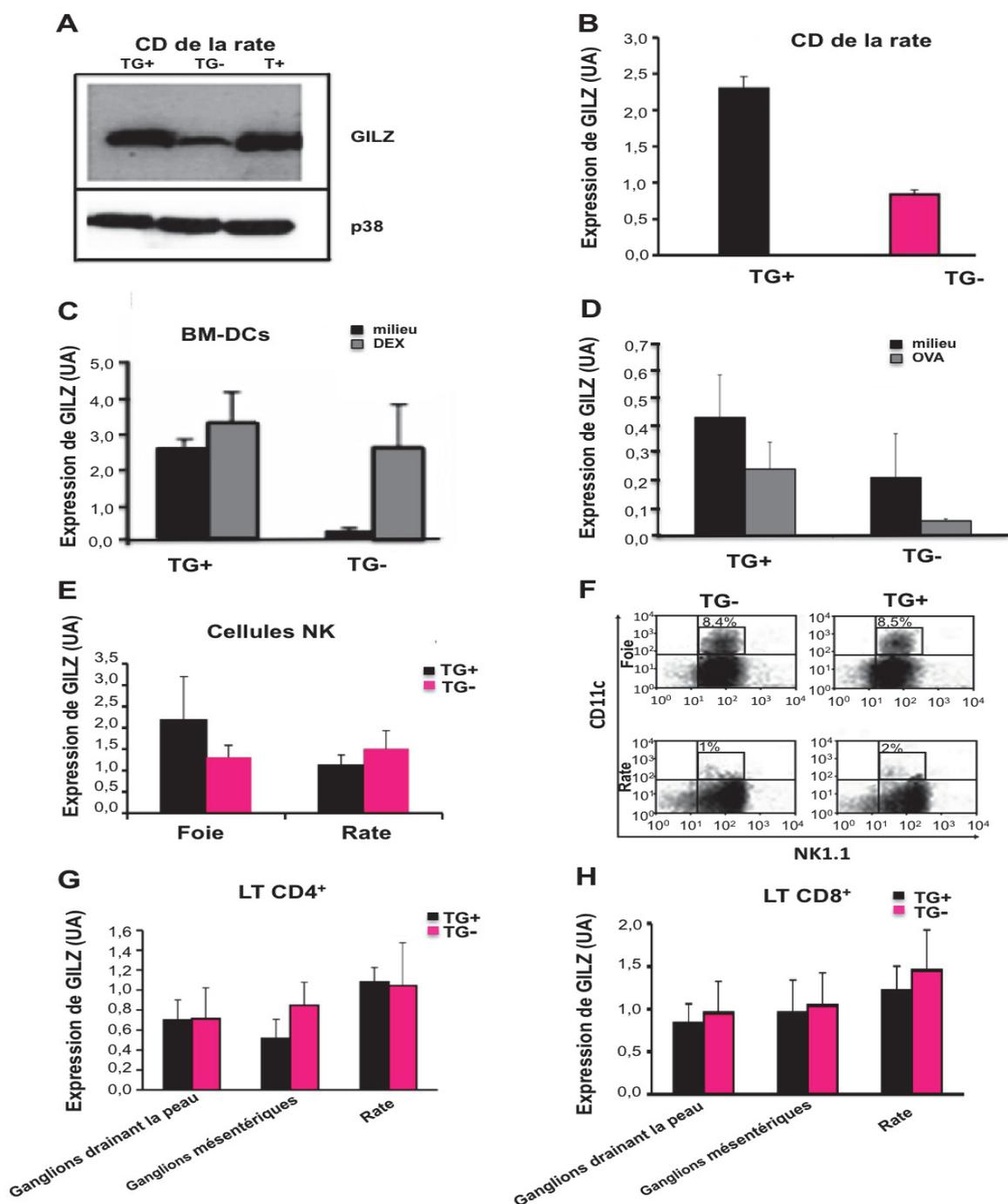


Figure 36. Caractérisation des souris transgéniques CD11c-GILZ. **A)** Détection de la protéine GILZ par Western Blot dans les CD isolées de la rate. Le contrôle positif est une lignée de mastocytes, HMC-1, traitée par la dexaméthasone. **B)** Expression de GILZ évaluée par RT-PCR en temps réel dans les CD isolées de la rate. **C et D)** Expression de GILZ (RT-PCR en temps réel) dans les BM-DCs, stimulées 24h par de la dexaméthasone à $10^{-7}M$, ou 18h avec de l'OVA 100 μ g/ml, ou cultivées en milieu seul. **E)** Expression de GILZ (RT-PCR en temps réel) dans les cellules NK totales du foie et de la rate. **F)** proportion de l'expression de CD11c par les cellules NK évaluée par cytométrie en flux. **G et H)** Expression de GILZ (RT-PCR en temps réel) dans les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ isolées de la rate, des ganglions drainant la peau et des ganglions mésentériques. 3-4 souris par groupe, moyenne \pm sem.

2. Caractérisation du système immunitaire des souris transgéniques CD11c-GILZ.

Les proportions des sous-populations de CD_s (CD_s myéloïdes : mDC, et CD_s plasmacytoïdes : pDCs), des LB, des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ ont été analysées dans différents organes lymphoïdes : rate, ganglions de la peau, ganglions mésentériques et thymus. Nous avons également évalué l'expression des marqueurs de co-stimulation et de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) sur les CD_s et l'expression des marqueurs d'activation et de tolérance sur les lymphocytes T.

Les souris transgéniques CD11c-GILZ TG⁺ ne présentent pas d'altérations des compartiments myéloïdes et lymphocytaires dans les organes étudiés (tableau 6A). Les proportions de CD_s, de LB, de LT CD4⁺ et de LT CD8⁺ sont semblables dans la rate et les ganglions entre les souris transgéniques CD11c-GILZ TG⁺ et les souris contrôles TG⁻. Aucune différence n'a été observée entre les proportions de lymphocytes LT CD4⁺ et de LT CD8⁺ thymiques entre les 2 groupes de souris (tableau 6B).

A l'état basal, les CD_s spléniques et les BM-DCs des souris transgéniques CD11c-GILZ TG⁺ et des contrôles TG⁻, expriment des taux équivalents de molécules CMH II, des molécules de co-stimulation (CD86, CD40, CD80) et du marqueur de tolérance B7H1 (figure 37A et 37B).

Les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺ des souris CD11c-GILZ TG⁺ et leurs contrôles TG⁻ expriment les marqueurs d'activation et de tolérance à des niveaux équivalents (tableau 7A et 7B). Nous n'avons pas observé d'expansion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ chez les souris transgéniques GILZ TG⁺ par rapport aux souris contrôles TG⁻ (figure 38).

A

	Rate		Ganglions drainant la peau		Ganglions mésentériques	
	TG+	TG-	TG+	TG-	TG+	TG-
mDCs	1,48±0,26	1,43±0,08	ND	ND	ND	ND
pDCs	0,37±0,25	0,37±0,16	ND	ND	ND	ND
LB	52,88±6,1	50,7±2,9	29,45±2,5	31,05±3,5	24,67±8,9	27,73±3,2
LT CD4+	34±2,7	36,33±6,7	44,57±4,2	48,53±8,4	48,57±7,9	46,5±3,4
LT CD8+	14±3,0	14,3±3,9	23,42±11,8	23,59±13,6	20,46±9,7	24,43±10,8

B

	Thymus	
	TG+	TG-
CD4 SP	65,15±2,3	66,±0
CD8 SP	14,25 ±0,4	15,2 ±3,1
DP	15,20±0,1	13,9±3,2
DN	5,38 ±1,6	4,9 ±0,2

Tableau 6. A) Proportions des sous-populations de CD4⁺, de LB et de LT dans les organes lymphoïdes des souris CD11c-GILZ TG⁺ et des souris contrôles TG⁻. B) Proportions des LT CD4⁺ simple positif (SP), des LT CD8⁺ SP et des thymocytes CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) et double négative (DN) dans le thymus des souris CD11c-GILZ TG⁺ et des souris contrôles TG⁻. Les résultats sont exprimés en % de cellules, 3-4 souris/groupe, moyenne ± sem, ND : non déterminé

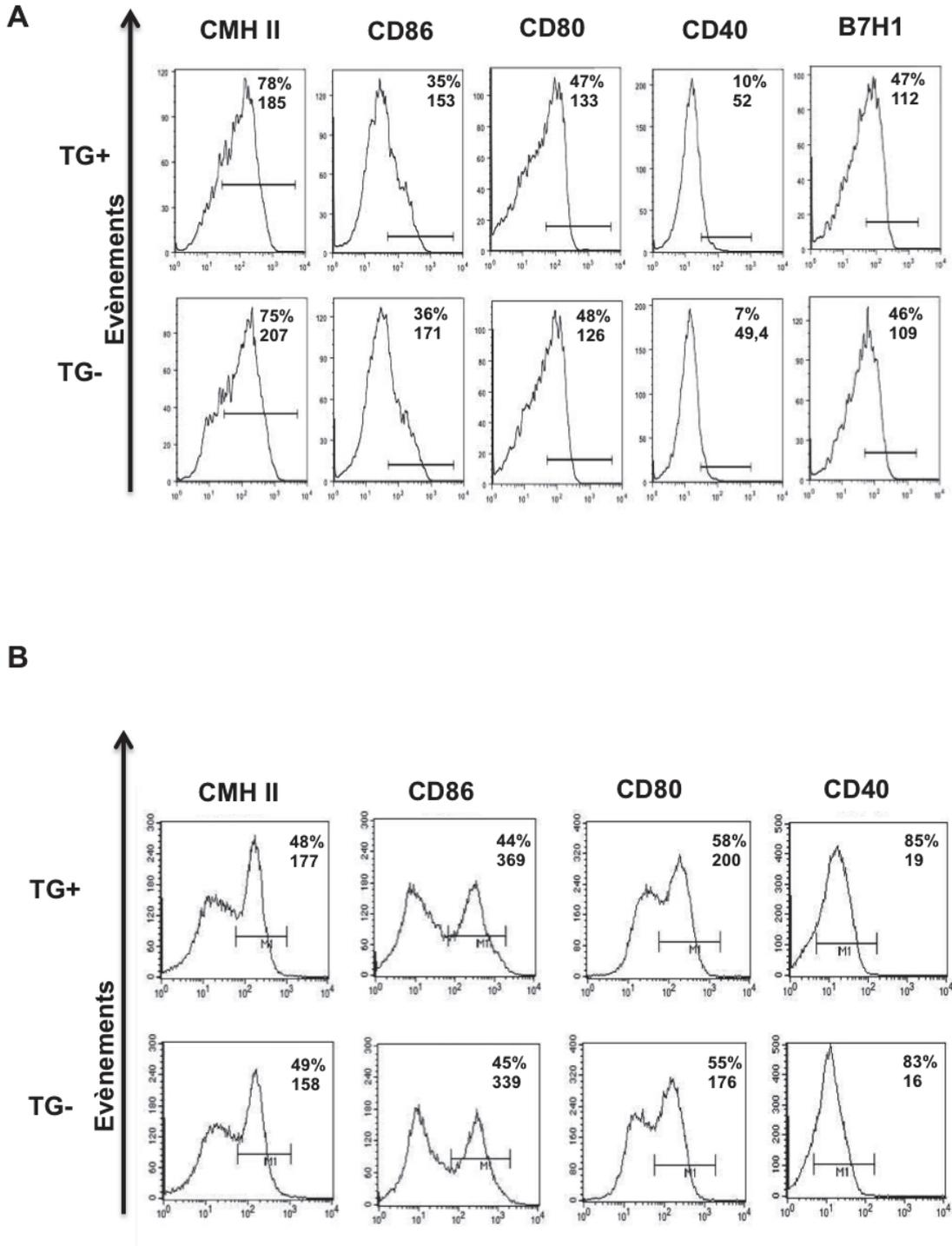


Figure 37. Phénotype des CD spléniques (A) et BM-DCs (B) des souris CD11c-GILZ TG+ et des souris contrôles TG- en absence de stimulation. Les résultats sont exprimés en % de cellules positives parmi les cellules CD11c+ et en intensité de fluorescence (MFI), figures représentatives de 3-4 souris/groupe.

A

LT CD4 ⁺	Rate		Ganglions drainant la peau		Ganglions mésentériques	
	TG+	TG-	TG+	TG-	TG+	TG-
CD40L	1,04±0,7	0,83±0,75	0,76±0,76	1,64±1,3	0,74±0,7	1,47±1,8
CD69	4,48±1,0	3,86±0,8	5,14±0,7	5,33±0,4	9,62±1,4	9,58±0,7
CD122	2,0±1,5	2,2±1,4	1,43±0,7	1,39±3,2	1,69±1,3	1,61±1,3
PD1	1,79±0,7	1,69±0,9	1,41±0,6	1,7±0,2	1,67±0,1	1,76±0,3
CD103	1,39±0,9	1,4±0,7	1,87±0,6	1,98±0,6	2,26±0,8	2,56±0,5
GITR	9,42±0,4	8,24±0,2	8,56±1,3	8,57±1,6	9,32±1,1	8,97±1,5
LAG3	0,26±0,1	0,32±0,3	0,45±0,6	0,61±0,8	0,82±0,3	0,7±0,2
ICOS	2,30±2,0	2,15±2,0	2,81±1,6	3,13±1,9	4,35±2,9	4,26±2,3

B

LT CD8 ⁺	Rate		Ganglions drainant la peau		Ganglions mésentériques	
	TG+	TG-	TG+	TG-	TG+	TG-
CD40L	1,43±0,6	1,28±0,1	1,39±1,2	2,21±1,9	0,67±0,7	0,84±0,7
CD69	1,26±0,6	1,19±0,4	1,81±0,4	2,31±0,2	2,06±0,9	2,26±0,9
CD122	1,20±1,4	1,42±1,6	2,78±3,5	2,97±3,8	2,15±1,5	2,80±2,5
PD1	0,65±0,8	0,61±0,4	0,91±0,9	1,11±0,6	0,51±0,2	0,9±0,4
CD103	15,85±0,7	17,15±0,2	19,97±7,4	25,47±2,8	22,57±2,4	24,6±2,8
LAG3	0,4±0,3	0,38±0,2	0,45±0,6	0,53±0,6	0,41±0,1	0,46±0,1

Tableau 7. Expression des marqueurs d'activation et de tolérance sur les LT CD4⁺ (A), et les LT CD8⁺ (B) de la rate, et des ganglions lymphatiques. Les résultats sont exprimés en % de cellules parmi la région lymphocytaire, 3-4 souris/groupe, moyenne ± sem.

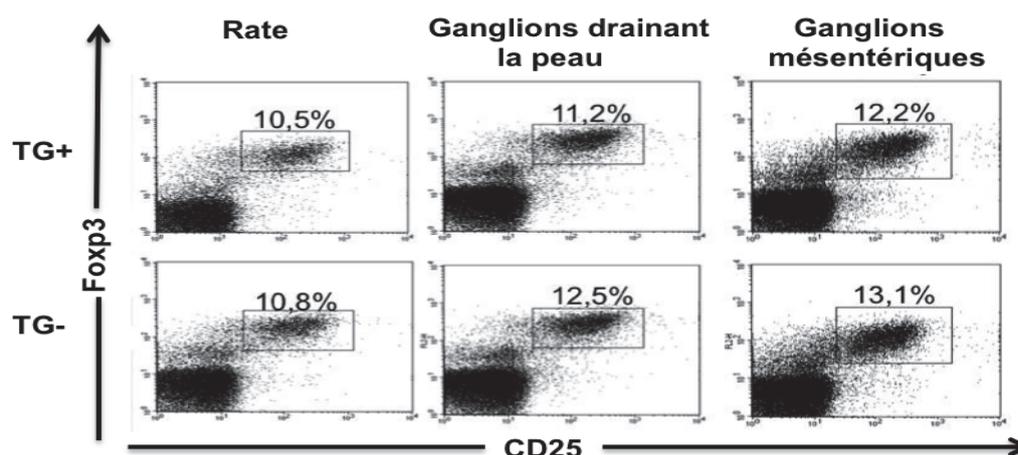


Figure 38. Evaluation du pourcentage de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Fopx3⁺ dans la rate et les ganglions des souris CD11c-GILZ TG⁺ et des souris contrôles TG⁻. Les résultats sont exprimés en % de cellules parmi les LT CD4⁺, Figures représentatives de 3-4 souris/groupe,

3. Maturation des BM-DCs des souris CD11c-GILZ.

Afin de vérifier que les BM-DCs des souris CD11c-GILZ TG⁺ ne présentent aucun défaut de maturation par rapport aux BM-DCs des souris contrôles TG⁻, nous avons évalué le niveau d'expression des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86), du CMH II et leur profil de production de cytokines (IL-10, IL-12), après stimulation des cellules par de l'OVA (100µg/ml) ou par des doses croissantes de LPS (10,100 et 1000 ng/ml) pendant 26h (figure 39).

Aucune différence de maturation des BM-DCs provenant des deux groupes de souris n'a été observée, en terme d'expression des marqueurs de co-stimulation ou de sécrétion d'IL-10 et d'IL-12. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec d'autres cinétiques de stimulations 5h, 18h et 36h (résultats non montrés).

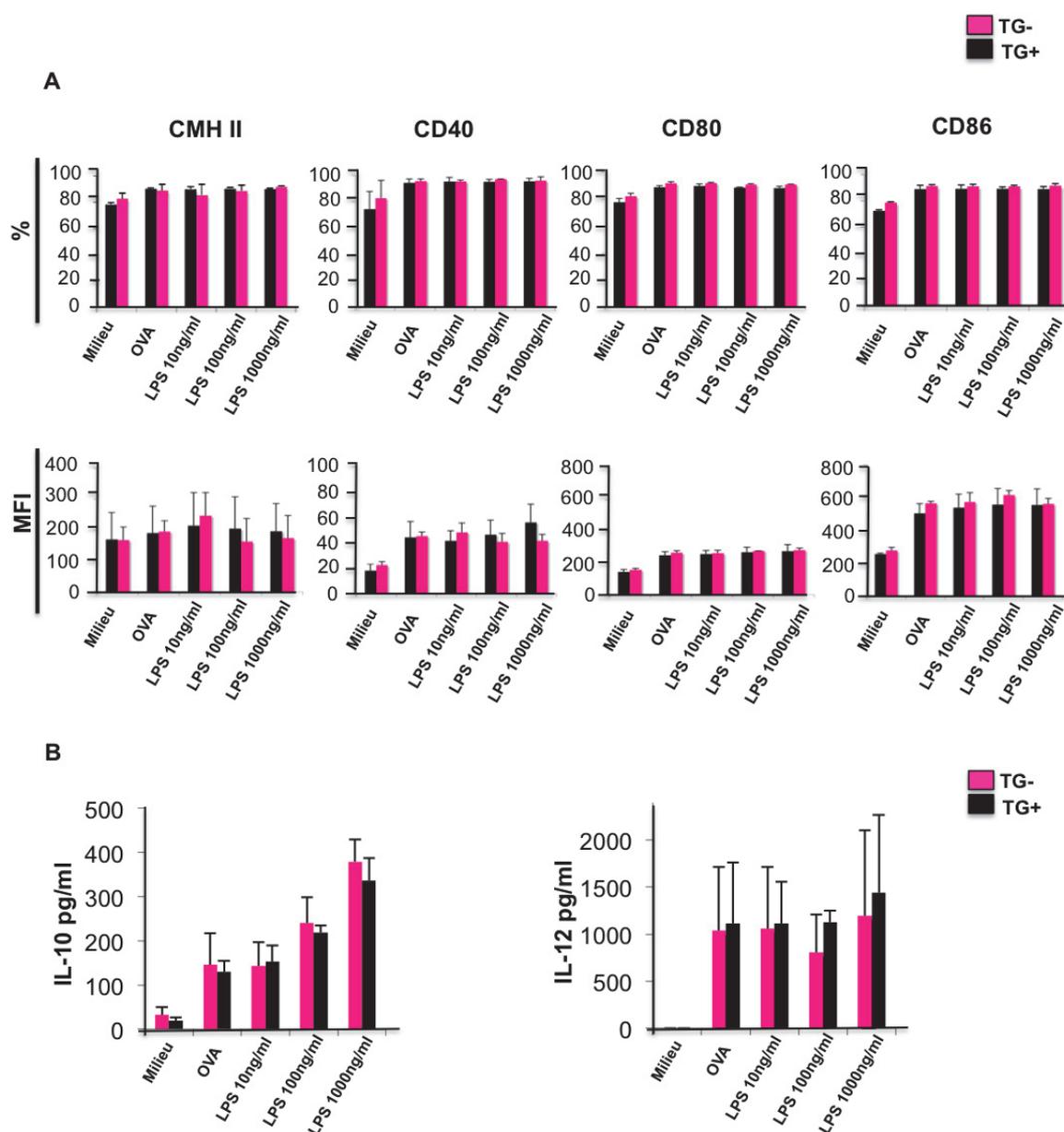


Figure 39. Maturation des BM-DCs après une stimulation de 26h avec 100µg/ml d'OVA ou des doses croissantes de LPS (10, 100 et 1000 ng/ml). Les cellules incubées dans du milieu seul ont servi de contrôle. **A)** Expression des molécules de co-stimulation et de CMH II. Les résultats sont exprimés en % de cellules positives et en intensité de fluorescence (MFI). **B)** Production d'IL-10 et d'IL-12 en pg/ml, dans les surnageants de culture. 3-4 souris/groupe, moyenne ± sem.

4. Fonction de capture et d'apprêtement de l'antigène des CD_s spléniques et des BM-DCs de souris CD11c-GILZ.

Afin de déterminer si l'expression forcée de GILZ dans les CD_s et les BM-DCs des souris CD11c-GILZ modifie leur capacité de capture et d'apprêtement des antigènes, les CD_s spléniques et les BM-DCs des souris CD11c-GILZ TG⁺ et des souris contrôles TG⁻ ont été incubées en présence de 50µg/ml d'OVA-Alexa Fluor 488 (test de phagocytose) ou d'OVA-DQ (test de processing). L'incubation a duré 1h 30.

Les CD_s spléniques et les BM-DCs des souris CD11c-GILZ TG⁺ captent l'antigène et le présentent de la même façon que les CD_s spléniques et les BM-DCs des souris contrôles TG⁻ (figure 40). Nous avons obtenu le même résultat pour une cinétique d'incubation plus courte (30 min) et avec 2 doses d'OVA-Alexa Fluor 488 et d'OVA-DQ (10µg/ml et 50µg/ml) (résultats non montrés).

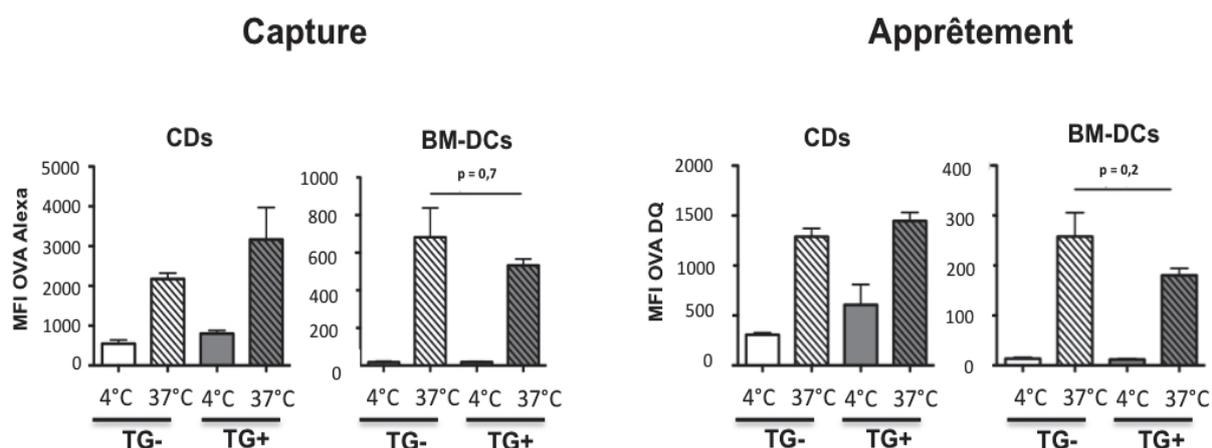


Figure 40. Capture et apprêtement antigénique par les CD_s spléniques et les BM-DCs des souris CD11c-GILZ TG⁺ et des souris contrôles TG⁻. Les CD_s spléniques et les BM-DCs ont été incubées en présence d'OVA Alexa Fluor 488 ou d'OVA-DQ à 50µg/ml, pendant 1h30. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence (MFI), 4 souris /groupe, moyenne ± sem. Le test non paramétrique Mann-whitney a été utilisé pour analyser les résultats. Un *P < 0,05 a été considéré comme significatif.

5. Protection des souris CD11c-GILZ TG+ contre le développement d'un asthme allergique expérimental.

Nous avons ensuite évalué si l'expression forcée de GILZ dans les cellules CD11c⁺ pouvait influencer le développement d'un asthme allergique expérimental. Les souris C57BL/6j CD11c-GILZ TG+ et les souris contrôles TG- ont été sensibilisées à l'OVA par une injection intra-péritonéale de 50 µg/ml d'OVA adsorbé à 2mg d'hydroxyde d'aluminium à J0 et à J7. Les souris ont été ensuite exposées à des instillations intranasales de 10 µg/ml d'OVA à J17, J18, J19, J20. Les souris non sensibilisées ont reçu des injections intra-péritonéales de PBS adsorbé à 2mg d'hydroxyde d'aluminium à J0 et à J7 suivi par des instillations intranasales de PBS à J17, J18, J19, J20. 24 heures après la dernière instillation intranasale, l'hyperréactivité bronchique des souris est mesurée. Ensuite, les souris sont sacrifiées à J21 pour évaluer les différentes composantes de l'asthme (figure 41). Les souris CD11c-GILZ TG+ et les souris contrôles TG- sensibilisées à l'OVA seront désignées respectivement par TG+ OVA et TG- OVA tandis que les souris CD11c-GILZ TG+ et les souris contrôles TG- sensibilisées avec du PBS seront désignées respectivement par TG+ PBS et TG- PBS.

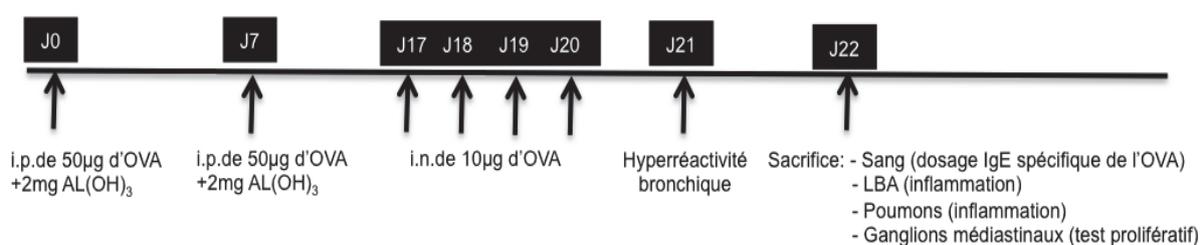


Figure 41. Protocole d'asthme classique. i.p.: injection intra-péritonéale; i.n.: instillations intranasales; AL(OH)₃ : hydroxyde d'aluminium; LBA: lavage broncho-alvéolaire.

En vue de l'association des maladies allergiques avec la présence détectable des taux d'IgE, nous avons mesuré les taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA par Elisa. La sensibilisation active par des injections intra-péritonéales d'OVA en présence d'adjuvant induit une

production d'IgE spécifiques de l'OVA chez les souris CD11c-GILZ TG⁺ et les souris contrôles TG⁻ sensibilisées à l'OVA en comparaison avec les souris CD11c-GILZ TG⁺ et les souris contrôles TG⁻ sensibilisées par du PBS (figure 42A). Ces résultats montrent clairement que les souris CD11c-GILZ et les souris contrôles ont été efficacement immunisées vis-à-vis de l'OVA.

Nous avons ensuite étudié l'inflammation broncho-alvéolaire de ces souris en mesurant le nombre total de cellules présentes dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA) de ces souris. Une augmentation significative du nombre total de cellules a été observée dans le LBA des souris TG-OVA en comparaison avec les souris TG-PBS. En revanche, aucune augmentation significative n'a été détectée chez les souris CD11c-GILZ sensibilisées à l'OVA (TG+OVA) en comparaison avec les souris CD11c-GILZ sensibilisées au PBS (TG+PBS) (figure 42B).

L'analyse par cytométrie en flux des différentes populations cellulaires présentes dans le LBA a montré une augmentation significative du nombre absolu des lymphocytes T, des macrophages, des éosinophiles et des neutrophiles dans le LBA des souris TG-OVA en comparaison avec les souris TG-PBS. En revanche, aucune augmentation significative de ces populations cellulaires n'a été observée dans le LBA des souris TG+OVA en comparaison avec les souris TG+PBS (figure 42C). Ces données nous ont permis de conclure que les souris CD11c-GILZ TG⁺ n'ont pas développé d'inflammation ni d'hyper-éosinophilie broncho-alvéolaire, une des caractéristiques de ce modèle expérimental d'asthme allergique.

L'hyperréactivité bronchique à des stimuli non spécifiques comme la méthacholine est un des symptômes caractéristique de l'asthme. Nous avons observé une augmentation de l'hyperréactivité bronchique chez les souris TG-OVA en comparaison avec les souris TG-PBS. Cette augmentation est statistiquement significative dès les doses faibles de méthacholine (figure 42D). Les souris TG+OVA n'ont pas développé de l'hyperréactivité bronchique en réponse à toutes les concentrations de méthacholine testées (figure 42E).

Toutefois, il est à noter que les souris TG+ PBS présentent une hyperréactivité bronchique plus élevée que les souris TG+OVA à des concentrations fortes de méthacholine telles que 0,2M et 0,3M (figure 42E). Ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Les infiltrats de cellules inflammatoires périvasculaires et péribronchiques, le dépôt de collagène et la production de mucus ont été évalués par les colorations à l'hématoxyline/éosine, la coloration par le Trichrome de Masson et la coloration à l'acide périodique de Schiff respectivement. Ces 3 paramètres ont significativement augmenté chez les souris TG-OVA en comparaison avec les souris TG+OVA (figure 43).

Nous avons également évalué la prolifération des cellules isolées des ganglions médiastinaux *in vitro* en réponse à 500µg/ml d'OVA par un test d'incorporation à la thymidine tritiée. Nous avons détecté une réponse proliférative significative des cellules issues des ganglions médiastinaux des souris TG-OVA alors que les cellules des ganglions médiastinaux des souris TG+OVA n'ont pas proliféré en réponse à la restimulation avec l'OVA. Ce résultat est très préliminaire (n= 2 souris dans le groupe des souris TG+PBS) (figure 44). En prenant en considération toutes ces données, nous avons conclu que les souris CD11c-GILZ TG+ semblent protégées contre l'asthme allergique expérimental.

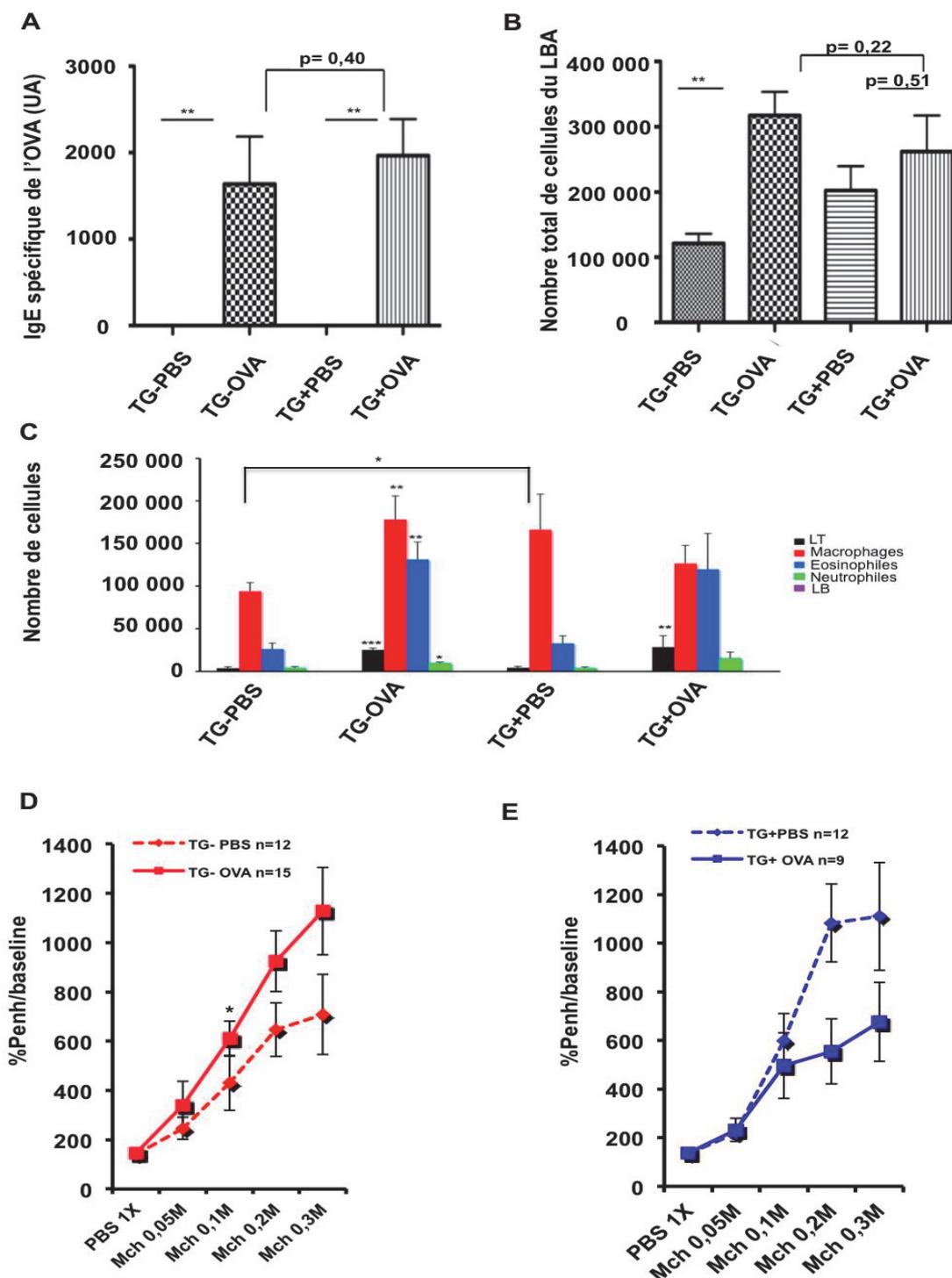


Figure 42. Protection des souris transgéniques C57BL/6J CD11c-GILZ TG+ contre l'asthme allergique. *A)* Les taux d'IgE spécifiques d'OVA ont été mesurés dans les sérums des souris par ELISA. Les taux d'IgE spécifique d'OVA sont exprimés en unités arbitraires (UA). *B)* Nombre totale de cellules dans le LBA. *C)* Compte différentiel des cellules du LBA déterminé par cytométrie en flux. Ces résultats sont représentatifs de 6 souris au moins/groupe. *D et E)* Hyperréactivité bronchique évaluée par pléthysmographie en réponse à des doses croissantes de méthacholine inhalée. Les résultats sont exprimés en % de l'indice Penh par rapport à la valeur basale. Ce résultat est représentatif de 9 à 15 souris/groupe, moyenne \pm sem. Le test non paramétrique Mann-whitney a été utilisé pour analyser les résultats. Un * $p < 0,05$ ou un ** $p < 0,01$ a été considéré comme significatif.

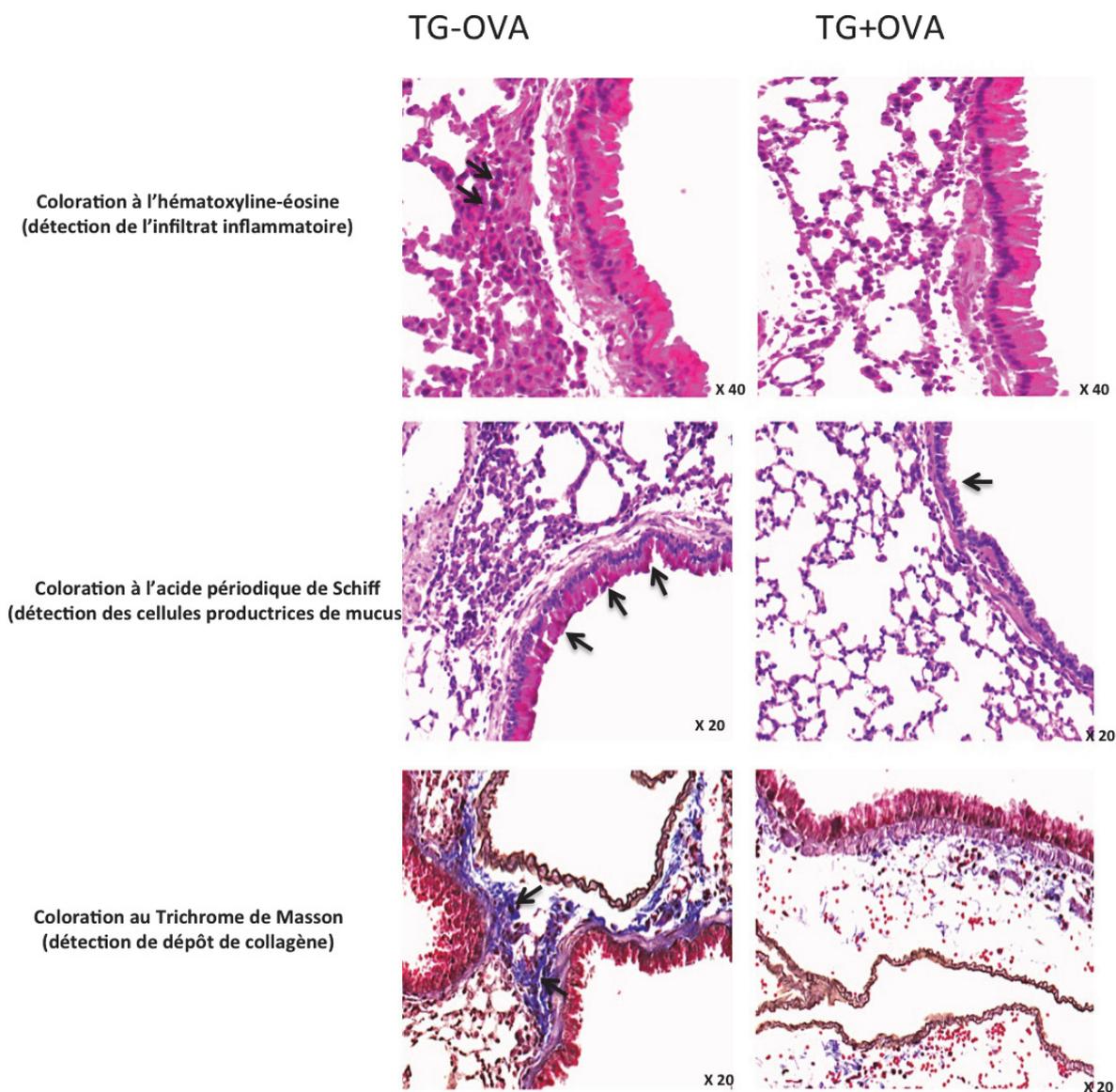


Figure 43. Des coupes histologiques de poumons de souris transgéniques *CD11c-GILZ TG+* et des souris contrôles *TG-* sensibilisées à l'OVA ont été marquées soit avec l'hématoxyline-éosine, soit avec l'acide périodique de Schiff, soit avec le Trichrome de Masson. Ces marquages sont représentatifs de 6 souris/groupe, moyenne \pm sem.

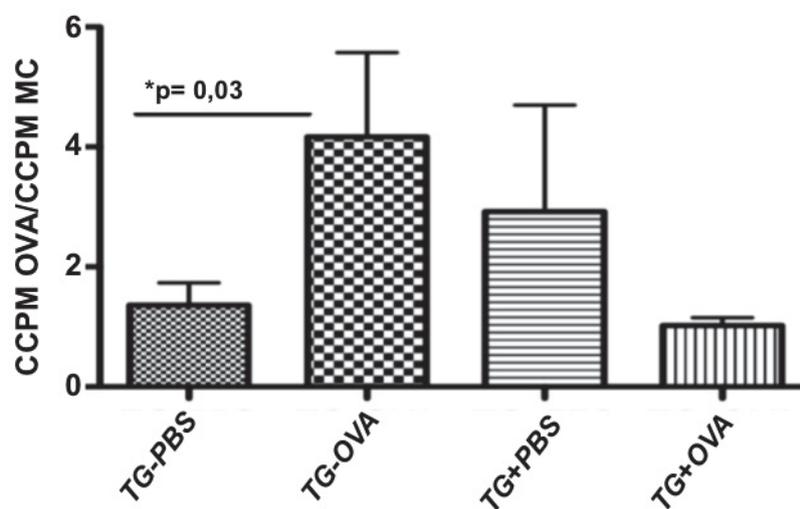


Figure 44. Prolifération des cellules isolées de ganglions médiastinaux évaluée par un test d'incorporation à la thymidine tritiée après restimulation pendant 3 jours avec 500 μ g/ml d'OVA soit le ratio CCPM dans les cultures avec OVA/CCPM contrôles dans les cultures milieu. Les résultats sont représentatifs de 2 à 6 souris/groupe, moyenne \pm sem.

Nous nous sommes demandé ensuite si la protection des souris transgéniques était dépendante de leur fond génétique. Pour répondre à cette question nous avons utilisé des souris transgéniques CD11c-GILZ sur fond Balb/c et nous avons reproduit les principales expériences. Nous avons mesuré les IgE spécifiques de l'OVA dans le sérum de ces souris après la dernière instillation intra-nasale d'OVA. Nous avons observé une augmentation significative des IgE spécifiques de l'OVA chez les souris Balb/c contrôles TG-OVA en comparaison avec les souris contrôles TG-PBS et chez les souris Balb/c TG+OVA comparées aux souris Balb/c TG+PBS (figure 45A). Ce résultat nous a permis de conclure que les souris transgéniques CD11c-GILZ sur un fond Balb/c étaient efficacement immunisées vis-à-vis de l'OVA.

Nous avons ensuite évalué l'hyperréactivité bronchique des souris Balb/c transgéniques et contrôles. Les souris contrôles TG-OVA ont développé une hyperréactivité bronchique significativement augmentée par rapport aux souris contrôles TG-PBS. Ces différences sont statistiquement significatives dès les faibles doses de méthacholine (0,05M et 0,1M) (figure 45B). En revanche, les souris Balb/c CD11c-GILZ TG+OVA n'ont présenté aucune augmentation significative de l'hyperréactivité bronchique en comparaison avec les souris TG+PBS (figure 45C).

Nous avons ensuite étudié la prolifération des ganglions médiastinaux en réponse à une restimulation à l'OVA (500µg/ml) en présence de la thymidine tritiée. Une prolifération significative des cellules issues des ganglions médiastinaux en réponse à l'OVA a été détectée chez les souris contrôles TG-OVA en comparaison avec les souris contrôles TG-PBS. En revanche, aucune prolifération significative de ces cellules n'a été détectée chez les souris Balb/c transgéniques TG+OVA comparées aux cellules isolées des ganglions médiastinaux des souris TG+PBS (figure 45D).

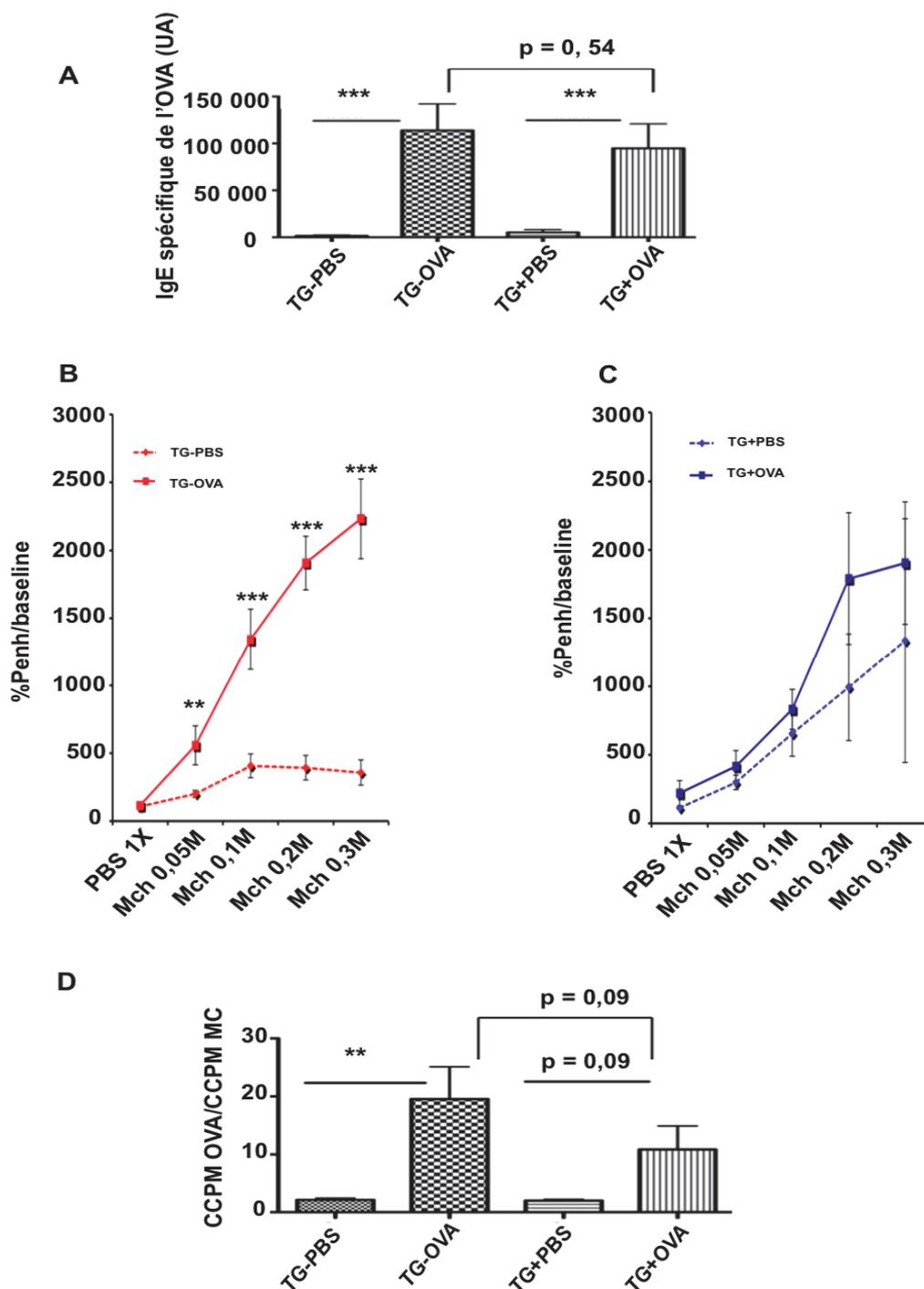


Figure 45. Protection des souris transgéniques Balb/c CD11c-GILZ contre l'asthme allergique. A) Les taux d'IgE spécifiques d'OVA ont été mesurés dans les sérums des souris par ELISA. Les taux d'IgE spécifique d'OVA sont exprimés en unités arbitraires (UA). B) Hyperréactivité bronchique évaluée par pléthysmographie en réponse à des doses croissantes de méthacholine inhalée. Les résultats sont exprimés en % de l'indice Penh par rapport à la valeur basale Ce résultat est représentatif de 6 à 12 souris/groupe. C) Prolifération des ganglions médiastinaux évaluée en présence de la thymidine tritiée après restimulation pendant 3 jours avec 500µg/ml d'OVA. Les résultats sont exprimés en index de prolifération soit le ratio CCPM dans les cultures avec OVA/CCPM contrôles dans les cultures milieu Les résultats sont représentatifs de 6 souris/groupe, moyenne ± sem. Le test paramétrique Mann-whitney a été utilisé pour analyser les résultats. Un ** $p < 0,01$ ou un *** $p < 0,001$ a été considéré significatif.

Nous avons démontré ensuite que l'absence d'asthme allergique chez les souris transgéniques CD11c-GILZ TG+ après la sensibilisation à l'OVA est bien due à une surexpression de GILZ dans les CD de ces souris. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle de sensibilisation des souris par l'injection-intra-trachéale de CD. Des CD dérivées de la moelle osseuse des souris transgéniques TG+ (BM-DC^{OVA}TG+) ou des souris contrôles TG- (BM-DC^{OVA}TG-) chargées à l'OVA ont été injectées à des souris sauvages C57BL/6J par voie intra-trachéale à J0. Cette injection est suivie à partir de J11 de cinq instillations intranasales d'OVA (10µg). 24h après la dernière instillation intranasale d'OVA, l'inflammation broncho-alvéolaire a été évaluée (figure 46A).

La sensibilisation des souris sauvages C57BL/6J par l'administration intra-trachéale de BM-DC^{OVA}TG+ ou de BM-DC^{OVA}TG- a induit à une augmentation significative des taux d'IgE sériques spécifiques de l'OVA (figure 46B)

L'administration de BM-DC^{OVA}TG- a été associée à une augmentation du nombre total de cellules dans le LBA chez les souris sauvages C57BL/6J receveuses en comparaison avec les souris qui ont reçu une injection intratrachéale de BM-DC^{mil}TG- (non chargées à l'OVA). En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les souris qui ont reçu une injection intra-trachéale de BM-DC^{OVA}TG+ et les souris qui ont reçu une injection intra-trachéale de BM-DC^{mil}TG+ (figure 46C).

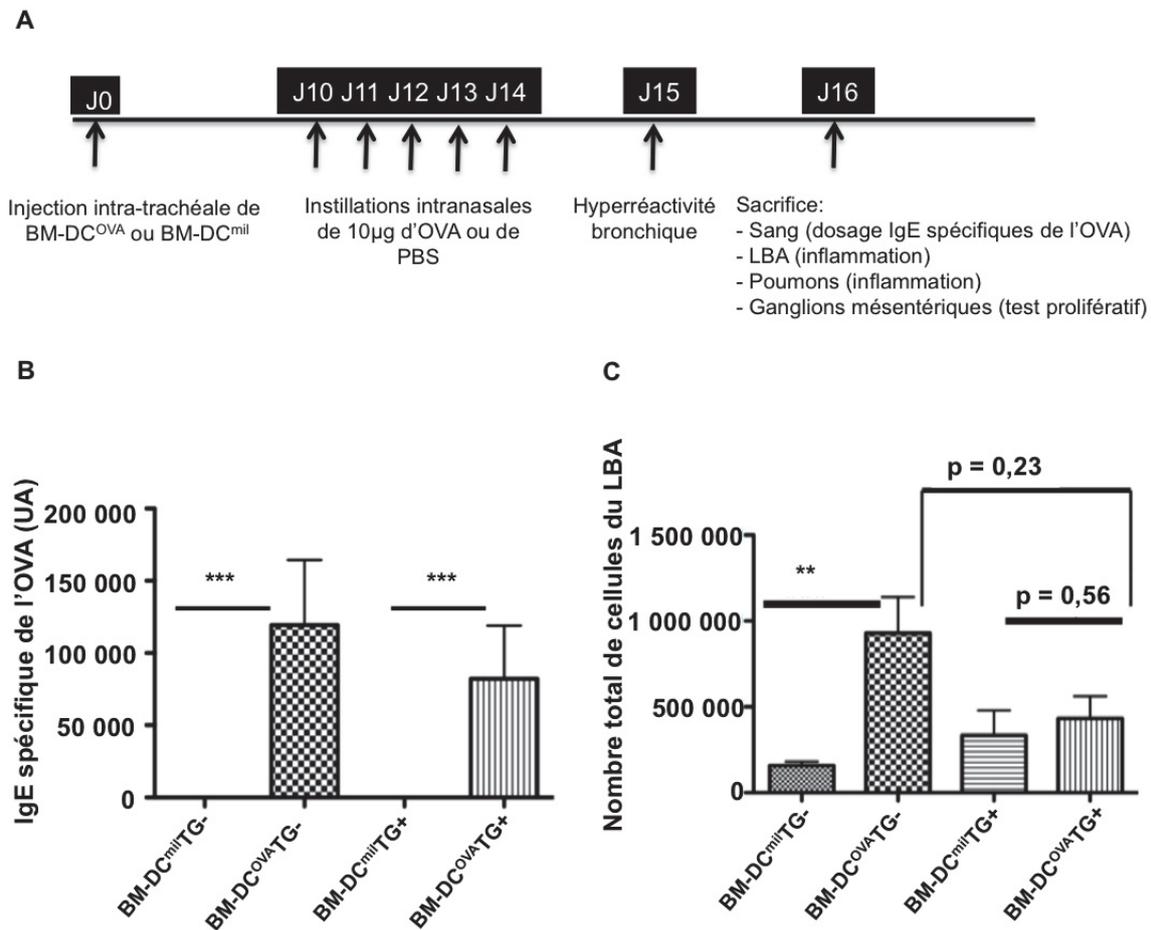


Figure 46. Administration intra-trachéale de BM-DC^{OVA}TG⁺ ou de BM-DC^{OVA}TG⁻ à des souris sauvages C57BL/6J. A) Protocole d'induction d'asthme allergique par injection intratrachéale de BM-DCs. B) Les taux d'IgE spécifiques d'OVA ont été mesurés dans les sérums des souris par ELISA. Les taux d'IgE spécifique d'OVA sont exprimés en unités arbitraires (UA). C) Nombre total des cellules du liquide du LBA. Les résultats sont représentatifs de 6 souris/groupe, moyenne \pm sem. Le test Mann-whitney a été utilisé pour analyser les résultats. Un ** $p < 0,01$ ou un *** $p < 0,001$ est considéré significatif. mil : milieu ; LBA : lavage broncho-alvéolaire.

Discussions et perspectives

Depuis quelques années, un grand intérêt a été accordé aux LTregs (produisant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF- β) qui jouent un rôle central dans l'induction de la tolérance dans l'allergie. Plusieurs études ont tenté de comprendre les mécanismes impliqués dans la génération des LTregs par les CD s afin de réorienter les CD s des patients allergiques vers un profil tolérant inducteur de LTregs.

Un des mécanismes récemment mis en évidence dans la génération des LTregs par les CD s met en jeu les effets immunorégulateurs de la protéine GILZ dans les CD s . Les CD s exprimant GILZ durant l'apprêtement de l'antigène génèrent des LTregs CD25^{high}FOXP3⁺IL-10⁺ spécifiques de l'antigène. Nous avons exploité cette observation pour démontrer que les CD s exprimant GILZ sont capables de prévenir les manifestations allergiques respiratoires dans un modèle murin d'asthme allergique en générant des LTregs suppresseurs. Pour valider ce concept, nous avons généré des souris transgéniques qui surexpriment GILZ constitutivement dans les CD s (souris CD11c-GILZ).

Dans des conditions non inflammatoires et non infectieuses, les souris CD11c-GILZ jeunes, ne présentent aucune caractéristique particulière par rapport aux souris contrôles littermate. Les compartiments myéloïdes et lymphoïdes sont normaux. Nous n'avons pas observé d'expansion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Les CD s et les BM-DCs des souris transgéniques CD11c-GILZ, ne présentent pas de défaut de fonctions (capture et apprêtement). Ces résultats ne sont pas surprenants. Nous pensons que l'effet d'une surexpression de GILZ dans les CD s sur les réponses immunitaires des souris ne sera observable que lors de stimulations antigéniques répétées. A ce jour, nous avons démontré que la surexpression de GILZ permet aux CD s de générer des LTregs après présentation aux LT d'un antigène de rappel (la PPD) donc dans le contexte d'une réponse immune mémoire. GILZ semble donc impliqué dans l'induction de LTregs induits. Or, des études

expérimentales ont démontré que l'induction de LTregs induits est obtenue après une stimulation antigénique chronique. Il nous paraît donc cohérent qu'en dehors de toute stimulation antigénique, nos souris transgéniques qui sur-expriment GILZ constitutivement dans les CD4 n'expriment pas de phénotype particulier ni d'expansion de cellules avec une activité régulatrice.

Des études morphologiques et immuno-histochimiques des organes lymphoïdes sont prévues afin de vérifier si l'architecture de ces organes est normale ou non chez les souris CD4-GILZ.

Les souris ont été sensibilisées à l'OVA selon le modèle d'asthme classique. Les souris transgéniques CD4-GILZ et les souris contrôles non transgéniques ont été efficacement immunisées vis-à-vis de l'OVA puisque nous avons détecté des taux similaires d'IgE spécifiques de l'OVA dans leurs sérums. Les souris transgéniques TG- sensibilisées à l'OVA ont développé une inflammation broncho-alvéolaire et pulmonaire. Nous avons détecté une augmentation significative du nombre total des cellules dans le LBA avec un infiltrat inflammatoire enrichi en LT, macrophages, éosinophiles et neutrophiles en comparaison avec les souris contrôles TG- sensibilisées au PBS.

Les souris transgéniques CD4-GILZ sur un fond génétique Balb/c et C57BL/6J TG+ malgré une réponse systémique développée vis-à-vis de l'OVA n'ont pas développé d'inflammation broncho-alvéolaire ni pulmonaire. Chez ces souris transgéniques CD4-GILZ sensibilisées à l'OVA, nous n'avons observé aucune augmentation significative du nombre total des cellules du LBA comparées à leurs contrôles non sensibilisées. Toutefois, l'analyse de sous-populations présentes dans le LBA a révélé une augmentation significative du nombre de LT chez les souris CD4-GILZ TG+ sensibilisées à l'OVA comparées aux non sensibilisées. Notre hypothèse est que ces LT sont des lymphocytes T régulateurs spécifiques de l'OVA et leur prolifération et activation participent au contrôle de la réaction

allergique chez ces souris. Cette hypothèse devra être vérifiée en analysant le phénotype de ces cellules et leur fonction suppressive.

Les souris CD11c-GILZ TG⁺ sensibilisées à l'OVA n'ont pas développé d'hyperréactivité bronchique. Mais de façon surprenante les souris transgéniques sur les deux fonds génétiques non sensibilisées ont de base une hyperréactivité bronchique élevée voir plus importante que les souris transgéniques CD11c-GILZ sensibilisées à l'OVA. Or nous avons observé chez les souris non sensibilisées une augmentation du nombre de macrophages alvéolaires comparé aux souris contrôles littermate qui pourraient participer à cette modification de la réponse des souris. Nous avons prévu d'une part de réaliser de nouvelles mesures d'hyperréactivité sur animaux trachéotomisés à l'aide du fléxivent. Les paramètres mesurés dans ces conditions sont plus fiables. Nous avons prévu d'autre part de phénotyper ces macrophages alvéolaires afin de déterminer s'il s'agit de macrophages de type M1 ou de type M2. Nous devons également comprendre la raison de cette augmentation de leur nombre chez les souris CD11c-GILZ TG⁺. Les macrophages alvéolaires sont CD11c⁺, il n'est donc pas exclu qu'ils sur-expriment GILZ dans nos souris transgéniques CD11c-GILZ. Ce paramètre sera vérifié rapidement. Si les macrophages alvéolaires des souris transgéniques CD11c-GILZ sur-expriment GILZ, nous déterminerons alors si cette sur-expression les protège de l'apoptose ce qui pourrait expliquer leur surnombre dans le LBA des souris transgéniques CD11c-GILZ.

Nous souhaitons également vérifier si l'hyperréactivité bronchique observée chez les souris transgéniques non sensibilisées est en partie due à la présence de macrophages alvéolaires en surnombre.

Nous avons observé une faible prolifération des cellules des ganglions médiastinaux chez les souris Balb/c et C57BL/6J CD11c-GILZ TG⁺ sensibilisées à l'OVA suite à une restimulation in vitro avec l'OVA comparé aux souris contrôles littermate. Nous prévoyons d'analyser le phénotype de ces cellules et nous anticipons que les cellules qui prolifèrent faiblement dans

les ganglions médiastinaux des souris transgéniques CD11c-GILZ sensibilisées à l'OVA sont des LTregs. L'ensemble de nos résultats a mis en évidence que les souris transgéniques CD11c-GILZ sur-exprimant GILZ dans les cellules CD11c⁺ sont protégées contre le développement de l'asthme allergique quelque soit leur fond génétique.

Nous avons également vérifié que l'absence d'asthme allergique chez les souris transgéniques après une sensibilisation à l'OVA est bien due à la sur-expression de GILZ dans les CD de ces souris par des expériences de transfert adoptif de CD. Nos résultats préliminaires révèlent que l'injection par voie intratrachéale des BM-DC dérivés des souris transgéniques C57BL/6J CD11c-GILZ chargées à l'OVA n'induit pas d'inflammation broncho-alvéolaire chez les souris sauvages C57BL/6J receveuses après une série de challenge intranasal d'OVA. Cette observation semble confirmer le rôle des CD surexprimant GILZ dans la protection des souris transgéniques. Des expériences complémentaires seront réalisées dans ce modèle de transfert adoptif de CD afin de confirmer ces résultats.

La prochaine étape sera d'évaluer les mécanismes impliqués dans la protection des souris transgéniques CD11c-GILZ contre l'asthme en évaluant l'implication et le phénotype de cellules régulatrices induites par les CD sur-exprimant GILZ. Nous testerons également la possibilité d'un transfert de la tolérance induite par les cellules régulatrices identifiées et leur spécificité antigénique. Enfin, nous prévoyons de vérifier le potentiel curatif des CD sur-exprimant GILZ sur un asthme déjà établi.

Cette étude permettra d'élucider le rôle de GILZ par les CD dans l'induction de la tolérance contre les antigènes inhalés et d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques inductrices de tolérance spécifique de l'allergène chez l'homme.

Annexe 1

Matériels et méthodes utilisés dans l'étude des souris transgéniques CD11c-GILZ.

Souris transgéniques

Des souris sur-exprimant GILZ dans les CD ont été générées, souris CD11c-GILZ. La séquence codante pour la protéine GILZ murine a été placée sous le contrôle du promoteur CD11c et en amont d'une séquence β -globin polyA dans un vecteur. Les mâles fondateurs ont été obtenus en utilisant la technologie SpeedyMouse® (Nucléis, Lyon) qui permet l'insertion contrôlée d'une copie du transgène dans un site prédéterminé et permissif du génome de la souris, plus précisément au niveau du locus *hprt* sur le chromosome X.

Les mâles fondateurs (sur fond mixte C57BL/6J x129) ont été croisés jusqu'à 10 générations avec des souris C57BL/6J et Balb/c afin d'obtenir les souris transgéniques sur ces 2 fonds génétiques purs. La transmission du transgène a été stable au cours du temps.

Pour nos expérimentations, nous avons utilisé les souris mâles C57BL/6J ou Balb/c transgéniques (TG+) de 6-8 semaines et les souris mâles contrôles de la même portée n'ayant pas hérité du transgène (TG-).

Purification des cellules

Des suspensions cellulaires ont été préparées à partir des rates, des ganglions drainant la peau, des ganglions mésentériques et du thymus, après dilacération des organes et filtration sur des tamis de 70 μ m (BD Biosciences). Les globules rouges ont été lysés par une solution d'ACK.

Différentes populations cellulaires ont été isolées à partir de ces suspensions. Les cellules NK (Natural Killer) du foie ont été purifiées à partir des lymphocytes hépatiques (obtenus par gradient de Percoll (GE Healthcare) après perfusion et broyage du foie). Les CD, les

LTCD4⁺, LTCD8⁺ et les NK ont été purifiés à partir des différents organes par tri magnétique (Automacs, Miltenyi Biotecs).

Les CD^s dérivées de la moelle osseuse (BM-DCs) ont été obtenues après avoir rincé l'intérieur des 2 fémurs, et mises en culture dans des boîtes de Pétri (100 mm) à 3.10⁶ cellules/ boîte, dans du milieu RPMI 1640 (Invitrogen) additionné de 5% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté (PAA), 50mM de Gentamicine, 50μM βmercaptoéthanol (Invitrogen) et 20 ng/ml de GM-CSF (Abcys). Les BM-DCs ont été récupérées au bout de 10 jours.

Expression de GILZ par RT-PCR

Les ARN totaux des CD^s, BM-DCs, les LT CD4⁺, L TCD8⁺, NK ont été extraits en utilisant le RNeasy minikit (Qiagen), la rétrotranscription a été réalisée en utilisant des primers oligos (dT) et la reverse transcriptase Moloney MuLV-RT (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. L'ADNc a été amplifiée pour le gène de la β-actine (gène de ménage) et pour GILZ murin, sur le Light Cycler LC480 en utilisant le DNA Master SYBRGreen (Roche).

L'expression de GILZ a été normalisée par rapport à l'expression de la β-actine.

Détection de la protéine GILZ par Western Blot

Les protéines ont été extraites à partir des CD^s isolées de la rate, lysées par du tampon Tris 50mM-1% Triton (Sigma). 300μg de protéines sont détectées en utilisant un anticorps primaire anti-GILZ polyclonal de lapin (FL-134 SC-33780, SantaCruz) dilué à 0,25% dans du tampon de saturation (tampon TBS-5% de lait), puis par un anticorps secondaire, un anti-Fab'2 de lapin couplé à une peroxydase (GE Healthcare) dilué à 0,033% dans le tampon de saturation.

Stimulation des BM-DCs

Après 10 jours de différenciation, les BM-DCs ont été récupérées et mises en culture à 1.10^6 cellules/puits dans des plaques de culture de 12 puits, puis stimulées avec de l'ovalbumine (OVA) à $100\mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich), ou du LPS (E.coli) à 10, 100, 1000ng/ml (Sigma) pendant 6h, 18h, 26h et 36h. La sécrétion d'IL-10 et IL-12 dans les surnageants a été évaluée par ELISA (BD Biosciences). La maturation des BM-DCs a été analysée par cytométrie en flux en étudiant l'expression des marqueurs CD80, CD86, CD40, CMH II couplé à un marquage CD11c. Les cellules incubées dans du milieu seul (6h, 18h, 26h et 36h) ont servi de témoin.

Test de Phagocytose

Les CD⁺ isolées de la rate et les BM-DCs ont été resuspendues à $0,5.10^6$ dans $200\mu\text{l}$ de PBS en présence d'OVA alexa488 ou d'OVA-DQ (Invitrogen) à 10 ou $50\mu\text{g/ml}$. Les cellules ont été incubées 30 min ou 1h30 à 37°C et à 4°C . A la fin de l'incubation, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS, et marquées avec un anti-CD11c. Dans chacune de ces conditions, les cellules doublement positives pour les marquages CD11c et FITC sont analysées.

Toutes les acquisitions en cytométrie en flux sont réalisées sur le FACS Calibur ou le LSR II Fortessa (BD Biosciences). Les résultats ont été analysés grâce aux logiciels CellQuest Pro ou FlowJo.

Modèle d'asthme expérimental classique

Les souris mâles CD11c-GILZ C57BL/6J et CD11c-GILZ Balb/c TG^+ et leurs contrôles TG^- ont été immunisées aux jours J0 et J7 par une injection intra-péritonéale de $50\mu\text{g}$ d'OVA (Sigma) adsorbé sur 2mg d'hydroxyde d'aluminium (Thermo Fisher Scientific). Les souris ont ensuite été exposées pendant 4 jours (de J17 à J20) à des instillations

intranasales (i.n.) de 10 μ g d'OVA (une i.n./jour). Les souris contrôles non sensibilisées ont reçu à J0 et à J7 des injections intra-péritonéales de PBS adsorbé sur 2mg d'hydroxyde d'aluminium suivi par des instillations intranasales de PBS de J17 à J20. 24 heures après le dernier challenge allergénique, l'hyper-réactivité bronchique a été mesurée. Ensuite les souris étaient sacrifiées pour analyser le sang, le lavage broncho-alvéolaire, les poumons, et les ganglions médiastinaux.

Modèle d'asthme induit par un transfert adoptif de BM-DCs.

Pour démontrer que l'absence d'asthme allergique chez les souris transgéniques GILZ est due à la surexpression de GILZ dans les CD de ces souris, nous avons utilisé le modèle de sensibilisation de souris par l'injection intra-trachéale de BM-DCs. Les BM-DCs provenant de souris mâles CD11c-GILZ C57BL/6J TG⁺ ou des souris mâles contrôles TG⁻ ont été stimulées avec 100 μ g d'OVA pendant 18h. Après la stimulation antigénique, les BM-DCs ont été récupérées, lavées et resuspendues dans du PBS à 1.10⁶ million/ml. Ces BM-DCs ont été ensuite transférées à des souris mâles C57BL/6J sauvages à J0. De J10 à J15 les souris ont été exposées à des instillations intranasales de 10 μ g d'OVA. Les souris contrôles non sensibilisés ont reçu à J0 des BM-DCs provenant de souris mâles CD11c-GILZ C57BL/6J TG⁺ ou des souris contrôles TG⁻ non chargées. De J10 à J15 les souris ont reçu des instillations intranasales de PBS. Les souris ont été sacrifiées 24h après la dernière instillation intranasale.

Détermination de l'hyper-réactivité bronchique

24 heures après la dernière instillation intranasale, des souris vigiles placées dans des cages du pléthysmographe (Emka technologies, Paris) ont reçu des nébulisations de PBS et des doses croissantes de méthacholine (Sigma-Aldrich) allant de 0,05 M à 0,3M après une courte

période d'acclimatation de 30 minutes des souris dans les cages. Chaque dose a été délivrée aux souris pendant 75 secondes. Les paramètres respiratoires ont été mesurés pendant 20 minutes. L'obstruction bronchique est exprimée par l'indice Penh (enhanced pause). Les valeurs du Penh sont exprimées en pourcentage d'augmentation du Penh pour chaque concentration de méthacholine par rapport à la valeur basale du Penh mesurée directement après la période d'acclimatation des souris.

Récupération et analyse du lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale de xylazine/kétamine (mélange de 700µl de Rompum (Bayer Santé) et de 1ml d'Imalgène (Merial)). Après une trachéotomie, les voies aériennes des souris ont été lavées 6 fois avec du NaCl 0,9% (Laboratoire Aguettant) 2,6 mM EDTA (Invitrogen). Le nombre total des cellules du LBA a été déterminé en microscopie optique par énumération sur lame après une coloration au bleu de trypan (Invitrogen). Un compte différentiel des différentes populations cellulaires du LBA a été déterminé par cytométrie de flux.

Cytométrie en flux

Le phénotypage des populations lymphocytaires a été réalisé en utilisant les anticorps monoclonaux suivant:

Pour les CD⁺ et BM-DCs : CD11c, CD86, CD80, CD40, B7-H1, CMHII, pDCA-1 (e-biosciences)

Pour les LTCD4⁺ et LTCD8⁺ : CD3, CD4, CD8a, CD8b, CD40L, CD69, CD122, GITR, ICOS, LAG3, PD-1, CD103, CD25, Foxp3 (e-biosciences).

Pour les populations cellulaires du LBA : CD3, CD19, LY6C, LY6G, CD11b (BD PharMingen) et F480 (e-biosciences).

Pour l'identification des cellules Foxp3⁺, les marquages de surface sont effectués en premier, puis le marquage Foxp3 intracellulaire sur cellules perméabilisées (selon le protocole du fournisseur).

Analyse histopathologique

Immédiatement après le LBA, les poumons ont été perfusés avec du PBS puis récupérés dans du paraformaldéhyde 4% (VWR International). Après 24 heures, les poumons ont été lavés deux fois avec du PBS pendant 1 heure puis remis dans de l'éthanol 70% à +4°C jusqu'à leur incorporation dans la paraffine. Des coupes de poumons ont été marquées avec de l'hématoxyline-éosine pour déterminer le degré d'infiltration de cellules inflammatoires, avec l'acide périodique de Schiff pour marquer les cellules productrices de mucus, et avec le Trichrome de Masson pour évaluer la dépôt de collagène.

Analyses statistiques

Le test Mann-Whitney a été utilisé pour l'évaluation statistique des données. Les résultats sont considérés significatifs pour le * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA).

Discussion

L'étude de l'expression de GILZ a révélé une expression de GILZ dans les macrophages et les CD4 chez l'homme et chez la souris. GILZ est exprimé par la plupart des cellules hématopoïétiques (lymphocytes B, cellules NK, cellules NKT, neutrophiles) et par quelques cellules non hématopoïétiques comme les cellules épithéliales des voies respiratoires, du rein et des cellules souches mésenchymateuses (363). Les GCs augmentent l'expression de GILZ dans l'ensemble de ces types cellulaires. Les autres facteurs capables d'induire une expression de GILZ, varient en fonction de la cellule considérée (363). Nous avons démontré que le TGF- β et l'IL-10 augmentent l'expression de GILZ dans les macrophages et les cellules dendritiques (339, 340). Il a été également démontré que les effets immunosuppresseurs des GCs étaient dus à l'expression de GILZ dans ces deux types cellulaires. En d'autres termes, l'induction de GILZ par les GCs est nécessaire et suffisante afin qu'ils exercent leurs effets suppresseurs sur les macrophages et les CD4.

D'ailleurs un des rôles principaux de GILZ semble être de contrôler l'état d'activation des cellules. Une extinction de GILZ est nécessaire pour activer les lymphocytes T et B (la fixation de l'antigène sur le TCR ou le BCR diminue l'expression basale de GILZ). A l'inverse, une augmentation de l'expression de GILZ s'accompagne d'une inactivation de ces cellules (363).

Le rôle de GILZ est plus subtil dans les CD4. Il a été ainsi démontré que la présentation de l'antigène par une CD4 selon un mode immunogène ou tolérogène est corrélée avec l'expression de GILZ (350). Une CD4 qui exprime GILZ présente l'antigène aux lymphocytes T (LT) selon un mode tolérogène. Cette voie de présentation aboutit à l'activation de LT régulateurs/suppresseurs spécifiques de l'antigène dont le rôle est de contrôler négativement différents types de réponses immunitaires, y compris les réponses de type allergique.

La figure suivante permet de résumer l'ensemble de ces données dans un contexte physiologique. Selon notre hypothèse, les CD4 expriment des taux élevés de GILZ dans un

état physiologique normal et sous l'influence de différents facteurs comme le TGF- β dans le tube digestif et l'IL-10 dans les poumons (A). Par ce biais, le système immunitaire maintient un état de tolérance vis-à-vis des antigènes inhalés dans le cas des poumons et de la flore commensale dans le cas du tube digestif. La détection des signaux de danger au cours d'une infection s'accompagne d'une diminution de l'expression de GILZ dans les CD4 et/ou dans les macrophages. La réponse immunitaire s'oriente vers la voie immunogène, efficace dans la lutte contre les pathogènes virulents (B).

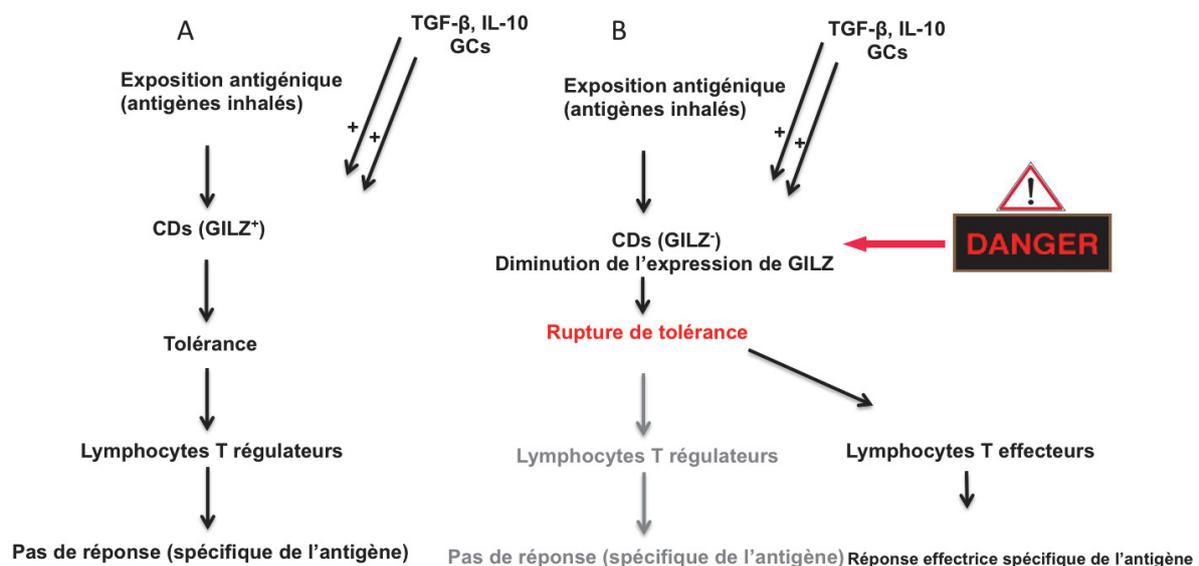


Figure 47. Rôle de GILZ dans la balance entre la réponse immunitaire tolérante (A) et effectrice (B).

Dans les réponses immunitaires de type allergique, notre hypothèse est que l'allergène est perçu dans un contexte inflammatoire comme un antigène virulent entraînant une diminution de l'expression de GILZ dans les CD4 et par conséquent une rupture de tolérance. Les CD4 présentent alors l'allergène selon un mode immunogène et activent des lymphocytes T effecteurs spécifiques de cet allergène en lieu et place de lymphocytes T régulateurs.

Pour valider cette hypothèse, nous avons essayé de jeter les bases d'une immunomodulation spécifique de la réponse allergénique. Il s'agit d'évaluer des approches de manipulation des CD4 de manière à ce qu'elles présentent l'allergène selon un mode tolérogène, conduisant à la génération de LTreg spécifiques de cet allergène et capables d'inhiber l'activation d'autres

lymphocytes T par cet allergène. Cette manipulation des CD^s est obtenue en leur faisant exprimer GILZ.

Nous avons mis en évidence qu'une corticothérapie de 48 heures induit *in vivo* l'expression de GILZ dans les cellules présentatrices de l'antigène circulantes (CPA) des sujets allergiques soit aux acariens (Derp) ou aux pollens des graminées (Phlp). Cette expression de GILZ induite par les GCs a permis de générer des LTregs de type Tr1. L'abrogation de l'expression de GILZ par des siRNA spécifiques dans les CPAs circulantes isolées des sujets allergiques après traitement aux GCs empêche la génération de LTregs. Nous avons également démontré chez les patients allergiques polysensibilisés que les fonctions immunosuppressives des LTregs générés par les CPAs exprimant GILZ sont spécifiques de l'allergène. Les LTregs induits par des CPA GILZ⁺ présentant Phlp inhibent la réponse à Phlp et non pas à Derp et réciproquement. L'ensemble de ces données indique que les CD^s GILZ⁺ influence également la balance entre les LTh2 et les LTregs et réoriente une réponse immunitaire dérégulée chez les patients allergiques vers une réponse tolérogène spécifique de l'allergène, au moins *ex vivo*.

Akdis et al ont déjà décrit une augmentation du nombre de LTr1 chez les patients asthmatiques traités par GCs. Dans cette étude, la cible cellulaire des GCs n'a pas été identifiée. Nos résultats avec les CPAs isolées avant et après le traitement oral par GCs chez les patients allergiques confirment leurs données et démontrent que l'effet thérapeutique des GCs est dû à l'induction de l'expression de GILZ dans les CPAs de ces patients. Notre étude permet d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique pour générer des LTregs chez les patients asthmatiques en modulant l'expression de GILZ dans les CD^s.

Nous avons voulu ensuite comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de GILZ dans les CD^s. Nous connaissons les facteurs qui régulent l'expression de GILZ. Il s'agit de

molécules anti-inflammatoires comme les GCs, l'IL-10 et le TGF- β (339, 340). Mais au moment de l'initiation de cette étude, nous n'avions pas encore identifié de facteurs capables d'inhiber ou de diminuer l'expression de GILZ. Nos recherches s'étaient orientées vers des facteurs connus pour activer les CD4 ou des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IFN- γ , ou le CD40L sans succès. En revanche, nous avons démontré que les surnageants de mastocytes récupérés 30min et 24h après l'activation des MCs via la dimérisation de leur récepteur de haute affinité aux IgE diminuent l'expression de GILZ dans les CD4 humaines. Parmi les médiateurs de MCs, nous avons identifié que l'histamine et le LTB₄ était capable de reproduire les effets des surnageants des MCs sur les CD4.

Cette diminution de l'expression de GILZ s'accompagne d'une altération de la capacité des CD4 à activer des LTregs. Nous avons également démontré que la diminution de l'expression de GILZ est nécessaire pour que l'histamine puisse exercer ses effets adjuvants sur les CD4.

Nos résultats sont conformes avec toutes les données déjà publiées sur l'effet adjuvant des mastocytes et de l'histamine sur les CD4. L'histamine, d'après les travaux de l'équipe de Caron, est capable d'activer les cellules dendritiques humaines et d'induire leur maturation. Une étude complémentaire a également démontré le rôle de l'histamine dans l'activation des cellules de Langerhans et dans leur migration vers les ganglions drainant le tissu (au cours d'une sensibilisation des souris par voie sous-cutanée) (163). D'autre part, il a été démontré dans des études récentes que les mastocytes peuvent jouer un rôle d'adjuvant sur les réponses immunitaires. Les souris déficientes en mastocytes infectés par différents pathogènes (autres que des parasites) peuvent survivre à l'infection. Toutefois, les taux de survie sont plus bas par rapport aux souris sauvages normales et le délai d'élimination du pathogène est plus long chez les souris dépourvues de mastocytes. Toutes ces études n'ont pas identifié le mécanisme par lequel les MCs et l'histamine active les CD4. Notre étude a permis de démontrer que les médiateurs libérés par les MCs après une activation par des IgE dont l'histamine activent les

CDs en régulant négativement leur expression de GILZ. Ce mécanisme permettrait d'expliquer comment les MCs activés au cours des réactions allergiques pourraient contribuer à l'entretien de la réponse immunitaire inadaptée vis-à-vis des allergènes. Ces résultats présentent un intérêt au delà du contexte des réactions allergiques. En effet, l'histamine peut être produite par d'autres types cellulaires que les MCs comme les cellules myéloïdes immatures CD11b⁺LY6G⁺. Il a été démontré récemment qu'une déficience en histamine (chez les souris HDC^{-/-}) se traduit par une altération de la maturation de ces cellules et ainsi une augmentation de la sensibilité des souris au développement des tumeurs. On peut supposer que cette déficience en histamine s'accompagne également d'un défaut de régulation de l'expression de GILZ chez ces animaux. Par ailleurs quelques études ont révélé chez l'homme que le statut allergique protège contre le risque de développement des maladies cancéreuses, risque estimé par rapport à la population générale (387-390)

Nous avons élucidé le mécanisme impliqué dans les effets régulateurs de l'histamine sur l'expression de GILZ induite par la DEX

Labat et al ont démontré que le récepteur des GCs activé coopère avec Foxo3 pour transactiver le promoteur de GILZ (332). Cette association d'effet aboutit à une augmentation de l'expression de GILZ. Il est également connu que la phosphorylation de Foxo3 induit sa localisation cytoplasmique alors que la diminution de la phosphorylation de Foxo3 favorise sa localisation nucléaire et augmente son activité transcriptionnelle sur le gène de GILZ. Les voies PI3K/AKT et la voie des MAPK (P38 et ERK) sont connus pour phosphoryler Foxo3 et promouvoir sa localisation cytoplasmique et inhibent ainsi son activité transcriptionnelle.

Nos résultats ont démontré que l'histamine augmente la phosphorylation de ERK et de Foxo3 au niveau de la sérine 294 dans les CDs et par ce biais contrôle négativement l'expression de GILZ. Toutefois, le récepteur d'histamine impliqué dans ses effets reste à identifier.

Ces études *in vitro* ont été complétées par une évaluation *in vivo* du rôle de GILZ dans les fonctions des CD. Afin de démontrer que les CD exprimant GILZ sont capables de prévenir les manifestations allergiques respiratoires en générant des LTregs suppresseurs, nous avons généré des souris transgéniques surexprimant GILZ de façon constitutive dans les CD.

Dans des conditions physiologiques, en dehors de toute stimulation antigénique, les souris CD11c-GILZ ont une hématopoïèse normale et des compartiments myéloïdes et lymphoïdes normaux. Nous n'avons pas observé d'expansion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ chez les souris jeunes. Les CD et les BM-DCs transgéniques, ne présentent pas de défaut de fonctions (capture et apprêtement). Le phénotype « basal » des souris CD11c-GILZ semble confirmer cette hypothèse. Nous pensons que GILZ joue un rôle dans l'activation des LTregs induits d'après nos observations chez l'homme *in vitro*.

Nos résultats préliminaires ont révélé que les souris transgéniques CD11c-GILZ sur un fond génétique C57BL/6J et Balb/c ne développent pas d'hyperréactivité bronchique ni d'inflammation broncho-pulmonaire dans un modèle d'asthme allergique induit par des injections intrapéritonéales d'OVA suivies d'instillations intranasales. Et ce malgré l'induction d'une réponse systémique anti-OVA confirmée par la production de taux élevés d'IgE anti-OVA.

Nous avons également vérifié que l'absence de la protection des souris transgéniques est bien due à la sur-expression de GILZ dans leurs CD par des expériences de transfert adoptif de CD. Nos résultats préliminaires révèlent que l'injection par voie intra-trachéale des BM-DC dérivés des souris transgéniques CD11c-GILZ chargées à l'OVA n'induit pas d'inflammation broncho-alvéolaire chez les souris sauvages receveuses sauvages après plusieurs instillations intranasales d'OVA selon le modèle décrit par Bart Lambrecht. Cette observation semble confirmer que la protection des souris transgéniques CD11c-GILZ est assurée par les CD.

sur-exprimant GILZ mais devra être complétée par l'étude d'autres paramètres comme l'hyperréactivité bronchique.

Ces résultats sont très prometteurs mais il reste à démontrer que la protection des souris transgéniques est assurée par l'induction de lymphocytes T régulateurs et à élucider le mode d'action de ces cellules régulatrices. Chez l'homme, nous savons que les CD4 qui sur-expriment GILZ au moment de la présentation de l'antigène induisent des LTregs CD25^{high} Foxp3⁺. Nous savons également que ces LTregs exercent leurs effets immunosuppresseurs par l'intermédiaire d'IL-10.

Conclusion et perspectives

L'objectif de mes travaux de recherche est d'envisager de nouvelles stratégies d'immunomodulation de la réponse immunitaire allergique, centrées sur la régulation de l'expression de GILZ dans les CD4⁺ Tregs.

Il s'agit d'évaluer des approches de manipulation des CD4⁺ Tregs de manière à ce qu'elles présentent l'allergène selon un mode tolérogène, conduisant à la génération de LTregs spécifiques de cet allergène et capables d'inhiber l'activation d'autres lymphocytes T (pour ce même allergène).

Si mes hypothèses se révèlent exactes, l'immunothérapie ciblant les CD4⁺ Tregs devra combiner, dans l'asthme allergique, une administration par voie aérienne de l'allergène et d'un inducteur de l'expression de GILZ.

Afin de préparer au mieux cette perspective thérapeutique plusieurs éléments restent à étudier:

- L'étude de l'expression de GILZ par les différentes sous-populations de CD4⁺ Tregs in vivo permettrait de déterminer si l'expression éventuelle de GILZ par des CD4⁺ Tregs est liée à leur origine et/ou leur stade de différenciation et/ou leur état d'activation
- Il est également crucial d'évaluer le potentiel curatif des CD4⁺ Tregs GILZ⁺ dans le traitement curatif d'un asthme allergique établi. Cette question sera posée dans nos souris transgéniques CD11c-GILZ.
- Il est également important d'évaluer la pertinence de nos résultats chez des souris dont les CD4⁺ Tregs sont déficientes pour le gène GILZ.
- Il est nécessaire de développer des techniques permettant de cibler les CD4⁺ Tregs et de leur apporter ainsi simultanément un facteur inducteur de GILZ et l'allergène. Nous testerons actuellement l'efficacité des nanoparticules bio-dégradables de poly(lactide-co-glycolide) (PLGL) renfermant de la DEX et de l'OVA à cibler les CD4⁺ Tregs et induire ainsi des LTregs. Ces nanoparticules seront à terme peuvent injectées par voie intratrachéale ou intranasale à des souris dont nous évaluerons ensuite leur protection ou non contre un asthme.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sont prometteurs et contribuent à améliorer notre compréhension du rôle de GILZ dans la fonction régulatrice des CD4 et le potentiel thérapeutique de GILZ.

Mes résultats confortent la possibilité de développer de nouvelles stratégies d'immunomodulation, centrées sur la régulation de l'expression de GILZ dans les CD4 au delà des réactions allergiques. Nous espérons ainsi à long terme pouvoir mettre au point des «vaccins inducteurs de tolérance» spécifiques d'antigènes, dans le cas des maladies auto-immunes, de rejet de greffe ou de l'allergie ou à l'inverse des «vaccins immunogènes» afin d'améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale.

Références bibliographiques

1. Pearce, N., Ait-Khaled, N., Beasley, R., Mallol, J., Keil, U., Mitchell, E., and Robertson, C. 2007. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax* 62:758-766.
2. Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L.P., and Hamid, Q. 2003. Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:1293-1298.
3. Hamid, Q., Tulic, M.K., Liu, M.C., and Moqbel, R. 2003. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:S5-S12; discussion S12-17.
4. Holgate, S.T. 2005. Exacerbations: the asthma paradox. *Am J Respir Crit Care Med* 172:941-943.
5. Gold, M.S., and Kemp, A.S. 2005. Atopic disease in childhood. *The Medicine Journal of Australia* 182:298-304.
6. Vladich, F.D., Brazille, S.M., Stern, D., Peck, M.L., Ghittoni, R., and Vercelli, D. 2005. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *The Journal of clinical investigation* 115:747-754.
7. Heinzmann, A., Mao, X.Q., Akaiwa, M., Kreomer, R.T., Gao, P.S., Ohshima, K., Umeshita, R., Abe, Y., Braun, S., Yamashita, T., et al. 2000. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Human Molecular Genetics* 9:549-559.
8. He, J.Q., Chan-Yeung, M., Becker, A.B., Dimich-Ward, H., Ferguson, A.C., Manfreda, J., Watson, W.T., and Sandford, A.J. 2003. Genetic variants of the IL13 and IL4 genes and atopic diseases in at-risk children. *Genes & Immunity* 4:385-389.
9. Hummelshoj, T., Bodtger, U., Datta, P., Malling, H.J., Oturai, A., Poulsen, L.K., Ryder, L.P., Sorensen, P.S., Svejgaard, E., and Svejgaard, A. 2003. Association between an interleukin-13 promoter polymorphism and atopy. *European Journal of Immunogenetics* 30:355-359.
10. van der Pouw Kraan, T.C., van Veen, A., Boeijs, L.C., van Tuyl, S.A., de Groot, E.R., Stapel, S.O., Bakker, A., Verweij, C.L., Aarden, L.A., and van der Zee, J.S. 1999. An IL-13 promoter polymorphism associated with increased risk of allergic asthma. *Genes & Immunity* 1:61-65.
11. Chetta, A., Foresi, A., Marangio, E., and Olivieri, D. 2005. Psychological implications of respiratory health and disease. *Respiration* 72:210-215.
12. Ninan, T.K., and Russell, G. 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *British medical journal* 304:873-875.
13. Zannolli, R., and Morgese, G. 1997. Does puberty interfere with asthma? *Med Hypotheses* 48:27-32.
14. Haggerty, C.L., Ness, R.B., Kelsey, S., and Waterer, G.W. 2003. The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 90:284-291; quiz 291-283, 347.
15. Hartert, T.V., and Peebles, R.S., Jr. 2000. Epidemiology of asthma: the year in review. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 6:4-9.
16. Janeway Charles A., T.P., Walport M., Sciomick M.J. *Immunobiology, The immune system in health and disease*. New York and London: Garland Science Publishing.
17. Akdis, C.A. 2006. Allergy and hypersensitivity: mechanisms of allergic disease. *Current opinion in immunology* 18:718-726.
18. Braun-Fahrlander, C. 2003. Environmental exposure to endotoxin and other microbial products and the decreased risk of childhood atopy: evaluating developments since April 2002. *Current opinion in immunology* 3:325-329.
19. Malo, J.L., Lemiere, C., Gautrin, D., and Labrecque, M. 2004. Occupational asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 10:57-61.
20. Chalmers, G.W., Macleod, K.J., Little, S.A., Thomson, L.J., McSharry, C.P., and Thomson, N.C. 2002. Influence of cigarette smoking on inhaled corticosteroid treatment in mild asthma. *Thorax* 57:226-230.
21. Lazarus, S.C., Chinchilli, V.M., Rollings, N.J., Boushey, H.A., Cherniack, R., Craig, T.J., Deykin, A., DiMango, E., Fish, J.E., Ford, J.G., et al. 2007. Smoking affects response to inhaled corticosteroids or leukotriene receptor antagonists in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175:783-790.
22. D'Amato, G. 2001. Airborne paucimicronic allergen-carrying particles and seasonal respiratory allergy. *Allergy* 56:1109-1111.
23. Wjst, M., Reitmeir, P., Dold, S., Wulff, A., Nicolai, T., von Loeffelholz-Colberg, E.F., and von Mutius, E. 1993. Road traffic and adverse effects on respiratory health in children. *British medical journal* 307:596-600.

24. Gauderman, W.J., Avol, E., Gilliland, F., Vora, H., Thomas, D., Berhane, K., McConnell, R., Kuenzli, N., Lurmann, F., Rappaport, E., et al. 2004. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *The New England Journal of Medicine* 351:1057-1067.
25. Gauderman, W.J., Gilliland, G.F., Vora, H., Avol, E., Stram, D., McConnell, R., Thomas, D., Lurmann, F., Margolis, H.G., Rappaport, E.B., et al. 2002. Association between air pollution and lung function growth in southern California children: results from a second cohort. *American journal of respiratory and critical care medicine* 166:76-84.
26. Gauderman, W.J., McConnell, R., Gilliland, F., London, S., Thomas, D., Avol, E., Vora, H., Berhane, K., Rappaport, E.B., Lurmann, F., et al. 2000. Association between air pollution and lung function growth in southern California children. *American journal of respiratory and critical care medicine* 162:1383-1390.
27. Gauderman, W.J., Vora, H., McConnell, R., Berhane, K., Gilliland, F., Thomas, D., Lurmann, F., Avol, E., Kunzli, N., Jerrett, M., et al. 2007. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *Lancet* 369:571-577.
28. Beggs, P.J. 2004. Impacts of climate change on aeroallergens: past and future. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 34:1507-1513.
29. D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M., and Liccardi, G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology* 20:95-102; quiz following 102.
30. D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M., and Holgate, S. 2005. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 35:1113-1124.
31. Annesi-Maesano, I., Moreau, D., Caillaud, D., Lavaud, F., Le Moulec, Y., Taytard, A., Pauli, G., and Charpin, D. 2007. Residential proximity fine particles related to allergic sensitisation and asthma in primary school children. *Respiratory Medicine* 101:1721-1729.
32. Zanolin, M.E., Pattaro, C., Corsico, A., Bugiani, M., Carrozzi, L., Casali, L., Dallari, R., Ferrari, M., Marinoni, A., Migliore, E., et al. 2004. The role of climate on the geographic variability of asthma, allergic rhinitis and respiratory symptoms: results from the Italian study of asthma in young adults. *Allergy* 59:306-314.
33. Lavoie, K.L., Bacon, S.L., Barone, S., Cartier, A., Ditto, B., and Labrecque, M. 2006. What is worse for asthma control and quality of life: depressive disorders, anxiety disorders, or both? *Chest* 130:1039-1047.
34. Saint-Pierre, P., Bourdin, A., Chanez, P., Daures, J.P., and Godard, P. 2006. Are overweight asthmatics more difficult to control? *Allergy* 61:79-84.
35. Chanez, P., Wenzel, S.E., Anderson, G.P., Anto, J.M., Bel, E.H., Boulet, L.P., Brightling, C.E., Busse, W.W., Castro, M., Dahlen, B., et al. 2007. Severe asthma in adults: what are the important questions? *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1337-1348.
36. Shore, S.A. 2008. Obesity and asthma: possible mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121:1087-1093; quiz 1094-1085.
37. Boulet, L.P., and Franssen, E. 2007. Influence of obesity on response to fluticasone with or without salmeterol in moderate asthma. *Respiratory Medicine* 101:2240-2247.
38. Peters-Golden, M., Swern, A., Bird, S.S., Hustad, C.M., Grant, E., and Edelman, J.M. 2006. Influence of body mass index on the response to asthma controller agents. *European Respiratory Journal* 27:495-503.
39. van Odijk, J., Kull, I., Borres, M.P., Brandtzaeg, P., Edberg, U., Hanson, L.A., Host, A., Kuitunen, M., Olsen, S.F., Skerfving, S., et al. 2003. Breastfeeding and allergic disease: a multidisciplinary review of the literature (1966-2001) on the mode of early feeding in infancy and its impact on later atopic manifestations. *Allergy* 58:833-843.
40. Zeiger, R.S. 2003. Food allergen avoidance in the prevention of food allergy in infants and children. *Pediatrics* 111:1662-1671.
41. Kull, I., Almqvist, C., Lilja, G., Pershagen, G., and Wickman, M. 2004. Breast-feeding reduces the risk of asthma during the first 4 years of life. *The Journal of allergy and clinical immunology* 114:755-760.
42. Scholtens, S., Wijga, A.H., Brunekreef, B., Kerkhof, M., Hoekstra, M.O., Gerritsen, J., Aalberse, R., de Jongste, J.C., and Smit, H.A. 2009. Breast feeding, parental allergy and asthma in children followed for 8 years. The PIAMA birth cohort study. *Thorax* 64:604-609.
43. Sears, M.R., Greene, J.M., Willan, A.R., Taylor, D.R., Flannery, E.M., Cowan, J.O., Herbison, G.P., and Poulton, R. 2002. Long-term relation between breastfeeding and development of atopy and asthma in children and young adults: a longitudinal study. *Lancet* 360:901-907.

44. Verhasselt, V., Milcent, V., Cazareth, J., Kanda, A., Fleury, S., Dombrowicz, D., Glaichenhaus, N., and Julia, V. 2008. Breast milk-mediated transfer of an antigen induces tolerance and protection from allergic asthma. *Nature Medicine* 14:170-175.
45. Mosconi, E., Rekima, A., Seitz-Polski, B., Kanda, A., Fleury, S., Tissandie, E., Monteiro, R., Dombrowicz, D.D., Julia, V., Glaichenhaus, N., et al. 2010. Breast milk immune complexes are potent inducers of oral tolerance in neonates and prevent asthma development. *Mucosal immunology* 3:461-474.
46. Strachan, D.P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *British medical journal* 299:1259-1260.
47. Ramsey, C.D., and Celedon, J.C. 2005. The hygiene hypothesis and asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11:14-20.
48. Racila, D.M., and Kline, J.N. 2005. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *The Journal of allergy and clinical immunology* 116:1202-1205.
49. Sudo, N., Yu, X.N., Aiba, Y., Oyama, N., Sonoda, J., Koga, Y., and Kubo, C. 2002. An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 32:1112-1116.
50. Linehan, M.F., Frank, T.L., Hazell, M.L., Francis, H.C., Morris, J.A., Baxter, D.N., and Niven, R.M. 2007. Is the prevalence of wheeze in children altered by neonatal BCG vaccination? *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1079-1085.
51. Romagnani, S. 2007. Coming back to a missing immune deviation as the main explanatory mechanism for the hygiene hypothesis. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1511-1513.
52. Koski, G.K., Kariko, K., Xu, S., Weissman, D., Cohen, P.A., and Czerniecki, B.J. 2004. Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *Journal of immunology* 172:3989-3993.
53. Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S., and Maggi, E. 1999. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *Journal of immunology* 163:5946-5953.
54. Debarry, J., Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gatermann, S., Renz, H., Holst, O., et al. 2007. Acinetobacter lwoffii and Lactococcus lactis strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1514-1521.
55. Santeliz, J.V., Van Nest, G., Traquina, P., Larsen, E., and Wills-Karp, M. 2002. A CpG oligodeoxynucleotide reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109:455-462.
56. Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
57. Sertl, K., Takemura, T., Tschachler, E., Ferrans, V.J., Kaliner, M.A., and Shevach, E.M. 1986. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *The Journal of experimental medicine* 163:436-451.
58. Donnenberg, V.S., and Donnenberg, A.D. 2003. Identification, rare-event detection and analysis of dendritic cell subsets in broncho-alveolar lavage fluid and peripheral blood by flow cytometry. *Frontiers in Biosciences* 8:s1175-1180.
59. Schon-Hegrad, M.A., Oliver, J., McMenamin, P.G., and Holt, P.G. 1991. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *The Journal of experimental medicine* 173:1345-1356.
60. Cochand, L., Isler, P., Songeon, F., and Nicod, L.P. 1999. Human lung dendritic cells have an immature phenotype with efficient mannose receptors. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 21:547-554.
61. Demedts, I.K., Brusselle, G.G., Vermaelen, K.Y., and Pauwels, R.A. 2005. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32:177-184.
62. Holt, P.G., Strickland, D.H., Wikstrom, M.E., and Jahnsen, F.L. 2008. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. *Nature reviews. Immunology* 8:142-152.
63. Demedts, I.K., Bracke, K.R., Maes, T., Joos, G.F., and Brusselle, G.G. 2006. Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 35:387-393.
64. Angkasekwinai, P., Chang, S.H., Thapa, M., Watarai, H., and Dong, C. 2010. Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature immunology* 11:250-256.

65. Plantinga, M., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. 2010. Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. *European journal of immunology* 40:2112-2118.
66. Willart, M.A., and Hammad, H. 2010. Alarming dendritic cells for allergic sensitization. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 59:95-103.
67. Reis e Sousa, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nature reviews. Immunology* 6:476-483.
68. Lambrecht, B.N., and Hammad, H. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews. Immunology* 3:994-1003.
69. Jakubzick, C., Bogunovic, M., Bonito, A.J., Kuan, E.L., Merad, M., and Randolph, G.J. 2008. Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 205:2839-2850.
70. Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., and Pauwels, R.A. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 193:51-60.
71. Randolph, G.J., Angeli, V., and Swartz, M.A. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature reviews. Immunology* 5:617-628.
72. Vermaelen, K., and Pauwels, R. 2005. Pulmonary dendritic cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172:530-551.
73. Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N., and Randolph, G.J. 2006. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *Journal of immunology* 176:3578-3584.
74. Scandella, E., Men, Y., Legler, D.F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B., and Groettrup, M. 2004. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 103:1595-1601.
75. Hammad, H., de Heer, H.J., Soullie, T., Hoogsteden, H.C., Trottein, F., and Lambrecht, B.N. 2003. Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *Journal of immunology* 171:3936-3940.
76. Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263-266.
77. Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* 3:984-993.
78. Keir, M.E., and Sharpe, A.H. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunological Reviews* 204:128-143.
79. June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., and Thompson, C.B. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 15:321-331.
80. Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of experimental medicine* 180:1263-1272.
81. Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *The Journal of experimental medicine* 184:747-752.
82. Marshall, J.D., Secrist, H., DeKruyff, R.H., Wolf, S.F., and Umetsu, D.T. 1995. IL-12 inhibits the production of IL-4 and IL-10 in allergen-specific human CD4+ T lymphocytes. *Journal of immunology* 155:111-117.
83. Dao, T., Mehal, W.Z., and Crispe, I.N. 1998. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *Journal of immunology* 161:2217-2222.
84. Smits, H.H., van Beelen, A.J., Hesse, C., Westland, R., de Jong, E., Soeteman, E., Wold, A., Wierenga, E.A., and Kapsenberg, M.L. 2004. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *European journal of immunology* 34:1371-1380.
85. Dodge, I.L., Carr, M.W., Cernadas, M., and Brenner, M.B. 2003. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *Journal of immunology* 170:4457-4464.
86. Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R.A. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 185:461-469.
87. Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., et al. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15:985-995.
88. Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature immunology* 2:725-731.

89. Schandene, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., Devos, R., de Boer, M., and Goldman, M. 1994. B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *Journal of immunology* 152:4368-4374.
90. Taga, K., Mostowski, H., and Tosato, G. 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood* 81:2964-2971.
91. Roncarolo, M.G., Levings, M.K., and Traversari, C. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 193:F5-9.
92. Sato, K., Yamashita, N., Baba, M., and Matsuyama, T. 2003. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 101:3581-3589.
93. Moller, G.M., Overbeek, S.E., Van Helden-Meeuwssen, C.G., Van Haarst, J.M., Prens, E.P., Mulder, P.G., Postma, D.S., and Hoogsteden, H.C. 1996. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 26:517-524.
94. Tunon-De-Lara, J.M., Redington, A.E., Bradding, P., Church, M.K., Hartley, J.A., Semper, A.E., and Holgate, S.T. 1996. Dendritic cells in normal and asthmatic airways: expression of the alpha subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI -alpha). *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 26:648-655.
95. van den Heuvel, M.M., Vanhee, D.D., Postmus, P.E., Hoefsmit, E.C., and Beelen, R.H. 1998. Functional and phenotypic differences of monocyte-derived dendritic cells from allergic and nonallergic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* 101:90-95.
96. Charbonnier, A.S., Hammad, H., Gosset, P., Stewart, G.A., Alkan, S., Tonnel, A.B., and Pestel, J. 2003. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *Journal of Leukocyte Biology* 73:91-99.
97. Hammad, H., Charbonnier, A.S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G.A., Tonnel, A.B., and Pestel, J. 2001. Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 98:1135-1141.
98. Huang, H.J., Lin, Y.L., Liu, C.F., Kao, H.F., and Wang, J.Y. 2011. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma. *Mucosal immunology* 4:519-527.
99. Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A.H., Knop, J., and Saloga, J. 2001. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:242-249.
100. Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *Journal of immunology* 166:4312-4318.
101. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 192:1213-1222.
102. Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A.H. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of immunology* 159:4772-4780.
103. Deslee, G., Charbonnier, A.S., Hammad, H., Angyalosi, G., Tillie-Leblond, I., Mantovani, A., Tonnel, A.B., and Pestel, J. 2002. Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 110:763-770.
104. Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M., and Puzo, G. 2001. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *Journal of immunology* 166:7477-7485.
105. Jahnsen, F.L., Lund-Johansen, F., Dunne, J.F., Farkas, L., Hays, R., and Brandtzaeg, P. 2000. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *Journal of immunology* 165:4062-4068.
106. Lambrecht, B.N., De Veerman, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Thielemans, K., and Pauwels, R.A. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation* 106:551-559.
107. Lambrecht, B.N., Salomon, B., Klatzmann, D., and Pauwels, R.A. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *Journal of immunology* 160:4090-4097.
108. van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *The Journal of experimental medicine* 201:981-991.
109. Lambrecht, B.N., Carro-Muino, I., Vermaelen, K., and Pauwels, R.A. 1999. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 20:1165-1174.

110. de Heer, H.J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *The Journal of experimental medicine* 200:89-98.
111. Kool, M., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Boon, L., Smit, J.J., Coyle, A., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., et al. 2009. An anti-inflammatory role for plasmacytoid dendritic cells in allergic airway inflammation. *Journal of immunology* 183:1074-1082.
112. Hammad, H., and Lambrecht, B.N. 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118:331-336.
113. Kiss, A., Montes, M., Susarla, S., Jaensson, E.A., Drouin, S.M., Wetsel, R.A., Yao, Z., Martin, R., Hamzeh, N., Adelagun, R., et al. 2007. A new mechanism regulating the initiation of allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 120:334-342.
114. Strickland, D.H., Upham, J.W., and Holt, P.G. 2010. Epithelial-dendritic cell interactions in allergic disorders. *Current opinion in immunology* 22:789-794.
115. Hammad, H., and Lambrecht, B.N. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nature reviews. Immunology* 8:193-204.
116. Liu, Y.J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.H., Malefyt Rde, W., Omori, M., Zhou, B., and Ziegler, S.F. 2007. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual Reviews Immunology* 25:193-219.
117. Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Cosio, B., Chung, K.F., Adcock, I.M., and Barnes, P.J. 2002. A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8921-8926.
118. Wang, Y.H., Ito, T., Wang, Y.H., Homey, B., Watanabe, N., Martin, R., Barnes, C.J., McIntyre, B.W., Gilliet, M., Kumar, R., et al. 2006. Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity* 24:827-838.
119. Holgate, S.T., and Polosa, R. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nature Reviews Immunology* 8:218-230.
120. Adcock, I.M., Caramori, G., and Chung, K.F. 2008. New targets for drug development in asthma. *Lancet* 372:1073-1087.
121. Stampfli, M.R., Wiley, R.E., Neigh, G.S., Gajewska, B.U., Lei, X.F., Snider, D.P., Xing, Z., and Jordana, M. 1998. GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice. *The Journal of clinical investigation* 102:1704-1714.
122. Tamachi, T., Maezawa, Y., Ikeda, K., Kagami, S., Hatano, M., Seto, Y., Suto, A., Suzuki, K., Watanabe, N., Saito, Y., et al. 2006. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 118:606-614.
123. Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.
124. Goswami, S., Angkasekwinai, P., Shan, M., Greenlee, K.J., Barranco, W.T., Polikepahad, S., Seryshev, A., Song, L.Z., Redding, D., Singh, B., et al. 2009. Divergent functions for airway epithelial matrix metalloproteinase 7 and retinoic acid in experimental asthma. *Nature Immunology* 10:496-503.
125. Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., et al. 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31:84-98.
126. Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A., and Lloyd, C.M. 2009. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:772-781.
127. Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., et al. 2009. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *Journal of immunology* 183:6469-6477.
128. Prefontaine, D., Nadigel, J., Chouiali, F., Audusseau, S., Semlali, A., Chakir, J., Martin, J.G., and Hamid, Q. Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:752-754.
129. Lee, H.C., and Ziegler, S.F. 2007. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:914-919.
130. Rusznak, C., Sapsford, R.J., Devalia, J.L., Shah, S.S., Hewitt, E.L., Lamont, A.G., Davies, R.J., and Lozewicz, S. 2001. Interaction of cigarette smoke and house dust mite allergens on inflammatory

- mediator release from primary cultures of human bronchial epithelial cells. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 31:226-238.
131. Xanthou, G., Alissafi, T., Semitekolou, M., Simoes, D.C., Economidou, E., Gaga, M., Lambrecht, B.N., Lloyd, C.M., and Panoutsakopoulou, V. 2007. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nature Medecine* 13:570-578.
132. Rygiel, T.P., Rijkers, E.S., de Ruiter, T., Stolte, E.H., van der Valk, M., Rimmelzwaan, G.F., Boon, L., van Loon, A.M., Coenjaerts, F.E., Hoek, R.M., et al. 2009. Lack of CD200 enhances pathological T cell responses during influenza infection. *Journal of immunology* 183:1990-1996.
133. Snelgrove, R.J., Goulding, J., Didierlaurent, A.M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., Gwyer, E., Sedgwick, J.D., Barclay, A.N., and Hussell, T. 2008. A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nature immunology* 9:1074-1083.
134. Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F.B., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. 2006. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *European journal of immunology* 36:2472-2482.
135. Unger, W.W., Laban, S., Kleijwegt, F.S., van der Slik, A.R., and Roep, B.O. 2009. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *European journal of immunology* 39:3147-3159.
136. Brehm, J.M., Celedon, J.C., Soto-Quiros, M.E., Avila, L., Hunninghake, G.M., Forno, E., Laskey, D., Sylvia, J.S., Hollis, B.W., Weiss, S.T., et al. 2009. Serum vitamin D levels and markers of severity of childhood asthma in Costa Rica. *American journal of respiratory and critical care medicine* 179:765-771.
137. Holt, P.G. 1978. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. *The American review of respiratory disease* 118:791-793.
138. Nicod, L.P., Galve-De-Rochemonteix, B., and Dayer, J.M. 1994. Modulation of IL-1 receptor antagonist and TNF-soluble receptors produced by alveolar macrophages and blood monocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 725:323-330.
139. Bingisser, R.M., and Holt, P.G. 2001. Immunomodulating mechanisms in the lower respiratory tract: nitric oxide mediated interactions between alveolar macrophages, epithelial cells, and T-cells. *Swiss medical weekly* 131:171-179.
140. Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. 1998. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *Journal of immunology* 160:5729-5734.
141. Holt, P.G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P.G., Kraal, G., and Thepen, T. 1993. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *The Journal of experimental medicine* 177:397-407.
142. Paolucci, C., Rovere, P., De Nadai, C., Manfredi, A.A., and Clementi, E. 2000. Nitric oxide inhibits the tumor necrosis factor alpha-regulated endocytosis of human dendritic cells in a cyclic GMP-dependent way. *The Journal of biological chemistry* 275:19638-19644.
143. Thepen, T., Van Rooijen, N., and Kraal, G. 1989. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *The Journal of experimental medicine* 170:499-509.
144. Morris, D.G., Huang, X., Kaminski, N., Wang, Y., Shapiro, S.D., Dolganov, G., Glick, A., and Sheppard, D. 2003. Loss of integrin alpha(v)beta6-mediated TGF-beta activation causes Mmp12-dependent emphysema. *Nature* 422:169-173.
145. Takabayashi, K., Corr, M., Hayashi, T., Redecke, V., Beck, L., Guiney, D., Sheppard, D., and Raz, E. 2006. Induction of a homeostatic circuit in lung tissue by microbial compounds. *Immunity* 24:475-487.
146. Lambrecht, B.N. 2006. Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24:366-368.
147. Gardai, S.J., Xiao, Y.Q., Dickinson, M., Nick, J.A., Voelker, D.R., Greene, K.E., and Henson, P.M. 2003. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115:13-23.
148. Bedoret, D., Bureau, F., and Desmet, C.J. 2010. [Interstitial macrophages, new regulators of pulmonary immune homeostasis]. *Medecine sciences : M/S* 26:229-231.
149. Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. 2009. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *The Journal of clinical investigation* 119:3723-3738.
150. Nakajima, T., Inagaki, N., Tanaka, H., Tanaka, A., Yoshikawa, M., Tamari, M., Hasegawa, K., Matsumoto, K., Tachimoto, H., Ebisawa, M., et al. 2002. Marked increase in CC chemokine gene expression in both human and mouse mast cell transcriptomes following Fcepsilon receptor I cross-linking: an interspecies comparison. *Blood* 100:3861-3868.

151. Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* 28:2760-2769.
152. Gutzmer, R., Diestel, C., Mommert, S., Kother, B., Stark, H., Wittmann, M., and Werfel, T. 2005. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology* 174:5224-5232.
153. Gutzmer, R., Langer, K., Lisewski, M., Mommert, S., Rieckborn, D., Kapp, A., and Werfel, T. 2002. Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109:524-531.
154. Idzko, M., la Sala, A., Ferrari, D., Panther, E., Herouy, Y., Dichmann, S., Mockenhaupt, M., Di Virgilio, F., Girolomoni, G., and Norgauer, J. 2002. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109:839-846.
155. Renkl, A., Berod, L., Mockenhaupt, M., Idzko, M., Panther, E., Termeer, C., Elsner, P., Huber, M., and Norgauer, J. 2004. Distinct effects of sphingosine-1-phosphate, lysophosphatidic acid and histamine in human and mouse dendritic cells. *International journal of molecular medicine* 13:203-209.
156. Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J., and Jeannin, P. 2001. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *Journal of immunology* 167:3682-3686.
157. Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Herbault, N., Magistrelli, G., Bonnefoy, J.Y., Pestel, J., and Jeannin, P. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *Journal of immunology* 166:6000-6006.
158. Dunford, P.J., O'Donnell, N., Riley, J.P., Williams, K.N., Karlsson, L., and Thurmond, R.L. 2006. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *Journal of immunology* 176:7062-7070.
159. Mazzoni, A., Leifer, C.A., Mullen, G.E., Kennedy, M.N., Klinman, D.M., and Segal, D.M. 2003. Cutting edge: histamine inhibits IFN- α release from plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology* 170:2269-2273.
160. Mazzoni, A., Young, H.A., Spitzer, J.H., Visintin, A., and Segal, D.M. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *The Journal of clinical investigation* 108:1865-1873.
161. Theiner, G., Gessner, A., and Lutz, M.B. 2006. The mast cell mediator PGD2 suppresses IL-12 release by dendritic cells leading to Th2 polarized immune responses in vivo. *Immunobiology* 211:463-472.
162. Bryce, P.J., Miller, M.L., Miyajima, I., Tsai, M., Galli, S.J., and Oettgen, H.C. 2004. Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity* 20:381-392.
163. Jawdat, D.M., Albert, E.J., Rowden, G., Haidl, I.D., and Marshall, J.S. 2004. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *Journal of immunology* 173:5275-5282.
164. Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. 2005. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 6:135-142.
165. Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Griffiths, C.E., and Kimber, I. 2000. Langerhans cell migration. *Clinical and experimental dermatology* 25:413-418.
166. Steinman, R.M., and Inaba, K. 1999. Myeloid dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 66:205-208.
167. Kaser, A., Dunzendorfer, S., Offner, F.A., Ryan, T., Schwabegger, A., Cruikshank, W.W., Wiedermann, C.J., and Tilg, H. 1999. A role for IL-16 in the cross-talk between dendritic cells and T cells. *Journal of immunology* 163:3232-3238.
168. Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Antonopoulos, C., Groves, R.W., and Kimber, I. 2001. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- α - and IL-1 β -dependent mechanism. *Immunology* 102:323-330.
169. Carramolino, L., Kremer, L., Goya, I., Varona, R., Buesa, J.M., Gutierrez, J., Zaballos, A., Martinez, A.C., and Marquez, G. 1999. Down-regulation of the beta-chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF- α and IL-4. *Journal of leukocyte biology* 66:837-844.
170. Robbiani, D.F., Finch, R.A., Jager, D., Muller, W.A., Sartorelli, A.C., and Randolph, G.J. 2000. The leukotriene C(4) transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3 β , ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103:757-768.
171. Kabashima, K., Sakata, D., Nagamachi, M., Miyachi, Y., Inaba, K., and Narumiya, S. 2003. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nature medicine* 9:744-749.
172. Ioffreda, M.D., Whitaker, D., and Murphy, G.F. 1993. Mast cell degranulation upregulates alpha 6 integrins on epidermal Langerhans cells. *The Journal of investigative dermatology* 101:150-154.

173. Skokos, D., Botros, H.G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S., and Mecheri, S. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *Journal of immunology* 170:3037-3045.
174. Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., et al. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nature immunology* 3:673-680.
175. McLachlan, J.B., Shelburne, C.P., Hart, J.P., Pizzo, S.V., Goyal, R., Brooking-Dixon, R., Staats, H.F., and Abraham, S.N. 2008. Mast cell activators: a new class of highly effective vaccine adjuvants. *Nature medicine* 14:536-541.
176. Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tscopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., and Kay, A.B. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England journal of medicine* 326:298-304.
177. Bentley, A.M., Menz, G., Storz, C., Robinson, D.S., Bradley, B., Jeffery, P.K., Durham, S.R., and Kay, A.B. 1992. Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. *The American review of respiratory disease* 146:500-506.
178. Cohn, L., Elias, J.A., and Chupp, G.L. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annual Reviews of Immunology* 22:789-815.
179. Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annual Reviews of Immunology* 17:255-281.
180. Robinson, D., Hamid, Q., Bentley, A., Ying, S., Kay, A.B., and Durham, S.R. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 92:313-324.
181. Robinson, D.S., Ying, S., Bentley, A.M., Meng, Q., North, J., Durham, S.R., Kay, A.B., and Hamid, Q. 1993. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 92:397-403.
182. Walker, C., Kaegi, M.K., Braun, P., and Blaser, K. 1991. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *The Journal of allergy and clinical immunology* 88:935-942.
183. Azzawi, M., Bradley, B., Jeffery, P.K., Frew, A.J., Wardlaw, A.J., Knowles, G., Assoufi, B., Collins, J.V., Durham, S., and Kay, A.B. 1990. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *The American review of respiratory disease* 142:1407-1413.
184. Ying, S., Humbert, M., Barkans, J., Corrigan, C.J., Pfister, R., Menz, G., Larche, M., Robinson, D.S., Durham, S.R., and Kay, A.B. 1997. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *Journal of immunology* 158:3539-3544.
185. Christodoulopoulos, P., Cameron, L., Nakamura, Y., Lemiere, C., Muro, S., Dugas, M., Boulet, L.P., Laviolette, M., Olivenstein, R., and Hamid, Q. 2001. TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 107:586-591.
186. Nakamura, Y., Ghaffar, O., Olivenstein, R., Taha, R.A., Soussi-Gounni, A., Zhang, D.H., Ray, A., and Hamid, Q. 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 103:215-222.
187. Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P.R., Szabo, S.J., et al. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
188. Chapoval, S.P., Marietta, E.V., Smart, M.K., and David, C.S. 2001. Requirements for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in CD4-deficient and CD4-sufficient HLA-DQ transgenic mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:764-771.
189. Komai, M., Tanaka, H., Masuda, T., Nagao, K., Ishizaki, M., Sawada, M., and Nagai, H. 2003. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *British Journal of Pharmacology* 138:912-920.
190. Cohn, L., Tepper, J.S., and Bottomly, K. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *Journal of immunology* 161:3813-3816.
191. Hogan, S.P., Koskinen, A., Matthaei, K.I., Young, I.G., and Foster, P.S. 1998. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 157:210-218.

192. Hansen, G., McIntire, J.J., Yeung, V.P., Berry, G., Thorbecke, G.J., Chen, L., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2000. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *The Journal of clinical investigation* 105:61-70.
193. Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M., and Grusby, M.J. 1998. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *The Journal of experimental medicine* 187:939-948.
194. Darcan-Nicolaisen, Y., Meinicke, H., Fels, G., Hegend, O., Haberland, A., Kuhl, A., Loddenkemper, C., Witzentrath, M., Kube, S., Henke, W., et al. 2009. Small interfering RNA against transcription factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice. *Journal of immunology* 182:7501-7508.
195. McCusker, C.T., Wang, Y., Shan, J., Kinyanjui, M.W., Villeneuve, A., Michael, H., and Fixman, E.D. 2007. Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *Journal of immunology* 179:2556-2564.
196. Finotto, S., De Sanctis, G.T., Lehr, H.A., Herz, U., Buerke, M., Schipp, M., Bartsch, B., Atreya, R., Schmitt, E., Galle, P.R., et al. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *The Journal of experimental medicine* 193:1247-1260.
197. Mamessier, E., Nieves, A., Lorec, A.M., Dupuy, P., Pinot, D., Pinet, C., Vervloet, D., and Magnan, A. 2008. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy* 63:1202-1210.
198. Akoum, H., Tscopoulos, A., Vorng, H., Wallaert, B., Dessaint, J.P., Joseph, M., Hamid, Q., and Tonnel, A.B. 1996. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 87:593-598.
199. Jutel, M., Pichler, W.J., Skrbic, D., Urwyler, A., Dahinden, C., and Muller, U.R. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *Journal of immunology* 154:4187-4194.
200. Chen, Z.G., Li, M., Chen, Y.F., Ji, J.Z., Li, Y.T., Chen, W., Chen, F.H., and Chen, H. 2009. Effects of dermatophagoides pteronyssinus allergen-specific immunotherapy on the serum interleukin-13 and pulmonary functions in asthmatic children. *Chinese medical journal* 122:1157-1161.
201. Gajewski, T.F., Joyce, J., and Fitch, F.W. 1989. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *Journal of immunology* 143:15-22.
202. Fernandez-Botran, R., Sanders, V.M., Mosmann, T.R., and Vitetta, E.S. 1988. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 168:543-558.
203. Iwamoto, I., Nakajima, H., Endo, H., and Yoshida, S. 1993. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 177:573-576.
204. Li, X.M., Chopra, R.K., Chou, T.Y., Schofield, B.H., Wills-Karp, M., and Huang, S.K. 1996. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. *Journal of immunology* 157:3216-3219.
205. Nakajima, H., Iwamoto, I., and Yoshida, S. 1993. Aerosolized recombinant interferon-gamma prevents antigen-induced eosinophil recruitment in mouse trachea. *The American review of respiratory disease* 148:1102-1104.
206. Gavett, S.H., O'Hearn, D.J., Li, X., Huang, S.K., Finkelman, F.D., and Wills-Karp, M. 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *The Journal of experimental medicine* 182:1527-1536.
207. Wang, S.Y., Yang, M., Xu, X.P., Qiu, G.F., Ma, J., Wang, S.J., Huang, X.X., and Xu, H.X. 2008. Intranasal delivery of T-bet modulates the profile of helper T cell immune responses in experimental asthma. *Journal of investigational allergology & clinical immunology : official organ of the International Association of Asthmology* 18:357-365.
208. Randolph, D.A., Carruthers, C.J., Szabo, S.J., Murphy, K.M., and Chaplin, D.D. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *Journal of immunology* 162:2375-2383.
209. Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J., and Bottomly, K. 1997. Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *The Journal of experimental medicine* 186:1737-1747.
210. Cohn, L., Homer, R.J., Niu, N., and Bottomly, K. 1999. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *The Journal of experimental medicine* 190:1309-1318.

211. Randolph, D.A., Stephens, R., Carruthers, C.J., and Chaplin, D.D. 1999. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *The Journal of clinical investigation* 104:1021-1029.
212. Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology* 6:1123-1132.
213. Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., et al. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology* 6:1133-1141.
214. Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
215. Alcorn, J.F., Crowe, C.R., and Kolls, J.K. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annual review of physiology* 72:495-516.
216. Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Page, N., Olivenstein, R., Elias, J., and Chakir, J. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 108:430-438.
217. Pene, J., Chevalier, S., Preisser, L., Venereau, E., Guilleux, M.H., Ghannam, S., Moles, J.P., Danger, Y., Ravon, E., Lesaux, S., et al. 2008. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *Journal of immunology* 180:7423-7430.
218. Mantel, P.Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Ruckert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., et al. 2007. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS biology* 5:e329.
219. Wilson, R.H., Whitehead, G.S., Nakano, H., Free, M.E., Kolls, J.K., and Cook, D.N. 2009. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180:720-730.
220. Wakashin, H., Hirose, K., Maezawa, Y., Kagami, S., Suto, A., Watanabe, N., Saito, Y., Hatano, M., Tokuhisa, T., Iwakura, Y., et al. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* 178:1023-1032.
221. McKinley, L., Alcorn, J.F., Peterson, A., Dupont, R.B., Kapadia, S., Logar, A., Henry, A., Irvin, C.G., Piganelli, J.D., Ray, A., et al. 2008. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Journal of immunology* 181:4089-4097.
222. Murdoch, J.R., and Lloyd, C.M. 2010. Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing {gamma}{delta}T cells. *American journal of respiratory and critical care medicine* 182:464-476.
223. Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17:375-387.
224. Veldhoen, M., Uytendhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature immunology* 9:1341-1346.
225. Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Volkmann, B., Hagenberg, A., Geldmacher, H., Braun, A., and Krug, N. 2003. Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:1319-1327.
226. Shimbara, A., Christodoulopoulos, P., Soussi-Gounni, A., Olivenstein, R., Nakamura, Y., Levitt, R.C., Nicolaides, N.C., Holroyd, K.J., Tsiropoulos, A., Lafitte, J.J., et al. 2000. IL-9 and its receptor in allergic and nonallergic lung disease: increased expression in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 105:108-115.
227. Temann, U.A., Geba, G.P., Rankin, J.A., and Flavell, R.A. 1998. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *The Journal of experimental medicine* 188:1307-1320.
228. McMillan, S.J., Bishop, B., Townsend, M.J., McKenzie, A.N., and Lloyd, C.M. 2002. The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *The Journal of experimental medicine* 195:51-57.
229. Cho, S.H., Stanciu, L.A., Holgate, S.T., and Johnston, S.L. 2005. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4⁺ and CD8⁺ T cells in atopic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 171:224-230.

230. Hirosako, S., Goto, E., Tsumori, K., Fujii, K., Hirata, N., Ando, M., and Kohrogi, H. 2010. CD8 and CD103 are highly expressed in asthmatic bronchial intraepithelial lymphocytes. *International archives of allergy and immunology* 153:157-165.
231. van Rensen, E.L., Sont, J.K., Evertse, C.E., Willems, L.N., Mauad, T., Hiemstra, P.S., and Sterk, P.J. 2005. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 172:837-841.
232. O'Sullivan, J.M., Mihr, M.J., Santos, M.A., and Tuite, M.F. 2001. The Candida albicans gene encoding the cytoplasmic leucyl-tRNA synthetase: implications for the evolution of CUG codon reassignment. *Gene* 275:133-140.
233. Betts, R.J., and Kemeny, D.M. 2009. CD8+ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacology & therapeutics* 121:123-131.
234. Tsuchiya, K., Isogai, S., Tamaoka, M., Inase, N., Akashi, T., Martin, J.G., and Yoshizawa, Y. 2009. Depletion of CD8+ T cells enhances airway remodelling in a rodent model of asthma. *Immunology* 126:45-54.
235. Isogai, S., Taha, R., Tamaoka, M., Yoshizawa, Y., Hamid, Q., and Martin, J.G. 2004. CD8+ alpha beta T cells can mediate late airway responses and airway eosinophilia in rats. *The Journal of allergy and clinical immunology* 114:1345-1352.
236. Koya, T., Miyahara, N., Takeda, K., Matsubara, S., Matsuda, H., Swasey, C., Balhorn, A., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. 2007. CD8+ T cell-mediated airway hyperresponsiveness and inflammation is dependent on CD4+IL-4+ T cells. *Journal of immunology* 179:2787-2796.
237. Miyahara, N., Swanson, B.J., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, S., Kodama, T., Dakhama, A., Ott, V.L., and Gelfand, E.W. 2004. Effector CD8+ T cells mediate inflammation and airway hyperresponsiveness. *Nature medicine* 10:865-869.
238. Coyle, A.J., Erard, F., Bertrand, C., Walti, S., Pircher, H., and Le Gros, G. 1995. Virus-specific CD8+ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *The Journal of experimental medicine* 181:1229-1233.
239. Corne, J.M., Marshall, C., Smith, S., Schreiber, J., Sanderson, G., Holgate, S.T., and Johnston, S.L. 2002. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet* 359:831-834.
240. Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 9:582-588.
241. Nagata, Y., Kamijuku, H., Taniguchi, M., Ziegler, S., and Seino, K. 2007. Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function. *International archives of allergy and immunology* 144:305-314.
242. Matangkasombut, P., Pichavant, M., Yasumi, T., Hendricks, C., Savage, P.B., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2008. Direct activation of natural killer T cells induces airway hyperreactivity in nonhuman primates. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121:1287-1289.
243. Akbari, O., Faul, J.L., Hoyte, E.G., Berry, G.J., Wahlstrom, J., Kronenberg, M., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2006. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *The New England journal of medicine* 354:1117-1129.
244. Vijayanand, P., Seumois, G., Pickard, C., Powell, R.M., Angco, G., Sammut, D., Gadola, S.D., Friedmann, P.S., and Djukanovic, R. 2007. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 356:1410-1422.
245. Matangkasombut, P., Marigowda, G., Ervine, A., Idris, L., Pichavant, M., Kim, H.Y., Yasumi, T., Wilson, S.B., DeKruyff, R.H., Faul, J.L., et al. 2009. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123:1181-1185.
246. Dobransky-Fasiska, D., Brown, C., Pincus, H.A., Nowalk, M.P., Wieland, M., Parker, L.S., Cruz, M., McMurray, M.L., Mulsant, B., and Reynolds, C.F., 3rd. 2009. Developing a community-academic partnership to improve recognition and treatment of depression in underserved African American and white elders. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 17:953-964.
247. Kim, H.Y., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2010. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 11:577-584.
248. Carding, S.R., and Egan, P.J. 2002. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* 2:336-345.
249. Wands, J.M., Roark, C.L., Aydintug, M.K., Jin, N., Hahn, Y.S., Cook, L., Yin, X., Dal Porto, J., Lahn, M., Hyde, D.M., et al. 2005. Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *Journal of leukocyte biology* 78:1086-1096.

250. Spinozzi, F., Agea, E., Bistoni, O., Forenza, N., Monaco, A., Bassotti, G., Nicoletti, I., Riccardi, C., Grignani, F., and Bertotto, A. 1996. Increased allergen-specific, steroid-sensitive gamma delta T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with asthma. *Annals of internal medicine* 124:223-227.
251. Pawankar, R.U., Okuda, M., Suzuki, K., Okumura, K., and Ra, C. 1996. Phenotypic and molecular characteristics of nasal mucosal gamma delta T cells in allergic and infectious rhinitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 153:1655-1665.
252. Hahn, Y.S., Taube, C., Jin, N., Takeda, K., Park, J.W., Wands, J.M., Aydinug, M.K., Roark, C.L., Lahn, M., O'Brien, R.L., et al. 2003. V gamma 4+ gamma delta T cells regulate airway hyperreactivity to methacholine in ovalbumin-sensitized and challenged mice. *Journal of immunology* 171:3170-3178.
253. Lahn, M., Kanehiro, A., Takeda, K., Terry, J., Hahn, Y.S., Aydinug, M.K., Konowal, A., Ikuta, K., O'Brien, R.L., Gelfand, E.W., et al. 2002. MHC class I-dependent Vgamma4+ pulmonary T cells regulate alpha beta T cell-independent airway responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8850-8855.
254. Born, W., Cady, C., Jones-Carson, J., Mukasa, A., Lahn, M., and O'Brien, R. 1999. Immunoregulatory functions of gamma delta T cells. *Advances in immunology* 71:77-144.
255. Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature reviews. Immunology* 3:253-257.
256. Mills, K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews. Immunology* 4:841-855.
257. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology* 155:1151-1164.
258. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of experimental medicine* 193:1303-1310.
259. Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192:295-302.
260. Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J., and Hansen, W. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *European journal of immunology* 34:623-630.
261. McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
262. Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13031-13036.
263. Read, S., Mauze, S., Asseman, C., Bean, A., Coffman, R., and Powrie, F. 1998. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *European journal of immunology* 28:3435-3447.
264. Iellem, A., Mariani, M., Lang, R., Recalde, H., Panina-Bordignon, P., Sinigaglia, F., and D'Ambrosio, D. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 194:847-853.
265. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
266. Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F., and Ochs, H.D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature genetics* 27:20-21.
267. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* 198:1875-1886.
268. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
269. Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237-1240.
270. Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wuthrich, B., and Blaser, K. 1998. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *The Journal of clinical investigation* 102:98-106.

271. Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., et al. 2004. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *The Journal of experimental medicine* 199:1567-1575.
272. Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczyk, M., Blaser, K., and Akdis, C.A. 2003. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European journal of immunology* 33:1205-1214.
273. Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C.A., and Akdis, M. 2008. In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *The Journal of experimental medicine* 205:2887-2898.
274. Platts-Mills, T., Vaughan, J., Squillace, S., Woodfolk, J., and Sporik, R. 2001. Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357:752-756.
275. Osna, N., Elliott, K., and Khan, M.M. 2001. Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in TH2 cells and splenocytes. *International immunopharmacology* 1:85-96.
276. Jutel, M., Watanabe, T., Klunker, S., Akdis, M., Thomet, O.A., Malolepszy, J., Zak-Nejmark, T., Koga, R., Kobayashi, T., Blaser, K., et al. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413:420-425.
277. Karlsson, M.R., Rugtveit, J., and Brandtzaeg, P. 2004. Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *The Journal of experimental medicine* 199:1679-1688.
278. Faith, A., Richards, D.F., Verhoef, A., Lamb, J.R., Lee, T.H., and Hawrylowicz, C.M. 2003. Impaired secretion of interleukin-4 and interleukin-13 by allergen-specific T cells correlates with defective nuclear expression of NF-AT2 and jun B: relevance to immunotherapy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33:1209-1215.
279. Francis, J.N., Till, S.J., and Durham, S.R. 2003. Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:1255-1261.
280. Mobs, C., Slotosch, C., Löffler, H., Jakob, T., Hertl, M., and Pflüger, W. 2010. Birch pollen immunotherapy leads to differential induction of regulatory T cells and delayed helper T cell immune deviation. *Journal of immunology* 184:2194-2203.
281. Radulovic, S., Jacobson, M.R., Durham, S.R., and Nouri-Aria, K.T. 2008. Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121:1467-1472, 1472 e1461.
282. Tiemessen, M.M., Van Hoffen, E., Knulst, A.C., Van Der Zee, J.A., Knol, E.F., and Taams, L.S. 2002. CD4 CD25 regulatory T cells are not functionally impaired in adult patients with IgE-mediated cow's milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 110:934-936.
283. Bellinghausen, I., Klostermann, B., Knop, J., and Saloga, J. 2003. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111:862-868.
284. Ling, E.M., Smith, T., Nguyen, X.D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V.A., and Robinson, D.S. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
285. Lin, Y.L., Shieh, C.C., and Wang, J.Y. 2008. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy* 63:67-74.
286. Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A.T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D.J., Griese, M., and Krauss-Etschmann, S. 2007. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1258-1266.
287. Nguyen, K.D., Vanichsarn, C., and Nadeau, K.C. 2009. Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4+CD25hiCD127lo/- natural regulatory T cells in human allergic asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180:823-833.
288. Karagiannidis, C., Akdis, M., Holopainen, P., Woolley, N.J., Hense, G., Ruckert, B., Mantel, P.Y., Menz, G., Akdis, C.A., Blaser, K., et al. 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 114:1425-1433.
289. Peek, E.J., Richards, D.F., Faith, A., Lavender, P., Lee, T.H., Corrigan, C.J., and Hawrylowicz, C.M. 2005. Interleukin-10-secreting "regulatory" T cells induced by glucocorticoids and beta2-agonists. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 33:105-111.
290. Xystrakis, E., Kusumakar, S., Boswell, S., Peek, E., Urry, Z., Richards, D.F., Adikibi, T., Pridgeon, C., Dallman, M., Loke, T.K., et al. 2006. Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *The Journal of clinical investigation* 116:146-155.

291. Kearley, J., Barker, J.E., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of experimental medicine* 202:1539-1547.
292. Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *Journal of immunology* 178:1433-1442.
293. Lewkowich, I.P., Herman, N.S., Schleifer, K.W., Dance, M.P., Chen, B.L., Dienger, K.M., Sproles, A.A., Shah, J.S., Kohl, J., Belkaid, Y., et al. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of experimental medicine* 202:1549-1561.
294. Kearley, J., Robinson, D.S., and Lloyd, C.M. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *The Journal of allergy and clinical immunology* 122:617-624 e616.
295. Cottrez, F., Hurst, S.D., Coffman, R.L., and Groux, H. 2000. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *Journal of immunology* 165:4848-4853.
296. Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., and Akdis, C.A. 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European journal of immunology* 40:1232-1240.
297. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
298. Akdis, C.A., and Akdis, M. 2003. Immunological differences between intrinsic and extrinsic types of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 33:1618-1621.
299. Nonaka, M., Pawankar, R., Fukumoto, A., and Yagi, T. 2008. Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 38:812-821.
300. Ring, S., Schafer, S.C., Mahnke, K., Lehr, H.A., and Enk, A.H. 2006. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *European journal of immunology* 36:2981-2992.
301. Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfredi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A., Odom, S., Rivera, J., Colombo, M.P., et al. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29:771-781.
302. Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H.U., Graeve, T., Noll, M., Brocker, E.B., Blaser, K., and Akdis, C.A. 2000. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *The Journal of clinical investigation* 106:25-35.
303. Trautmann, A., Schmid-Grendelmeier, P., Kruger, K., Cramer, R., Akdis, M., Akkaya, A., Brocker, E.B., Blaser, K., and Akdis, C.A. 2002. T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 109:329-337.
304. Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., and Akdis, M. 2008. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 63:1455-1463.
305. Sakaguchi, S., Wing, K., and Yamaguchi, T. 2009. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European journal of immunology* 39:2331-2336.
306. Wang, L., Pino-Lagos, K., de Vries, V.C., Guleria, I., Sayegh, M.H., and Noelle, R.J. 2008. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:9331-9336.
307. Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., Greenfield, E.A., Chang, T.T., Sharpe, A.H., Berry, G., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nature medicine* 8:1024-1032.
308. Banerjee, D.K., Dhodapkar, M.V., Matayeva, E., Steinman, R.M., and Dhodapkar, K.M. 2006. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108:2655-2661.
309. Matsumoto, K., Inoue, H., Nakano, T., Tsuda, M., Yoshiura, Y., Fukuyama, S., Tsushima, F., Hoshino, T., Aizawa, H., Akiba, H., et al. 2004. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. *Journal of immunology* 172:2530-2541.
310. Oflazoglu, E., Swart, D.A., Anders-Bartholo, P., Jessup, H.K., Norment, A.M., Lawrence, W.A., Brasel, K., Tocker, J.E., Horan, T., Welcher, A.A., et al. 2004. Paradoxical role of programmed death-1 ligand 2 in Th2 immune responses in vitro and in a mouse asthma model in vivo. *European journal of immunology* 34:3326-3336.

311. Henry, E., Desmet, C.J., Garze, V., Fievez, L., Bedoret, D., Heirman, C., Faisca, P., Jaspar, F.J., Gosset, P., Jacquet, A.P., et al. 2008. Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *Journal of immunology* 181:7230-7242.
312. Taher, Y.A., Piavaux, B.J., Gras, R., van Esch, B.C., Hofman, G.A., Bloksma, N., Henricks, P.A., and van Oosterhout, A.J. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121:983-991 e982.
313. van der Marel, A.P., Samsom, J.N., Greuter, M., van Berkel, L.A., O'Toole, T., Kraal, G., and Mebius, R.E. 2007. Blockade of IDO inhibits nasal tolerance induction. *Journal of immunology* 179:894-900.
314. Hadeiba, H., Sato, T., Habtezion, A., Oderup, C., Pan, J., and Butcher, E.C. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature immunology* 9:1253-1260.
315. Coombes, J.L., Siddiqui, K.R., Arancibia-Carcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.M., Belkaid, Y., and Powrie, F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204:1757-1764.
316. Sun, C.M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *The Journal of experimental medicine* 204:1775-1785.
317. Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317:256-260.
318. Benson, M.J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M., and Noelle, R.J. 2007. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *The Journal of experimental medicine* 204:1765-1774.
319. Elias, K.M., Laurence, A., Davidson, T.S., Stephens, G., Kanno, Y., Shevach, E.M., and O'Shea, J.J. 2008. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. *Blood* 111:1013-1020.
320. Hill, J.A., Hall, J.A., Sun, C.M., Cai, Q., Ghyselinck, N., Chambon, P., Belkaid, Y., Mathis, D., and Benoist, C. 2008. Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells. *Immunity* 29:758-770.
321. Belkaid, Y., and Oldenhove, G. 2008. Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells. *Immunity* 29:362-371.
322. Coombes, J.L., and Powrie, F. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews. Immunology* 8:435-446.
323. Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. 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.
324. Koya, T., Matsuda, H., Takeda, K., Matsubara, S., Miyahara, N., Balhorn, A., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. 2007. IL-10-treated dendritic cells decrease airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1241-1250.
325. Darrasse-Jeze, G., Deroubaix, S., Mouquet, H., Victora, G.D., Eisenreich, T., Yao, K.H., Masilamani, R.F., Dustin, M.L., Rudensky, A., Liu, K., et al. 2009. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206:1853-1862.
326. McGuirk, P., McCann, C., and Mills, K.H. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *The Journal of experimental medicine* 195:221-231.
327. Csoka, B., Himer, L., Selmezy, Z., Vizi, E.S., Pacher, P., Ledent, C., Deitch, E.A., Spolarics, Z., Nemeth, Z.H., and Hasko, G. 2008. Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22:3491-3499.
328. Urry, Z., Xystrakis, E., Richards, D.F., McDonald, J., Sattar, Z., Cousins, D.J., Corrigan, C.J., Hickman, E., Brown, Z., and Hawrylowicz, C.M. 2009. Ligation of TLR9 induced on human IL-10-secreting Tregs by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 abrogates regulatory function. *The Journal of clinical investigation* 119:387-398.
329. D'Adamio, F., Zollo, O., Moraca, R., Ayroldi, E., Bruscoli, S., Bartoli, A., Cannarile, L., Migliorati, G., and Riccardi, C. 1997. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7:803-812.

330. Cannarile, L., Zollo, O., D'Adamio, F., Ayroldi, E., Marchetti, C., Tabilio, A., Bruscoli, S., and Riccardi, C. 2001. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene. *Cell death and differentiation* 8:201-203.
331. Asselin-Labat, M.L., Biola-Vidamment, A., Kerbrat, S., Lombes, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. 2005. FoxO3 mediates antagonistic effects of glucocorticoids and interleukin-2 on glucocorticoid-induced leucine zipper expression. *Molecular endocrinology* 19:1752-1764.
332. Asselin-Labat, M.L., David, M., Biola-Vidamment, A., Lecoecueche, D., Zennaro, M.C., Bertoglio, J., and Pallardy, M. 2004. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104:215-223.
333. Bruscoli, S., Donato, V., Velardi, E., Di Sante, M., Migliorati, G., Donato, R., and Riccardi, C. 2010. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *The Journal of biological chemistry* 285:10385-10396.
334. Yachi, K., Inoue, K., Tanaka, H., Yoshikawa, H., and Tohyama, M. 2007. Localization of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) expressing neurons in the central nervous system and its relationship to the stress response. *Brain research* 1159:141-147.
335. Godot, V., Garcia, G., Capel, F., Arock, M., Durand-Gasselien, I., Asselin-Labat, M.L., Emilie, D., and Humbert, M. 2006. Dexamethasone and IL-10 stimulate glucocorticoid-induced leucine zipper synthesis by human mast cells. *Allergy* 61:886-890.
336. Hamdi, H., Bigorgne, A., Naveau, S., Balian, A., Bouchet-Delbos, L., Cassard-Doulicier, A.M., Maillot, M.C., Durand-Gasselien, I., Prevot, S., Delaveaucoupet, J., et al. 2007. Glucocorticoid-induced leucine zipper: A key protein in the sensitization of monocytes to lipopolysaccharide in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 46:1986-1992.
337. Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A.L., Christiansen, S.C., and Zuraw, B.L. 2007. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:115-122.
338. Muzikar, K.A., Nickols, N.G., and Dervan, P.B. 2009. Repression of DNA-binding dependent glucocorticoid receptor-mediated gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:16598-16603.
339. Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M.C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., et al. 2003. Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* 101:729-738.
340. Cohen, N., Mouly, E., Hamdi, H., Maillot, M.C., Pallardy, M., Godot, V., Capel, F., Balian, A., Naveau, S., Galanaud, P., et al. 2006. GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* 107:2037-2044.
341. Ellestad, L.E., Malkiewicz, S.A., Guthrie, H.D., Welch, G.R., and Porter, T.E. 2009. Expression and regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper in the developing anterior pituitary gland. *Journal of molecular endocrinology* 42:171-183.
342. Muller, O.G., Parnova, R.G., Centeno, G., Rossier, B.C., Firsov, D., and Horisberger, J.D. 2003. Mineralocorticoid effects in the kidney: correlation between alphaENaC, GILZ, and Sgk-1 mRNA expression and urinary excretion of Na⁺ and K⁺. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 14:1107-1115.
343. Soundararajan, R., Zhang, T.T., Wang, J., Vandewalle, A., and Pearce, D. 2005. A novel role for glucocorticoid-induced leucine zipper protein in epithelial sodium channel-mediated sodium transport. *The Journal of biological chemistry* 280:39970-39981.
344. Grugan, K.D., Ma, C., Singhal, S., Krett, N.L., and Rosen, S.T. 2008. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 110:244-254.
345. Perez, S.A., Mahaira, L.G., Demirtzoglou, F.J., Sotiropoulou, P.A., Ioannidis, P., Iliopoulou, E.G., Gritzapis, A.D., Sotiriadou, N.N., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. 2005. A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. *Blood* 106:158-166.
346. Gleissner, C.A., Zastrow, A., Klingenberg, R., Kluger, M.S., Konstandin, M., Celik, S., Haemmerling, S., Shankar, V., Giese, T., Katus, H.A., et al. 2007. IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells. *European journal of immunology* 37:177-192.

347. Tynan, S.H., Lundeen, S.G., and Allan, G.F. 2004. Cell type-specific bidirectional regulation of the glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) gene by estrogen. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 91:225-239.
348. Gomez, M., Raju, S.V., Viswanathan, A., Painter, R.G., Bonvillain, R., Byrne, P., Nguyen, D.H., Bagby, G.J., Kolls, J.K., Nelson, S., et al. 2010. Ethanol upregulates glucocorticoid-induced leucine zipper expression and modulates cellular inflammatory responses in lung epithelial cells. *Journal of immunology* 184:5715-5722.
349. Glynne, R., Ghandour, G., Rayner, J., Mack, D.H., and Goodnow, C.C. 2000. B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunological reviews* 176:216-246.
350. Hamdi, H., Godot, V., Maillot, M.C., Prejean, M.V., Cohen, N., Krzysiek, R., Lemoine, F.M., Zou, W., and Emilie, D. 2007. Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* 110:211-219.
351. Yang, Y.H., Aeberli, D., Dacumos, A., Xue, J.R., and Morand, E.F. 2009. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *Journal of immunology* 183:1435-1445.
352. Cannarile, L., Cuzzocrea, S., Santucci, L., Agostini, M., Mazzon, E., Esposito, E., Muia, C., Coppo, M., Di Paola, R., and Riccardi, C. 2009. Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* 136:530-541.
353. Cannarile, L., Fallarino, F., Agostini, M., Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Vacca, C., Genovese, T., Migliorati, G., Ayroldi, E., and Riccardi, C. 2006. Increased GILZ expression in transgenic mice up-regulates Th-2 lymphokines. *Blood* 107:1039-1047.
354. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857-868.
355. Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D.R. 1998. DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Molecular cell* 1:543-551.
356. Ayroldi, E., Migliorati, G., Bruscoli, S., Marchetti, C., Zollo, O., Cannarile, L., D'Adamio, F., and Riccardi, C. 2001. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98:743-753.
357. Mittelstadt, P.R., and Ashwell, J.D. 2001. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *The Journal of biological chemistry* 276:29603-29610.
358. Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G., and Riccardi, C. 2007. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic acids research* 35:517-528.
359. Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P., and Riccardi, C. 2004. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* 104:4134-4141.
360. Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., and Medema, R.H. 2002. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *Journal of immunology* 168:5024-5031.
361. Ayroldi, E., Zollo, O., Bastianelli, A., Marchetti, C., Agostini, M., Di Virgilio, R., and Riccardi, C. 2007. GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *The Journal of clinical investigation* 117:1605-1615.
362. Ayroldi, E., Zollo, O., Macchiarulo, A., Di Marco, B., Marchetti, C., and Riccardi, C. 2002. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Molecular and cellular biology* 22:7929-7941.
363. Ayroldi, E., and Riccardi, C. 2009. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:3649-3658.
364. Redjimi, N., Gaudin, F., Touboul, C., Emilie, D., Pallardy, M., Biola-Vidamment, A., Fernandez, H., Prevot, S., Balabanian, K., and Machelon, V. 2009. Identification of glucocorticoid-induced leucine zipper as a key regulator of tumor cell proliferation in epithelial ovarian cancer. *Molecular cancer* 8:83.
365. Gaudin, F., Nasreddine, S., Donnadieu, A.C., Emilie, D., Combadiere, C., Prevot, S., Machelon, V., and Balabanian, K. 2011. Identification of the Chemokine CX(3)CL1 as a New Regulator of Malignant Cell Proliferation in Epithelial Ovarian Cancer. *PLoS one* 6:e21546.
366. Shi, X., Shi, W., Li, Q., Song, B., Wan, M., Bai, S., and Cao, X. 2003. A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO reports* 4:374-380.

367. Soundararajan, R., Wang, J., Melters, D., and Pearce, D. 2007. Differential activities of glucocorticoid-induced leucine zipper protein isoforms. *The Journal of biological chemistry* 282:36303-36313.
368. Partridge, M.R., van der Molen, T., Myrseth, S.E., and Busse, W.W. 2006. Attitudes and actions of asthma patients on regular maintenance therapy: the INSPIRE study. *BMC pulmonary medicine* 6:13.
369. Gamble, J., Stevenson, M., McClean, E., and Heaney, L.G. 2009. The prevalence of nonadherence in difficult asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 180:817-822.
370. Barnes, P.J. 2010. New therapies for asthma: is there any progress? *Trends in pharmacological sciences* 31:335-343.
371. Haldar, P., and Pavord, I.D. 2007. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype. *The Journal of allergy and clinical immunology* 119:1043-1052; quiz 1053-1044.
372. Moore, W.C., Meyers, D.A., Wenzel, S.E., Teague, W.G., Li, H., Li, X., D'Agostino, R., Jr., Castro, M., Curran-Everett, D., Fitzpatrick, A.M., et al. 2010. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *American journal of respiratory and critical care medicine* 181:315-323.
373. Kips, J.C., O'Connor, B.J., Langley, S.J., Woodcock, A., Kerstjens, H.A., Postma, D.S., Danzig, M., Cuss, F., and Pauwels, R.A. 2003. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *American journal of respiratory and critical care medicine* 167:1655-1659.
374. Leckie, M.J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, A.K., Cowley, H.C., Chung, K.F., Djukanovic, R., et al. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148.
375. O'Byrne, P.M. 2007. The demise of anti IL-5 for asthma, or not. *American journal of respiratory and critical care medicine* 176:1059-1060.
376. Haldar, P., Brightling, C.E., Hargadon, B., Gupta, S., Monteiro, W., Sousa, A., Marshall, R.P., Bradding, P., Green, R.H., Wardlaw, A.J., et al. 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *The New England journal of medicine* 360:973-984.
377. Nair, P., Pizzichini, M.M., Kjarsgaard, M., Inman, M.D., Efthimiadis, A., Pizzichini, E., Hargreave, F.E., and O'Byrne, P.M. 2009. Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *The New England journal of medicine* 360:985-993.
378. Soroosh, P., and Doherty, T.A. 2009. Th9 and allergic disease. *Immunology* 127:450-458.
379. Lloyd, C.M., and Hessel, E.M. 2010. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nature reviews. Immunology* 10:838-848.
380. Al-Ramli, W., Prefontaine, D., Chouiali, F., Martin, J.G., Olivenstein, R., Lemiere, C., and Hamid, Q. 2009. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 123:1185-1187.
381. Akdis, M., and Akdis, C.A. 2009. Therapeutic manipulation of immune tolerance in allergic disease. *Nature reviews. Drug discovery* 8:645-660.
382. Durham, S.R., Emminger, W., Kapp, A., Colombo, G., de Monchy, J.G., Rak, S., Scadding, G.K., Andersen, J.S., Riis, B., and Dahl, R. 2010. Long-term clinical efficacy in grass pollen-induced rhinoconjunctivitis after treatment with SQ-standardized grass allergy immunotherapy tablet. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:131-138 e131-137.
383. Strickland, D.H., Stumbles, P.A., Zosky, G.R., Subrata, L.S., Thomas, J.A., Turner, D.J., Sly, P.D., and Holt, P.G. 2006. Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 203:2649-2660.
384. GeurtsvanKessel, C.H., Willart, M.A., van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., et al. 2008. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 205:1621-1634.
385. Ito, T., Yang, M., Wang, Y.H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O.A., Qin, X.F., Liu, Y.J., and Gilliet, M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *The Journal of experimental medicine* 204:105-115.
386. Lagranderie, M., Abolhassani, M., Vanoirbeek, J.A., Lima, C., Balazuc, A.M., Vargaftig, B.B., and Marchal, G. 2010. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin killed by extended freeze-drying targets plasmacytoid dendritic cells to regulate lung inflammation. *Journal of immunology* 184:1062-1070.
387. Gandini, S., Lowenfels, A.B., Jaffee, E.M., Armstrong, T.D., and Maisonneuve, P. 2005. Allergies and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis with review of epidemiology and biological mechanisms. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14:1908-1916.

388. Prizment, A.E., Folsom, A.R., Cerhan, J.R., Flood, A., Ross, J.A., and Anderson, K.E. 2007. History of allergy and reduced incidence of colorectal cancer, Iowa Women's Health Study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 16:2357-2362.
389. Vajdic, C.M., Falster, M.O., de Sanjose, S., Martinez-Maza, O., Becker, N., Bracci, P.M., Melbye, M., Smedby, K.E., Engels, E.A., Turner, J., et al. 2009. Atopic disease and risk of non-Hodgkin lymphoma: an InterLymph pooled analysis. *Cancer research* 69:6482-6489.
390. Wang, H., and Diepgen, T.L. 2005. Is atopy a protective or a risk factor for cancer? A review of epidemiological studies. *Allergy* 60:1098-1111.