



HAL
open science

Chimiokines et interaction entre l'immunité innée et adaptative dans l'asthme allergique : implication des cellules dendritiques et du récepteur NOD1

Saliha Ait Yahia-Sendid

► **To cite this version:**

Saliha Ait Yahia-Sendid. Chimiokines et interaction entre l'immunité innée et adaptative dans l'asthme allergique : implication des cellules dendritiques et du récepteur NOD1. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2012. Français. NNT : 2012LIL2S002 . tel-01123980

HAL Id: tel-01123980

<https://theses.hal.science/tel-01123980>

Submitted on 5 Mar 2015

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 du Droit et de la Santé de Lille 2

THESE

Pour l'obtention du diplôme d'état de

Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Discipline : Immunologie

Chimiokines et interaction entre immunité innée et adaptative dans l'asthme allergique : implication des cellules dendritiques et du récepteur NOD1

Présentée et soutenue publiquement le 05 juin 2012

Par

Saliha Ait Yahia-Sendid

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Philippe BONNIAUD Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire CHU du Bocage, Dijon	Président
Madame le Professeur Hamida HAMMAD Laboratory of Immunoregulation and Mucosal Immunology, University Hospital Ghent, Belgium	Rapporteur
Madame le Docteur Isabelle COUILLIN UMR-INEM 7355 CNRS, Université d'Orléans	Rapporteur
Madame le Docteur Anne TSICOPOULOS Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, U1019, Equipe 11, Lille	Examineur
Monsieur le Docteur Mathias CHAMAILLARD Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, U1019, Equipe 8, Lille	Examineur
Monsieur le Professeur Benoît WALLAERT Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital A. Calmette, Lille	Directeur de Thèse

Equipe 11 «Immunité Pulmonaire» du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Institut Pasteur de Lille, INSERM U1019/UMR8204, Lille, France.

A mon mari
A ma fille **SARAH**
A ma mère

MERCI

Pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et
m'avoir donnée les moyens de suivre ma voie.

Ce doctorat a été réalisé au sein de l'unité U774 à l'Institut Pasteur de Lille
«Biomolécules et Inflammation Pulmonaire»
Directeur : Dr. Philippe LASSALLE

Devenue par la suite

Equipe 11 : «Immunité Pulmonaire» du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
INSERM U1019/UMR8204
Directeur : Dr. Anne TSICOPOULOS

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse :

Monsieur le Professeur **Philippe BONNIAUD**, pour avoir accepté de présider ce jury.

Madame le Docteur **Isabelle COUILLIN** et Madame le Professeur **Hamida HAMMAD**, pour avoir accepté la tâche prenante de rapporteur.

Madame le Docteur **Anne TSICOPOULOS** et Monsieur le Docteur **Mathias CHAMAILLARD** d'avoir accepté de participer à mon jury en tant qu'examineurs.

Monsieur le Professeur Benoît WALLAERT, je vous remercie d'avoir été mon directeur officiel de thèse, je vous remercie également pour votre disponibilité et les conseils que vous m'avez apportés tout au long de ces trois années (voir plus).

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres du laboratoire qui m'ont aidée ou soutenue au cours de ces cinq années.

Anne Tsicopoulos,

Je te remercie pour la confiance que tu m'as témoignée en m'accueillant au sein de ton Equipe et pour m'avoir permis d'y réaliser un rêve «devenir Docteur». Je te remercie également pour la rigueur de ton encadrement, tes conseils ainsi que pour ta disponibilité.

Han,

Tu m'as appris beaucoup de choses par exemple : attraper les souris..., Tu m'as aussi transmis ton enthousiasme dans le travail (quand j'en manquais parfois), ça a été un grand plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton encadrement et ton aide précieuse.

Imane,

Ma compagne de paillasse, nous avons fait un long chemin ensemble, tu n'as pas été pour moi qu'une collègue mais plus : une sœur. Merci pour ton aide, ton soutien et ton amitié tout au long de ces années.

Coline, Fan et Laetitia Merci pour votre aide et disponibilité.

Les chercheurs de l'unité : Catherine, Nathalie, Corine, P. LASSALLE et A Ngoc merci pour votre bonne humeur, vos critiques, vos encouragements et nos échanges (scientifiques ou pas!).

P. Marquillies, P. Hauw, Edith et Geneviève, Merci beaucoup pour votre aide précieuse, vos encouragements et tous les bons moments.

Ali, Alice et Antoine un grand merci pour l'ambiance si agréable qui m'a permis de passer de bons moments.

Je remercie également les anciens, qui ont contribué à ma formation. Un grand merci donc

*A **Philippe Gosset, Jules, Cecilia, Chang Ying, Muriel, Eve, Benjamin, Mathieu, Latifa, Audrey, David, Eva, Gwen, Solenne, Jean, Hussein.....***

*Je remercie très sincèrement tous les membres de ma famille en particulier mon **beau Père**, pour leur aide, soutien et amour.*

*Je remercie madame **Nathalie JOSSO**, donatrice du prix « **Marriane JOSSO** », ainsi que la **FRM** qui ont permis le financement de ce travail de thèse.*

SOMMAIRE

<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	p.3
--------------------------------------	------------

<u>RESUME</u>	p.5
----------------------	------------

<u>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	p.9
-------------------------------------	------------

Chapitre I : L'asthme allergique **p.9**

Définition

Epidémiologie de l'asthme

Facteurs impliqués dans le développement et l'expression de la maladie

 Facteurs liés à l'hôte

 Facteurs environnementaux

La réaction inflammatoire de l'asthme allergique

 Acteurs cellulaires

 Les cellules dendritiques

 Les lymphocytes T

 Lymphocytes Th2

 Lymphocytes Th17

 Lymphocytes T régulateurs (Treg)

 Lymphocytes Th22

 Les lymphocytes B

 Les cellules lymphoïdes innées de type 2

 Les cellules épithéliales des voies respiratoires

 Les granulocytes tissulaires

 Les principaux médiateurs de la réaction allergique

Chapitre II: Les chimiokines

Généralités

p.42

Structure et classification

La séquence consensus BBXB

Régulation des chimiokines

Récepteurs de chimiokines

Régulation des interactions chimiokine-récepteur

Activité chimiotactique : La diapédèse

Activités Extrachimiotactiques

Les Chimiokines dans l'asthme

 Chimiokines d'intérêt

 CCL17 et CCL22

 CCL18

Chapitre III : Les récepteurs du système immunitaire inné

p.64

Introduction

Les récepteurs aux lectines de type-C	
Les TLR (Toll Like Receptor)	
Les (RIG-I)-like receptors (RLRs)	
Les NOD-like récepteurs (NLRs)	
Structure des NLRs	
Classification	
Les NLR-C	
Les NLR-P	
Mécanismes d'entrée des ligands de NOD dans la cellule	
Le récepteur NOD1: lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative	
Les récepteurs NOD et pathologies	

CONTEXTE ET OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE **p.85**

TRAVAIL DE THESE

Article I	p.86
Article II	p.123
Article III	p.135

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **p.145**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **p.152**

ANNEXE **p.179**

Curriculum vitae

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
AMPc: adenosine monophosphate cyclique
AP-1 activator protein-1
Apaf-1 apoptotic protease-activating factor 1
APC : antigen presentation cells
ARN : acide ribonucléique
ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATP : adenosine triphosphate
BIR : baculovirus inhibitor of apoptosis repeat
CARD : caspases-activating and recruitment domain
CCX-CKR : chemokine (C-C) receptor-like 1
CDx : cluster de différenciation x
CED : cell death defective
CIITA : class II transactivator
CLA : cutaneous lymphocyte antigen
CMHI/II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
Da : dalton
DC : dendritic cell
Der p : Dermatophagoïdes pteronyssinus protein
ECP : eosinophil cationic protein
EDN : eosinophil-derived neurotoxin
ELR : Glutamine-Leucine-Arginine
EPO : eosinophil peroxydase
FcxR : type x crystallizable-fragment receptor
Foxp3 : Forkhead box protein 3
GAG : glycoaminoglycanes
GC : glucocorticoides
GDP : guanosine di-phosphate
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCR : G-protein coupled receptor
GRK : G protein – coupled Receptor Kinase
GTP : guanosine tri-phosphate
HRB : hyperréactivité bronchique
ICAM : intercellular adhesion molecule
ICOS : inducible T-cell co-stimulator
IDO : indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN_x : interféron x
IgX : immunoglobuline d'isotype x
Ilx : interleukine x
Jak : Janus kinase
K_d : constante de dissociation

KO : knock-out
LBA : lavage broncho-alvéolaire
Lc : lymphocyte
LFA-1 : lymphocyte function-associated antigen 1
LPS : lipopolysaccharide
LRR : leucin-rich repeat
MBP : Major basic protein
mDC : cellule dendritique myeloïde
MDDC : Monocyte-Derived Dendritic Cell
MDP : muramyl dipptide
MHC: major histocompatibility complex
MMP : Matrix metalloproteinases
NBD : nucleotide-binding domain
NF-κB : nuclear factor kappa B
NK : natural killer
NOD : nucleotide-oligomerization domain
PAF : platelet activation factor
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARC : pulmonary and activation-regulated chemokine
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
pI : potentiel isoélectrique
PI3K : kinase de type phosphoinositide-3
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC : protein kinase C
PRR : Pattern Recognition Receptors
RANTES : regulated upon activation, normally T-expressed
RICK : RIP-like interacting CLARP kinase
RIP2 : receptor interacting protein 2
ROR : Retinoic acid receptor-related orphan receptor
SCID : severe combined immunodeficiency
Statx : signal transducers and activators of transcription x
TCR : T-cell receptor
TGF : transforming growth factor
Thx : T helper x – réponse T auxiliaire type x
TLRx : Toll-like receptors x
TNF_x : tumor necrosis factor x
Treg : lymphocyte T régulateur
VCAM_x : vascular cell adhesion molecule x
ZO-1 : zonula occludens-1 protein

RESUME

L'asthme allergique est caractérisé par une réponse immune adaptative de type Th2 associée à une production des médiateurs pro Th2 tels que les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL18. Les agents microbiens peuvent prévenir, aggraver ou sont soupçonnés d'induire l'asthme allergique, par des mécanismes encore incomplètement élucidés qui font intervenir des récepteurs de l'immunité innée capables de les reconnaître. NOD1 est un des récepteurs impliqués, c'est un récepteur intracellulaire qui reconnaît un motif particulier de la paroi de certaines bactéries. IL est capable de favoriser une réponse systémique de type Th2. Cependant aucune étude expérimentale ne s'est intéressée à son rôle dans cette pathologie. Le but de notre travail a été double, tout d'abord, évaluer l'effet de l'agoniste de NOD1 sur la réponse Th2 dans un modèle expérimental d'asthme, et étudier la contribution potentielle des cellules dendritiques dans ce processus, et d'autre part, évaluer les relations directes entre la chimiokine CCL18 et une cellule de l'immunité innée la cellule dendritique (DC) sur la réponse adaptative.

Dans la première étude, dans un modèle expérimental d'asthme allergique, nous avons montré que l'administration de l'agoniste de NOD1, au moment de la sensibilisation à des souris sauvages, amplifie la réponse Th2 au niveau des poumons. Cette réponse est caractérisée par une augmentation de la production des chimiokines pro Th2 (CCL17 et CCL22). L'amplification de la réponse inflammatoire pulmonaire de type Th2 est reconstituée par le transfert adoptif de DCs de moelle osseuse (BM-DC) stimulées avec de l'OVA combiné à l'agoniste de NOD1. Par contre les BM-DCs provenant de souris déficientes en CCL17 sont incapables d'amplifier cette réponse. In vitro, les BM-DC murines et les DC humaines (dérivées de monocytes) produisent des quantités importantes de CCL17 et CCL22 en réponse à l'agoniste de NOD1. De plus, les DCs humaines stimulées favorisent la polarisation des cellules T vers un profil Th2. Ces résultats montrent que l'agoniste de NOD1 amplifie la réponse Th2 dans l'asthme allergique, par le biais d'une production de chimiokine pro Th2 (CCL17) par la cellule dendritique, mettant en évidence un nouvel aspect de la fonctionnalité de NOD1.

La seconde étude a consisté à évaluer l'effet direct de CCL18, une chimiokine pro Th2 sur les cellules de l'immunité innée, les cellules dendritiques. La différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-SCF et CCL18 conduit au développement de DCs de phénotype semi-mature, exprimant le CCR7, produisant de l'IL10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygénase. Ces DCs induisent le développement de Lc T régulateurs de type Tr1 produisant de l'IL-10 et capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs par un

mécanisme cytokine dépendant. Lorsque les monocytes proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu en liaison avec la diminution de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif. Ces résultats suggèrent un défaut de régulation chez les sujets allergiques qui pourrait contribuer au défaut de tolérance observé chez les sujets allergiques. Ces données font de CCL18 et de son récepteur putatif des cibles thérapeutiques potentielles.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence le rôle important des chimiokines et de leurs interactions avec les cellules dendritiques dans la déviation de la réponse immune en amont et en aval de celle-ci.

ABSTRACT

Allergic asthma is characterized by a Th2 adaptive immune response associated to the production of proTh2 mediators such as the chemokines CCL17, CCL22 and CCL18. The microbial agents can prevent, exacerbate or are suspected to induce allergic asthma, through mechanisms still incompletely elucidated which implicate pattern recognition receptors expressed by most immune and non-immune cells. NOD1, a sensor of gram negative bacteria, has been shown to play a key role in the induction of the systemic adaptive response by favoring a Th2 profile. However the role of NOD1 in allergic asthma is still unknown. The aim of this study was to examine first, the capacity of NOD1 agonist, to modulate the immune response in an experimental model of OVA-induced asthma, and the potential contribution of DCs in this process. The second aim was to evaluate the direct immunological effect of CCL18 on dendritic cells.

In the first study, our results show that in vivo, NOD1 agonist used as an adjuvant exacerbated the pulmonary Th2 response, as well as the production of the pro Th2 chemokines CCL17 and CCL22. The exacerbation of the Th2 pulmonary response was recapitulated by adoptive transfer of NOD1-stimulated bone marrow derived DCs from wild type but not CCL17- deficient mice. Both purified murine bone marrow derived DCs, and human monocyte derived DCs stimulated in vitro with NOD1 agonist exhibited an increased production of CCL17 and CCL22. Moreover, NOD1-stimulated human DCs favored T cell polarization toward a Th2 profile. Altogether these data uncover a previously unrecognized effect of NOD1, which exacerbates allergic asthma through a direct effect on DCs by the induction of the pro Th2 chemokine CCL17.

In the second study our results show that the differentiation of monocytes from healthy subjects in the presence of GM-SCF and CCL18 led to the development of DCs with a semi-mature phenotype, with intermediate levels of costimulatory and MHC class II molecules, increased CCR7 expression, which induced in coculture with allogenic naive T cells, an increase in IL-10 production. The generated T cells were able to suppress the proliferation of effector CD4⁺CD25⁻ cells, through a cytokine dependent mechanism, and exhibited characteristics of type 1 regulatory T cells. The generation of tolerogenic DCs by CCL18 was dependent upon the production of indoleamine 2,3-dioxygenase through an IL-10 mediated mechanism. Surprisingly, when DCs originated from allergic patients, the tolerogenic effect of CCL18 was lost in relation with a decreased binding of CCL18 to its putative receptor. This study is the first to define a chemokine able to generate tolerogenic DCs. However, this function was absent in allergic donors, and may participate to the decreased tolerance

observed in allergic diseases. Our data define CCL18 and its putative receptor as potential therapeutic targets.

Altogether these results underline the importance of chemokines in the deviation of the immune response.

Chapitre 1: L'asthme allergique

Définition

L'asthme est une maladie bronchique dont la définition reste encore symptomatique et descriptive. Les changements dans la définition de cette maladie au cours des dernières décennies sont le résultat de l'évolution des connaissances, notamment physiopathologiques.

L'asthme est défini par un groupe d'experts internationaux comme *"un désordre inflammatoire chronique des voies respiratoires dans lequel sont impliqués plusieurs types cellulaires et leurs médiateurs. L'inflammation chronique est associée à une hyperréactivité des voies respiratoires qui entraîne des épisodes récurrents de respiration sifflante, de dyspnée, de sensation d'oppression thoracique, et/ou de toux particulièrement pendant la nuit ou au petit matin. Ces épisodes sont souvent associés à une obstruction extensive de degré variable, souvent réversible spontanément ou sous l'effet d'un traitement"* (WHO/NHLBI workshop report, 2009). La définition présentée ci-dessus n'est pas totalement satisfaisante car elle ne prend pas en compte les facteurs étiologiques qui déclenchent ou précipitent les crises d'asthme, en particulier l'allergie. Bien que plusieurs types d'asthme aient été identifiés cliniquement, l'asthme allergique est la forme la plus répandue de la maladie. L'asthme allergique est un asthme pour lequel les symptômes sont déclenchés par l'exposition à un allergène et qui est favorisé ou aggravé par des facteurs non spécifiques comme la pollution atmosphérique, le tabagisme, les infections, le stress ou l'effort.

L'asthme est caractérisé par une forte concentration d'IgE dans le sérum des patients, des infiltrats d'éosinophiles dans l'épithélium péribronchique et périvasculaire, une hyperplasie des cellules à mucus et un épaississement de la sous-muqueuse. Des stimuli normalement inoffensifs vont entraîner une bronchoconstriction en réponse à des stimuli non spécifiques comme le froid, l'effort ou à des doses faibles d'acétylcholine.

Les symptômes peuvent survenir à différents moments de la journée, à une fréquence variable et entraîner des problèmes indésirables tels la fatigue, l'insomnie, la réduction des activités physiques, ce qui entraîne de l'absentéisme au travail ou à l'école, etc.

Bien qu'une multitude de traitements soit disponible pour soulager les symptômes de la maladie, aucun traitement curatif n'a jusqu'à maintenant vu le jour. L'asthme est une maladie multifactorielle hétérogène, associée à une variété de manifestations cliniques et de réponses thérapeutiques, qui défie encore médecins et chercheurs.

Epidémiologie de l'asthme

L'asthme représente un véritable problème de santé publique dans de nombreux pays du fait notamment de sa fréquence, des maladies associées, de la mortalité, ainsi que du poids économique généré. C'est la maladie chronique la plus courante chez les enfants. Les dernières statistiques, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), estime le nombre de sujets asthmatiques à 300 millions à travers le monde. Cette pathologie cause 250 000 décès par an dans le monde entier. Globalement, l'asthme touche davantage les habitants des pays développés que ceux des pays sous-développés (Figure 1). En France, les statistiques de 2006, selon l'enquête ESPS, estiment que l'asthme touche plus de 4,15 millions de personnes, soit 6,7 % de la population. La prévalence de l'asthme dans notre région (le Nord-Pas-de-Calais) est de 6,9 % (Source : Irdes. Données : Enquête ESPS 2006).

L'asthme est l'une des maladies les plus coûteuses dans les pays développés. Le coût pour la société peut se diviser en coûts directs, indirects et coûts intangibles, associés aux aspects psychosociaux de l'asthme. Les coûts directs comprennent les hospitalisations, les traitements en salle d'urgence, les consultations médicales, les frais de laboratoires. Les coûts indirects résultent des pertes financières non médicales dues à la maladie: absentéisme scolaire et professionnel, perte de productivité au travail, invalidité et décès. En France, L'asthme est responsable de 600 000 journées d'hospitalisation et coûte 1 milliard d'euros en dépenses de santé. Ces constatations imposent une réflexion sur les conditions de l'apparition de la maladie et sur la nécessité d'une prise en charge efficace de celle-ci.

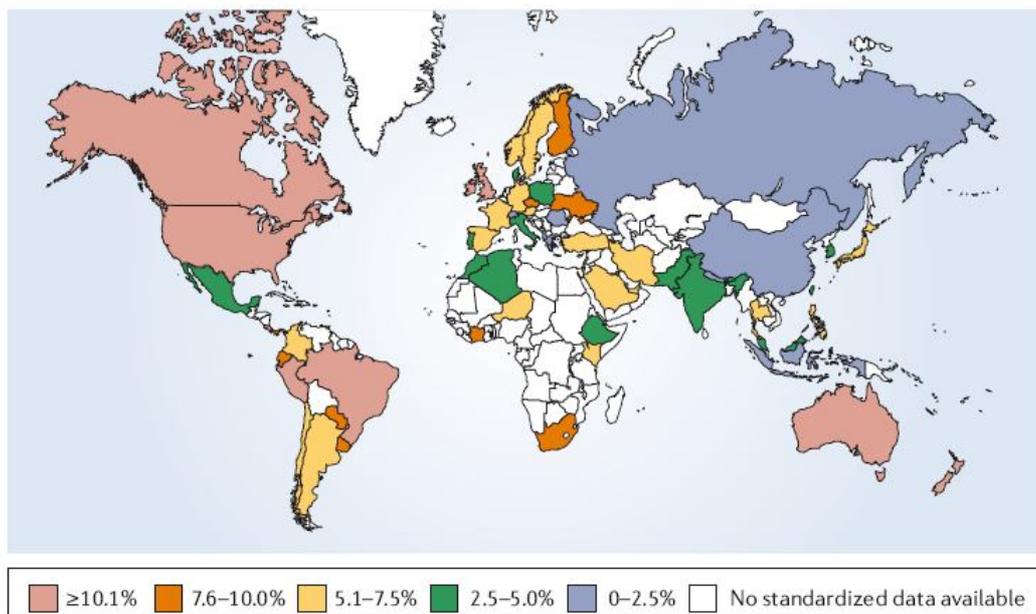


Figure 1: La prévalence de l'asthme dans le monde. D'après Devereux, 2006 [1]

Facteurs impliqués dans le développement et l'expression de la maladie

Plusieurs facteurs peuvent déclencher ou influencer la maladie de l'asthme. Ces facteurs peuvent être liés au patient lui-même (caractère héréditaire, facteurs de risques hormonaux...) et peuvent aussi être liés à son environnement (allergènes, tabagisme, pollution atmosphérique, exercice physique, alimentation, virus...).

Facteurs liés à l'hôte

La prédisposition héréditaire ou l'atopie est le principal facteur causal de l'asthme. Le risque de souffrir d'un asthme est nettement plus élevé chez les personnes ayant un lien de parenté avec des personnes asthmatiques par rapport aux personnes sans antécédents familiaux. De plus le terrain génétique est un élément essentiel de la maladie. Des études sur le génome ont mené à l'identification et à la description d'une multitude de gènes de susceptibilité de l'asthme et de réponse aux traitements, qui ont été classés dans 4 groupes distincts [2] (Figure 2). Le premier groupe comprend des gènes associés à l'*immunité innée et l'immunorégulation*. Il inclut des gènes de PRR (incluant les TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, NOD1 et NOD2), les cytokines régulatrices IL-10 et TGF- β , le facteur de transcription STAT3 et des molécules impliquées dans la présentation antigénique comme le CMH de classe II. Le second groupe comprend des gènes responsables de la *différenciation et des fonctions effectrices des cellules Th2*, c'est-à-dire les gènes des cytokines IL-4, IL-13, IL-12p40 et IL-5, le récepteur de l'IgE et des facteurs de transcription Th2. Le troisième groupe implique l'*immunité muco-sale et épithéliale* et inclut les gènes des chimiokines, des substances anti-microbiennes et des molécules impliquées dans l'intégrité de la barrière épithéliale. Les autres gènes de susceptibilité ont été découverts par clonage positionnel ; ils font partie du dernier groupe et sont associés à la fonction pulmonaire, au remodelage tissulaire et à la sévérité de la maladie. En dehors des facteurs génétiques, d'autres facteurs liés à l'hôte ont été associés au développement de l'asthme. Le stress, la prise d'antibiotiques, la vaccination contre les maladies respiratoires, l'obésité et le mode de vie de la mère pendant la grossesse (exemple du tabagisme) [3], [4], [5], [6], [7] sont rattachés à l'asthme. De plus des facteurs endocriniens semblent aussi impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme [8, 9].

Facteurs environnementaux

Il est évident que les facteurs génétiques ne peuvent expliquer l'augmentation rapide et sélective de la prévalence de l'asthme et de l'allergie dans les pays développés au cours des

dernières décennies. Pour mieux comprendre ce phénomène, il faut se pencher sur les facteurs environnementaux qui ont changé drastiquement et rapidement.

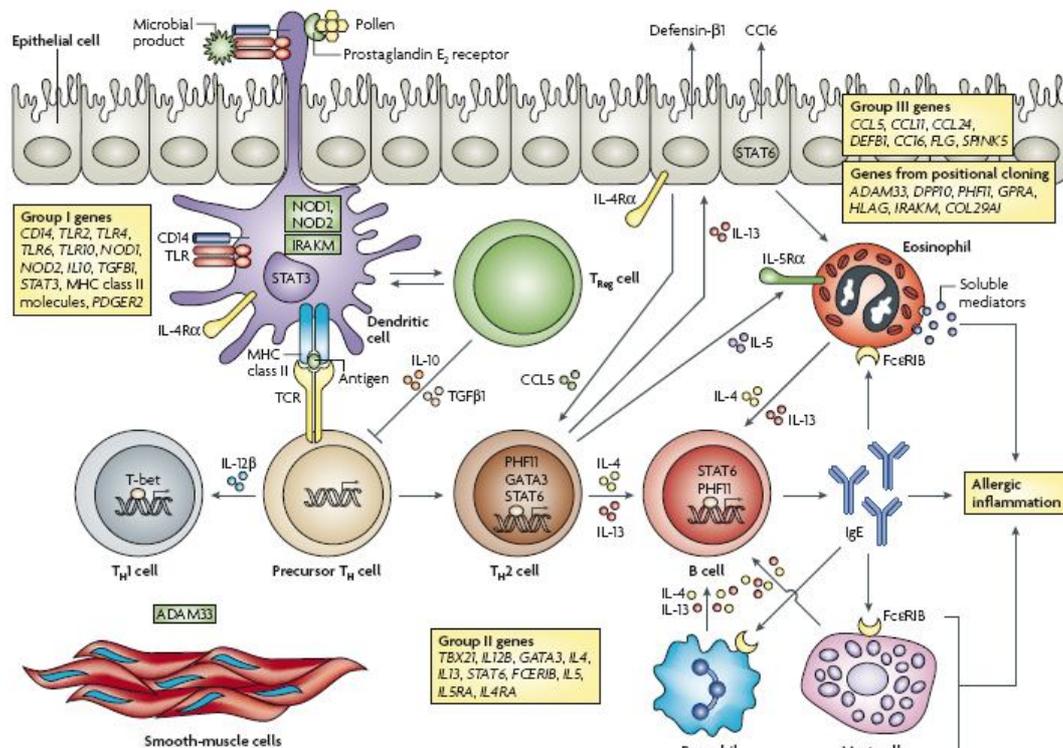


Figure 2 : Gènes de susceptibilité de l’asthme. (Tiré de Vercelli D., 2008) [2]

Les facteurs environnementaux impliqués dans l’asthme incluent bien évidemment les allergènes contre lesquels les patients développent la maladie. Les plus fréquents sont les acariens ainsi que certains pollens et antigènes d’origine animale [10-12], [13]. Les irritants présents dans l’air comme la fumée de cigarette et les particules issues de la combustion du diesel contribuent également à la pathogenèse de la maladie [14], [15], [16-18]. L’ozone, les moisissures et l’humidité semblent aussi être des facteurs aggravants [19]. L’hypothèse qui a reçu la plus grande attention pour expliquer l’augmentation des prévalences de l’asthme est «l’hypothèse de l’hygiène» qui est basée sur l’équilibre Th1/Th2. Ce concept stipule que l’exposition bactérienne et virale, au cours de la petite enfance, favorise le développement d’un profil inflammatoire Th1 et par conséquent, inhibe le développement de pathologies Th2 comme les allergies et l’asthme. Le changement des règles d’hygiène dans les pays développés, par exemple, ont entraîné une réduction marquée de l’exposition microbienne et par conséquent, une désorganisation de la réponse inflammatoire protectrice de type Th1. De nombreuses observations épidémiologiques ont apporté des arguments en faveur de cette hypothèse. D’une part, des maladies infectieuses sévères comme la malaria et la tuberculose

sont inversement reliées à l'allergie [20]. Par ailleurs, des études ont montré une relation inverse entre l'asthme et l'exposition directe à l'environnement rural riche en endotoxine [21], [22, 23], [24], [25], [26], [27], [28]. Cependant d'autres arguments sont en défaveur de cette théorie. Il faut mentionner que les maladies Th1 et Th17, incluant le diabète, la sclérose en plaque et les maladies inflammatoires de l'intestin, sont également en forte hausse dans les pays développés [29]. De plus il existe une corrélation entre le diabète de type 1 et l'asthme [30]. Ces observations à priori contradictoires ont été réconciliées par la redécouverte des cellules régulatrices capables d'inhiber l'ensemble des profils T helper et qui sont déficitaires dans un grand nombre des pathologies sus citées. Les infections pulmonaires d'origine virale comme l'influenza amplifient la réponse asthmatique malgré le développement d'une réponse immune anti-virale de type Th1. Inversement, une forte réponse Th2 résultant d'une infection parasitaire est plutôt protectrice [31], [32], [33, 34]. Dans l'ensemble les études semblent montrer que les infections entretiennent une relation ambiguë avec l'asthme, étant tantôt capable d'exacerber les manifestations de l'asthme et tantôt exerçant des effets protecteurs contre cette maladie.

Les facteurs environnementaux interagissent avec les facteurs génétiques et influencent le développement de la maladie. Chez certains individus, la stimulation environnementale conduira au développement de l'allergie et de l'asthme alors que, chez d'autres individus, cette stimulation entrainera une réponse immune protectrice (tolérance) contre la maladie.

La réaction inflammatoire de l'asthme allergique

La physiopathologie de la réaction allergique peut être scindée en trois phases successives. La première est la **phase de sensibilisation** au cours de laquelle s'instaure la mémoire immunitaire. Dans le cas de l'asthme allergique, la sensibilisation a lieu au niveau des voies respiratoires. L'antigène est pris en charge par les cellules dendritiques (DCs) des voies respiratoires qui sont activées et migrent vers les ganglions médiastinaux qui drainent les poumons. L'antigène est présenté aux cellules T, initiant ainsi la conversion des cellules T CD4 naïves en cellules Th2. Ces cellules Th2 interagissent avec les cellules B et induisent la production des IgE. Ces derniers diffusent localement et gagnent la circulation lymphatique et sanguine pour enfin être distribuées systématiquement. Les IgE spécifiques et non-spécifiques se lient aux récepteurs IgE de haute affinité (FcεRI) à la surface des cellules, plus particulièrement des mastocytes. Cette phase de la réponse allergique est asymptomatique mais elle met en veille un état immunitaire prêt à répondre rapidement en cas de réexposition des voies respiratoires à l'allergène [35] (Figure 3).

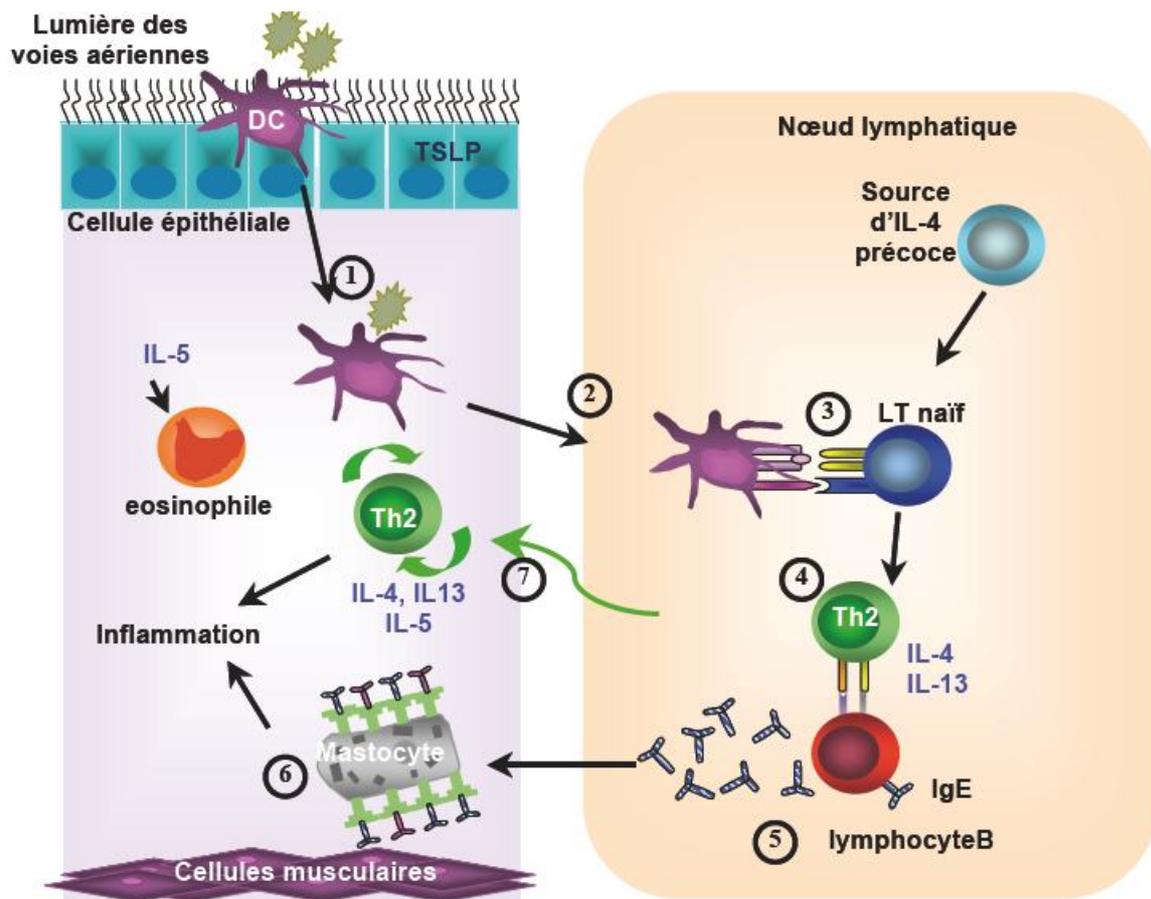


Figure 3 : Phase de sensibilisation à l'allergène dans les voies respiratoires. Tiré de Galli et al 2008) [35]. Les cellules dendritiques de la sous-muqueuse vont être activées, phagocyter l'allergène (1) et vont migrer vers les ganglions lymphatiques (2) où elles vont pouvoir présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs (3). En présence d'IL-4, les lymphocytes T vont se différencier en lymphocytes Th2 (4). La production d'IL-4 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2 et la liaison des molécules de costimulation, va conduire à la production des IgE par les lymphocytes B (5). Les IgE vont se fixer aux récepteurs Fc à la membrane des mastocytes (6). Ceci entraîne une sensibilisation, qui va entraîner une réponse des mastocytes au moment de la deuxième exposition à l'allergène. Les lymphocytes Th2 vont migrer vers les voies aériennes ou ils vont s'amplifier et devenir des lymphocytes Th2 effecteurs mémoire (7).

La Phase effectrice comprend les phases de réaction immédiate et retardée. La phase immédiate a lieu dans les minutes qui suivent une nouvelle exposition à l'allergène contre lequel un individu est sensibilisé. Cette phase se caractérise par l'apparition, dans les premières minutes, de signes cliniques dépendants du tissu cible (irritation tissulaire, formation d'œdème, sécrétion de mucus et obstruction bronchique marquée due à un spasme du muscle lisse bronchique). Durant cette phase, l'allergène est reconnu par des IgE spécifiques, liés aux FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles. Le complexe IgE/allergène induit l'agrégation des récepteurs, activant les mastocytes et les basophiles qui

libèrent immédiatement le contenu de leurs granules cytoplasmiques. Il s'agit des molécules vaso-actifs (les leukotriènes, l'histamine, les prostanoïdes) ou cytokiniques et chimiotactiques [36]. Ces derniers induisent une vasodilatation et une bronchoconstriction et augmentent la production de mucus par les cellules caliciformes et la perméabilité vasculaire.

Outre leur rôle dans la réaction immédiate, les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement de cellules inflammatoires. La phase tardive se déclare après 6-12 heures et s'éteint dans les 12-24 heures. Elle est caractérisée par l'infiltration des tissus enflammés par plusieurs types cellulaires dont les éosinophiles, les lymphocytes T et les basophiles. Ces cellules libèrent à leur tour des substances pro-inflammatoires cytotoxiques, telles que les protéines des granules des éosinophiles (Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil Peroxydase (EPO), responsables de la destruction de l'épithélium et de l'inflammation de la sous-muqueuse diminuant alors le diamètre des voies aériennes. Les sous populations lymphocytaires T auxiliaires majoritairement Th2 interviennent dans le recrutement des cellules effectrices et dans l'activation de l'épithélium bronchique. Cette inflammation est chronique et aboutit à long terme à une modification de l'architecture des voies respiratoires, également nommée remodelage bronchique. Ce dernier se caractérise par la desquamation de l'épithélium, une métaplasie des cellules caliciformes, un épaississement de la membrane basale et une hyperplasie des cellules musculaires lisses.

Le rôle des différents acteurs cité ci-dessus dans les phases de la réaction allergique sera passé en revue dans les pages suivantes.

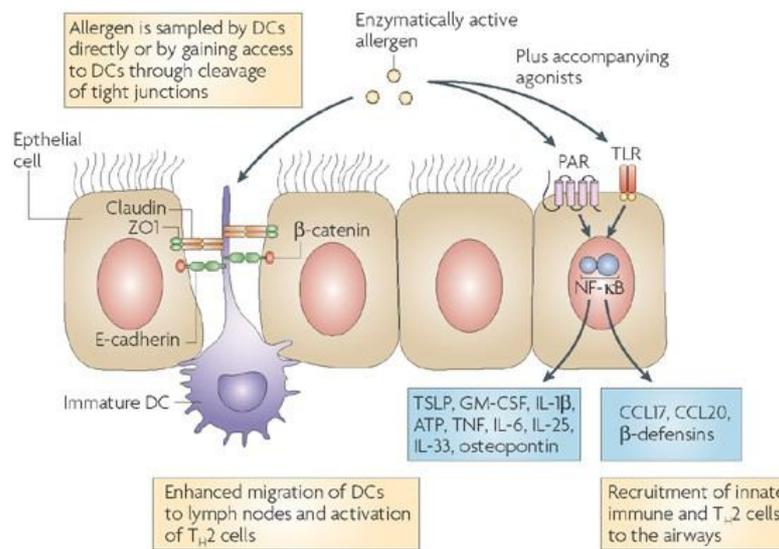
Acteurs cellulaires

Les cellules dendritiques

Capture de l'antigène

Pendant la phase de sensibilisation, les allergènes qui traversent la barrière épithéliale, sont capturés par les cellules dendritiques (DC), dites immatures, présentes sous la membrane basale de l'épithélium bronchique. Certaines DC étendent leurs dendrites jusqu'à la lumière des voies respiratoires grâce à la formation de jonctions occlusives avec les cellules épithéliales, sans interférer avec leurs fonctions [37], [38], [39]. La **Figure 4** illustre cette interaction. En outre, certains allergènes (pollen de Cupressaceae, acariens, Alternaria) possédant une activité protéasique forte, sont capables de digérer les protéines de jonction, ainsi augmentant la perméabilité de l'épithélium et l'accessibilité aux cellules dendritiques [40]. La DC fait intervenir trois voies principales pour capturer l'antigène présent dans son

environnement : la macropinocytose, l'endocytose par récepteurs interposés et la phagocytose. La macropinocytose permet l'internalisation d'antigènes solubles. La phagocytose permet l'internalisation de virus, bactéries,...etc. L'endocytose par récepteurs interposés repose sur l'usage de récepteurs membranaires spécifiques des composés à endocyster (Figure 5) (les récepteurs type lectine-C et les récepteurs de type Fc) [41], [42].



Nature Reviews | Immunology

Figure 4 : Interaction entre les cellules épithéliales, les DCs et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique. Tiré de Hammad H. and Lambrecht B.N., 2008 [37].

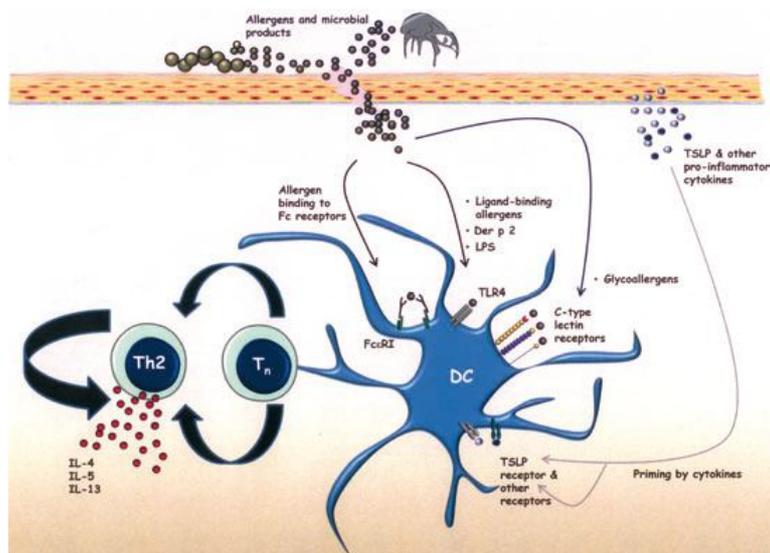


Figure 5 : Activation des cellules dendritiques, via les récepteurs membranaires, par les allergènes provenant de diverses sources. Tiré de Platts-Mills, T.A. and J.A. Woodfolk, 2011 [43].

La cellule dendritique exprime de nombreux récepteurs de l'immunité innée dénommés PRRs (Pathogen Recognition Receptors) qui ont la propriété de reconnaître une vaste gamme de motifs microbiens, les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Ces récepteurs ont pour fonction d'endocyter les microorganismes et/ou d'activer la DC. Nous décrivons ces récepteurs dans le chapitre III. Comme la plupart des allergènes inhalés sont contaminés par des lipopolysaccharides (LPS) et peptidoglycanes, ces contaminants peuvent exercer des effets adjuvants en activant les DCs via les PRR. Ainsi, il a été montré que allergènes d'acariens retrouvés dans les poussières de maison d'acariens sont de puissants activateurs de TLR [44]. Par ailleurs, les allergènes eux mêmes peuvent être reconnus par les PRR présents à la surface de la DC. Par exemple deux allergènes ligands de PRR sont Der p 2 et le Ara h 1 (allergènes de l'arachide) qui lient et activent TLR4 et DC-SIGN respectivement [44], [45].

Maturation et migration

Après internalisation, l'antigène est dégradé au sein des compartiments intracellulaires tels que les endosomes et les lysosomes. Les fragments peptidiques de l'antigène sont alors couplés avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de class II (CMHII) et présentés à la surface des cellules dendritiques. L'internalisation de l'antigène entraîne également la maturation de la DC qui s'accompagne de différents changements phénotypiques. La DC va d'une part exprimer des récepteurs chimiokines tel le CCR7 permettant sa migration spécifique vers les ganglions lymphatiques drainant l'épithélium, via les vaisseaux lymphatiques qui expriment les ligands de CCR7 (CCL19, CCL21) [46, 47]. Récemment, le récepteur CCLR2 a été impliqué également dans le contrôle de la migration des DCs pulmonaires [48]. D'autre part la DC va surexprimer la molécule CMHII ainsi que les molécules co-stimulatrices (comme CD40, CD80, CD86, etc...) nécessaires à l'activation des lymphocytes T (LT). Cette maturation induit aussi la sécrétion de cytokines et de chimiokines par les DCs. Par ailleurs, des protéines (IL33, IL25, TSLP...) générées dans l'épithélium en réponse au stimulus inhalé, vont influencer l'activation et la maturation des cellules dendritiques.

Présentation de l'antigène au lymphocyte T

Les interactions étroites entre la DC et le lymphocyte sont décrites comme de véritables synapses immunologiques. La formation de la synapse est initiée par l'interaction entre les molécules LFA-1 et ICAM 2/3 exprimées à la surface du LT et les molécules ICAM-1 (CD54) et DC-SIGN (CD209) exprimées sur la DC mature. D'autres molécules telles que les

molécules CD4 et CD8 et des molécules de co-stimulation sont ensuite recrutées au niveau de la synapse immunologique pour renforcer le dialogue entre la DC et le lymphocyte T [49].

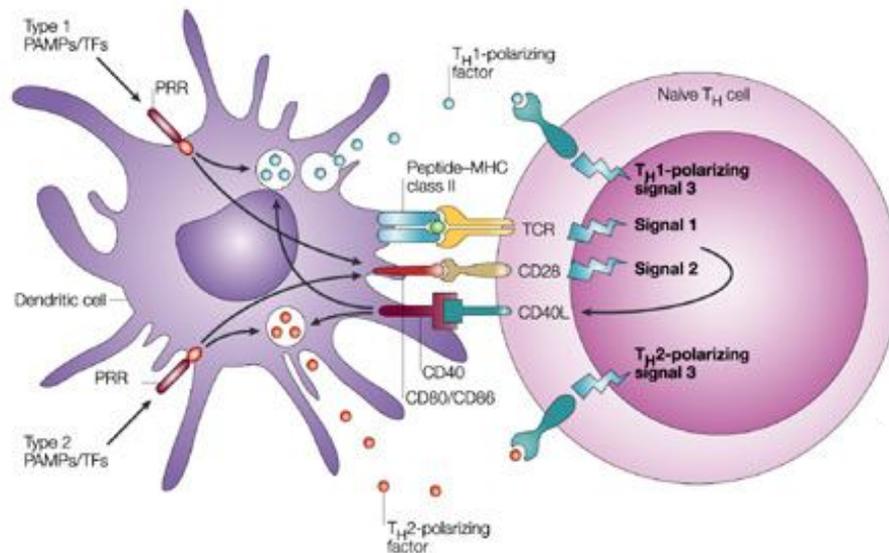


Figure 6 : Interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte T. Le schéma reprend les trois types d'interaction nécessaires à une polarisation T efficace. Le premier signal est apporté par la présentation antigénique via le CMHII au TCR. Le second signal provient des molécules de costimulation CD80/CD86, régulées par l'activation des PRR et exprimées à la surface de la DC. Ces molécules activent le CD28 lymphocytaire qui induit notamment l'expression du CD40L et permet la stimulation en retour de la cellule dendritique. Le troisième signal est constitué par des médiateurs polarisant solubles ou membranaires (IL12, IFN- γ ou ICAM-1 pour les Th1 ; IL4, IL13, ou OX40L pour les Th2) apportés essentiellement par la DC activée par les PRR [50].

L'engagement de quelques TCR initie un premier signal conduisant à des modifications du cytosquelette, à la redistribution des autres TCR et à la relocalisation, à proximité des TCR, des molécules de co-stimulation B7. Ces molécules de co-stimulation interagissent avec les molécules CD28 et CTLA-4 portées par les lymphocytes T. D'autres molécules de co-stimulation participent au dialogue DC-lymphocytes T. Ainsi, les interactions CD40/CD40-ligand sont aussi impliquées dans la genèse de signaux co-activateurs. Cette étape initie la conversion des cellules T CD4 naïves en cellules effectrices.

La DC et la polarisation de la réponse T

Les cellules dendritiques interviennent dans le dialogue avec les lymphocytes T comme activateurs mais aussi comme régulateurs de la réponse immunitaire, car elles polarisent les lymphocytes T en les orientant vers la voie de différenciation la plus adaptée à l'agression (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg...). Cette polarisation va dépendre tout d'abord du type de DC impliqué qui se distingue sur des bases phénotypiques, morphologiques, fonctionnelles, ontogéniques et/ou anatomiques [51], le profil d'expression des molécules de co-stimulation, le microenvironnement cytokinique et chimiokinique local et la manière dont l'antigène est présenté aux lymphocytes T (densité des complexes de CMH II/peptides antigénique, associations de rafts lipidiques) ainsi que la durée du contact et le ratio DC/T [52].

Dans l'asthme allergique les lymphocytes Th2 sont au centre de la réponse inflammatoire. Chez la souris, on sait qu'une faible expression de CD80/86, ainsi que la production de d'IL-12 et d'IFN- γ par les DCs au moment de la présentation antigénique induit une différenciation vers un profil de type Th1 [53]. Par contre, une forte stimulation CD80/86 et l'apport d'IL4 exogène, en absence d'IFN γ polarisent les lymphocytes vers un profil de type Th2. Chez l'homme, une forte production d'IL-12, l'expression de CD80 et CD70 favorisent la différenciation vers un profil Th1 [54], alors qu'une très faible production d'IL-12, l'expression majoritaire de CD86 et d'OX40L oriente le lymphocyte vers un profil de type Th2 [55], [56]. Chez les sujets allergiques, les DCs activés par l'allergène Der p 1 induisent une réponse Th2 en augmentant l'expression de CD86 ainsi que la production d'IL-10 et de chimiokines pro Th2 (CCL17, CCL22). En revanche, les DCs d'un sujet sain expriment le CD80 et produisent de l'IL-12 et la chimiokine proTh1 (IP-10) après activation par l'allergène [57], [58], [59]. D'autres molécules de surface comme OX40L et ICOSL (inducible costimulator ligand) ont été impliquées dans le développement d'une réponse Th2 [60-62]. En effet, selon les signaux de danger rencontrés et leur état de maturation, les DCs sont responsable de la réponse immune ou de la tolérance. En condition d'homéostasie, les DCs maintiennent un état de tolérance face aux antigènes inoffensifs [63]. Pour cela, les DCs migrent continuellement jusqu'aux ganglions lymphatiques médiastinaux et présentent des Ag dans un contexte tolérogénique. Il a été montré que, en absence d'infection, les DCs sécrètent de l'IL-10 et expriment les molécules ICOS-L et DP-L1 (program cell death 1) favorisant la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules Treg [64]. Les cellules Treg ainsi produites contrôlent l'inflammation en produisant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- β .

Les différentes populations de cellules dendritiques

Les DC sont classées en deux sous-populations en fonction de leur origine biologique et de leurs fonctions : les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) (Figure 7).

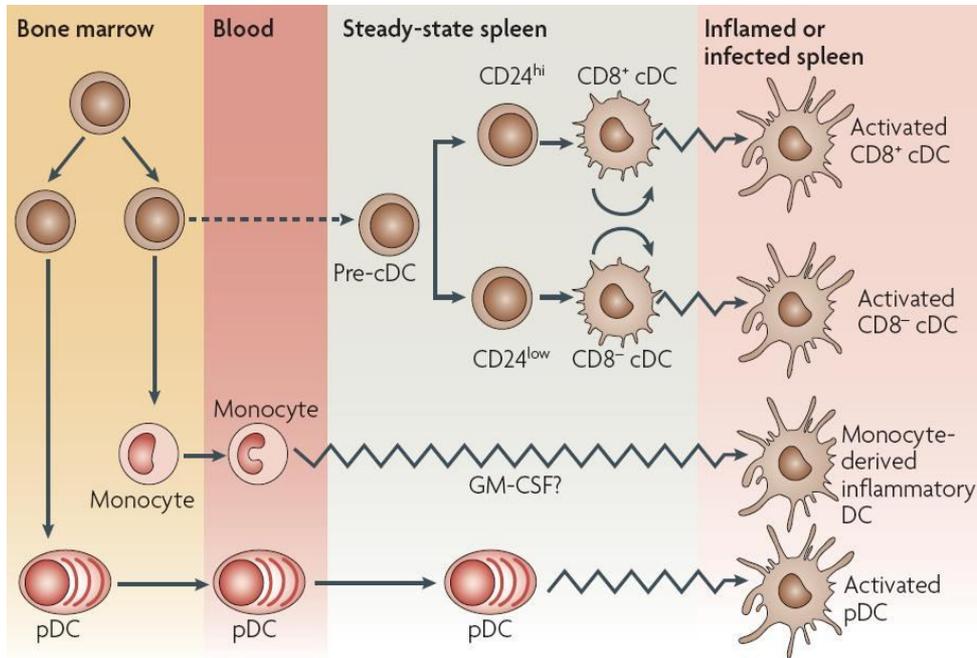


Figure 7: Développement des sous populations de DC. D'après Shortman, K. and S.H, 2007 [65]. Issues de précurseurs hématopoïétiques communs ($CD34^+$), les DC d'origine myéloïde sortent de la moelle pour s'accumuler au niveau tissulaire. Les pDC proviennent quant à elles de précurseurs lymphoïdes et sont essentiellement présentes au niveau circulant. Ces dernières peuvent toutefois s'accumuler au niveau tissulaire en situation inflammatoire.

Les mDC sont subdivisées en migratoires et résidentes. Les migratoires correspondent au modèle classique des DCs. Elles résident à l'état basal en périphérie. Suite à la phagocytose d'une particule antigénique et/ou à la réception de signaux de danger, elles migrent vers les ganglions. Elles arrivent à l'état mature dans les organes lymphoïdes où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Ex : cellules de Langerhans, DC des muqueuses. Les DCs résidentes sont dans les organes lymphoïdes, où elles se trouvent normalement à l'état immature. Elles collectent et présentent les antigènes du soi ou étrangers au sein même des organes lymphoïdes. Ex: la plupart des DCs du thymus et de la rate. Il existe également des DCs inflammatoires qui sont recrutées dans les tissus suite à une inflammation ou une infection. Elles ne sont pas présentes à l'état de repos. Elles seraient principalement issues de

la différenciation des précurseurs myéloïdes à savoir les monocytes du sang. Les pDC, se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques au niveau des organes lymphoïdes, elles sont circulantes ou résidentes, rondes et sans dendrites à l'état basal mais les développent après activation. Ces cellules sont essentiellement impliquées dans la réponse anti-virale, après stimulation par un antigène viral, elles produisent de grandes quantités d'interférons de classe I (IFN α , IFN β) [66].

Contrairement au mDC, les pDC ont de faibles capacités de phagocytose et de pinocytose [67]. Cependant, il a été montré que ces cellules sont également capables d'internaliser les antigènes puis de migrer vers les ganglions pour effectuer une présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs [68], [69]. Toutefois, contrairement aux mDC, ces cellules induisent une tolérance antigénique dans des modèles animaux d'asthme allergique. La déplétion des pDC induit une réponse Th2 au niveau des voies aériennes, alors que le transfert adoptif des pDC empêche le développement de l'asthme [70]. Une explication possible pour les propriétés tolérogènes des pDC est leur capacité à produire de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la prolifération des cellules T [71], mais aussi leur capacité à induire de l'IL-10 et des Treg [72]. Une augmentation du nombre de DC myéloïdes dans la muqueuse des voies respiratoires et dans le lavage broncho-alvéolaire a aussi été montrée dans un modèle murin d'asthme. Cette augmentation est due à une production accrue de progéniteurs issus de la moelle osseuse [73]. Chez l'homme, le rôle des pDC reste moins clair, des pDC traitées à l'IL3 sont en effet à la fois capables d'induire une polarisation des T vers un profil Th2 par une voie OX40-OX40L dépendante, mais elles sont également capables d'inhiber cette différenciation Th2 par une production d'IFN de type I en cas d'infection virale [74]. Par ailleurs, chez les patients atteints de dermatite atopique, le nombre de pDC cutanées est fortement diminué [75]. La muqueuse nasale et l'épithélium bronchique de sujets asthmatiques allergiques contiennent un nombre accru de DC à l'état basal par rapport aux sujets non allergiques et ce nombre est encore augmenté après exposition à l'allergène [76], [77], [78]. Alors qu'aucune accumulation de pDC n'est observée au sein des bronches, des DC CD1a⁺ HLA-DR⁺ s'accumulent dans la lamina propria au cours de la rhinite allergique [79], [80], et des DCs myéloïdes sont recrutées depuis le sang périphérique [81]. Parallèlement aux pDC, il semble que les mDC puissent également induire une tolérance vis-à-vis des allergènes en fonction de leur phénotype. Les pDC ne représentent en effet qu'une très faible proportion des cellules dendritiques tissulaires au regard du réseau très dense de mDC. Par ailleurs, les mDC prélèvent continuellement les allergènes exposés aux épithélia, et elles présentent ces allergènes aux lymphocytes dans les ganglions, il est surprenant qu'une partie seulement de la

population développe des réponses contre ces antigènes non infectieux. Il semble donc qu'en situation normale, les mDC permettent la mise en place d'une tolérance. Expérimentalement, l'exposition intranasale de souris à des protéines n'induit pas de réaction inflammatoire [82]. En revanche, la sensibilisation préalable des animaux à cette protéine, par voie systémique avec un adjuvant, provoque une réaction inflammatoire Th2 au niveau du tractus respiratoire après challenge allergénique. Les données expérimentales démontrent qu'il existe deux mécanismes différents à l'origine de la tolérance antigénique, avec un rôle central des cellules dendritiques. La stimulation des lymphocytes T naïfs par une DC faiblement mature peut entraîner un défaut d'activation lymphocytaire conduisant à un état anergique [83]. D'ailleurs, notre équipe a montré récemment que la différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-CSF et CCL18 génère des DC de phénotype semi-mature induisant le développement de Lc T régulateurs de type Tr1. Dans certaines conditions de stimulation, en particulier en produisant certaines cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 ou le TGF- β , ou encore par le biais de ligands type ICOSL, les mDC peuvent également générer un type des lymphocytes T régulateurs [84], [82]. Ces cellules permettent l'établissement d'une tolérance spécifique à l'allergène, transmissible par ailleurs à d'autres animaux par transfert lymphocytaire.

Un autre mécanisme générateur de tolérance a été récemment décrit, il s'agit des DCs productrices d'une enzyme, l'IDO (Indoleamine-2,3-dioxygénase), impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel. Ce catabolisme génère des processus de régulation de la réponse immune, avec un effet sur les Lc T décrit par Lee et al, en 2002, la dégradation du tryptophane induit l'arrêt du cycle cellulaire et mène vers l'apoptose des cellules T. Par ailleurs, les métabolites générés par le catabolisme du tryptophane ont une activité pro-apoptotique *in vitro*. La DC productrice d'IDO agit également sur les DC IDO⁻ *in vivo* et supprime leur capacité de présentation antigénique. Certains auteurs ont démontré que les Treg, par une voie dépendante du CTLA4, induisent l'expression de l'IDO dans les DCs murines [85]. Dans un modèle murin d'asthme expérimental, l'IDO inhibe les paramètres de l'inflammation allergique, et ce via le TLR9 [71].

L'importance des DC dans l'asthme

La DC joue un rôle essentiel lors de la phase de sensibilisation et au cours de la phase effectrice de la réaction inflammatoire. Des études ont montré que les DCs sont directement la cause de la sensibilisation aux allergènes inhalés. L'administration intra-trachéale de DC myéloïdes chargées avec de l'ovalbumine (OVA) à des souris naïves induit une sensibilisation

qui conduit à une vigoureuse réponse Th2 et à une inflammation pulmonaire lors d'une réexposition à l'allergène [86, 87]. Les DCs chargées à l'OVA sont également capables d'induire un phénotype asthmatique complet lorsqu'elles sont injectées en intra-trachéale à des souris préalablement sensibilisées et cela en absence de réexposition à l'antigène et peuvent également exacerber les symptômes allergiques chez des souris déjà sensibilisées [88]. Des expériences de déplétion ont mis en évidence le rôle essentiel des DCs dans le processus allergique. Ainsi, une déplétion systémique des DCs myéloïdes pendant la phase de réexposition à l'allergène abroge tous les signes caractéristiques de l'asthme et ceci s'accompagne d'une diminution des cytokines Th2 effectrices [89], même quand le processus inflammatoire est engagé. Une déplétion sélective cette fois des DCs pulmonaires CD11c⁺ élimine l'inflammation pulmonaire et diminue la génération de cellules Th2 effectrices [90]. Les DCs pulmonaires produisent les chimiokines CCL17 (TARC; thymus and activation-regulated chemokine), CCL22 (MDC; macrophage-derived chemokine) et CCL11 (éotaxine) qui attirent dans les poumons les cellules Th2, les basophiles et les éosinophiles [91]. Une fois la polarisation de la réponse T induite au niveau ganglionnaire, il est probable que les cellules dendritiques migrent à nouveau vers le site d'exposition antigénique pour permettre de restimuler et d'entretenir l'activité des lymphocytes Th2 et la pérennisation de l'inflammation. Il a en effet été démontré dans un modèle d'asthme murin qu'après sensibilisation à un allergène, les cellules dendritiques matures stimulent les lymphocytes T au niveau des poumons [92], ce qui démontre l'importance d'une restimulation locale dans l'établissement d'une réponse inflammatoire forte. De plus, une corrélation a été établie entre l'utilisation de stéroïdes inhalés chez des patients asthmatiques et une réduction du nombre et de la fonction des DCs des voies aériennes [93]. Ces données suggèrent que les DCs sont essentielles durant l'initiation et la maintenance de l'inflammation des voies aériennes.

Les lymphocytes T

Les cellules T activées jouent un rôle important dans l'asthme. Pendant une longue période, la réponse des lymphocytes T dans l'asthme a été interprétée dans le cadre du fameux paradigme Th1/Th2 dans lequel le développement des cellules Th2 est considéré comme capital et essentiel dans le développement de l'asthme allergique. La participation des cellules T dans la pathogenèse de l'asthme allergique a été élargie pour inclure la contribution des cellules T régulatrices (Treg) et de nouvelles sous populations Th17 et Th22.

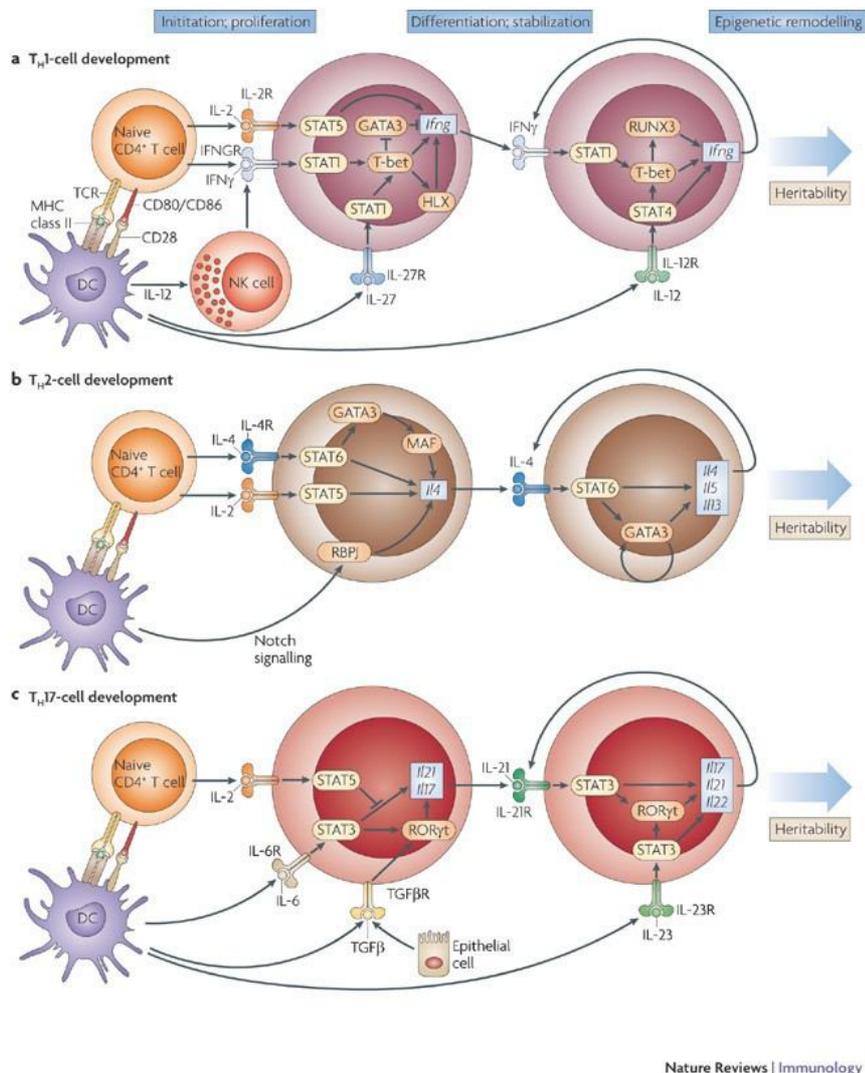


Figure 8 : Développement des lignées Th1, Th2 et Th17. Tiré de Wilson C.B. et al, 2009 [94].

Lymphocytes Th2

Les cellules Th2 jouent un rôle central dans l'inflammation allergique. Après activation les DCs et d'autres cellules, produisent les cytokines responsables de la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2. L'interaction entre le TCR et CMH de classe II de la DC induit classiquement la production d'IL-2 et d'IL-4 par les cellules T, capables d'activer STAT5 et STAT6 respectivement, qui mènent à la production d'IL-4 supplémentaire et amplifient en boucle la réponse inflammatoire de type Th2. La signalisation résultant de la liaison de l'IL-4 avec son récepteur passe par GATA3 (GATA-binding protein 3), qui entraîne l'expression des gènes associés aux cytokines propres à l'inflammation de type Th2

[95], [96]. Ces cytokines sont impliquées dans la commutation de classe d'immunoglobulines des cellules B vers la synthèse d'IgE (IL-4 et IL-13), le recrutement des mastocytes (IL-4, IL-9 et IL-13) ainsi que la stimulation et la maturation des éosinophiles (IL-3, IL-5 et GM-CSF) et des basophiles (IL-3) [97]. Les cellules Th2 différenciées sont recrutées dans le site inflammatoire par la production des chimiokines CCL1, CCL2, CCL11, CCL22 et CCL17 [98]. Le facteur de transcription essentiel pour la différenciation des cellules Th1 est T-bet. L'expression de T-bet est contrôlée par STAT4, induit par la liaison de l'IFN- γ à son récepteur. Lorsqu'il est phosphorylé, T-bet peut s'associer à GATA-3 et inhiber la synthèse des cytokines de type Th2 [97]. Les voies Th1 et Th2 sont antagonistes.

Lymphocytes Th17

En 2000, Infante-Duarte et al, ont montré que les cellules T productrices d'IL-17 constituaient une population distincte des cellules Th1 et des cellules Th2 chez les souris et les humains [99]. Ces cellules ont été nommées Th17 [100]. Elles produisent en effet IL-17A et IL-17F mais aussi de IL-22, IL-21 et IL-26 [101, 102]. Elles expriment spécifiquement les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α [103], [104], [105] et non pas T-bet ou GATA-3, ce qui contribue à la justification de la création d'un groupe lymphocytaire indépendant des autres. La différenciation Th17 *in vitro* requiert la présence d'IL-6 et de TGF- β [103] et elle est amplifiée par l'IL-23 chez la souris. Par contre chez l'homme, tous les auteurs ne sont pas d'accord à propos des cytokines impliquées dans la voie Th17. Pour certains auteurs, l'activation de la voie Th17 est induite par l'IL-1 β et l'IL-23 [101]; alors que pour d'autres, le TGF- β , l'IL-23, l'IL-6 et l'IL-1 β sont indispensables à la différenciation des cellules Th17 [106]. L'axe IL17/IL23 a été initialement décrit comme permettant la mise en place d'une défense antibactérienne et antifongique [107, 108]. Par ailleurs, certains motifs bactériens semblent favoriser la [107] différenciation Th17 par une activation spécifique des cellules dendritiques [109].

Des études ont trouvé une association entre les lymphocytes Th17 et l'asthme [110], [111]. L'IL17 est retrouvé dans les expectorations, les lavages broncho-alvéolaires, le sérum et les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques [112], [113], [114, 115], [116]. De plus, le niveau d'expression d'IL-17 est étroitement corrélé au degré de sévérité de l'hypersensibilité bronchique chez les patients asthmatiques [117]. L'IL-17 potentialise l'activation des fibroblastes, des cellules épithéliales et des cellules musculaires lisses. Ainsi, cette cytokine favorise la production d'IL-6, d'IL-8, d'IL-11 et de CXCL1/Gro α par les fibroblastes bronchiques humains [113]. L'IL-17 induit l'activation et l'accumulation des

neutrophiles dans les tissus par un mécanisme dépendant des chimiokines CXCL8 ou GRO- α et également le CCL20 [118]. Les lymphocytes Th17 peuvent également stimuler la production des mucines, MUC5AC et MUC5B, par les cellules épithéliales bronchiques humaines *in vitro* [119]. Chez la souris, les données expérimentales démontrent un rôle plus complexe des réponses Th17. Il a été démontré par l'étude des souris déficientes en l'IL-17R que les cellules Th17 étaient indispensables à la phase d'induction (sensibilisation) du développement des réponses asthmatiques expérimentales. Par contre, la neutralisation de l'IL17 dans la phase effectrice du modèle d'asthme murin conduit à une augmentation de l'inflammation et son administration inhibe le recrutement des éosinophiles et protège les animaux contre l'hyperréactivité bronchique [120]. Ces données confèrent à l'IL17 un rôle protecteur lors de l'exposition allergénique. En revanche, une étude récente a montré que la sensibilisation des souris, avec l'ovalbumine, par voie aérienne induit une modeste réponse Th2 et une forte réponse Th17, favorisant le recrutement des neutrophiles et l'AHR [121]. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes Th17 participent à la physiopathologie de l'asthme.

Lymphocytes T régulateurs (Treg)

C'est une population de lymphocytes suppresseurs spécialisés dans l'inhibition de réponses inflammatoires. Il a été suggéré que le déclenchement de l'asthme chez l'homme pourrait être lié à un développement insuffisant des lymphocytes T régulateurs ou/et une inhibition de leur fonction [122], [123, 124].

Il existe deux classes de lymphocytes T régulateurs: Les T régulateurs naturels et les T régulateurs adaptatifs. Les lymphocytes T régulateurs naturels, caractérisé par un phénotype CD4⁺CD25⁺, sont présents spontanément sans induction. Cette population est d'origine thymique et elle représente environ 5% des lymphocytes T circulants [125]. Différents marqueurs ont été proposés pour identifier spécifiquement ces Treg. Parmi ceux-ci, le CD25, le GITR, le CTLA-4, CD103 et FoxP3 (Forkhead box3). Ce dernier marqueur est essentiel à leur développement et leurs fonctions [126, 127]. Globalement, les mécanismes de suppression de ces populations régulatrices sont plutôt indépendants de la production de cytokine exogène, mais dépendante d'un contact cellulaire. Les Treg naturels semblent par ailleurs capables d'induire *in vitro* des Treg adaptatif à partir de T helper conventionnels [128], [129]. La seconde grande catégorie de Lc Treg est constituée par les Treg dits adaptatifs. Ces cellules se différencient en périphérie lors de la maturation de T CD4⁺, dans des conditions particulières. Vraisemblablement, l'apport de TGF- β exogène, mais aussi d'IL10 par la DC, associés cette fois-ci à une faible stimulation par des molécules CD80-

86/CD28 sont nécessaires à leur différenciation. Les Treg naturels peuvent contribuer à cette différenciation par apport d'IL-10 exogène. Il a été montré que la génération de ces cellules peut-être induite *in vivo* par administrations régulières de faibles doses d'antigènes [82]. Le mode d'action de ces Treg adaptatifs semble plutôt contact indépendant et lié à la production de cytokines suppressives comme l'IL-10 et le TGF- β .

Il existe plusieurs mécanismes de suppression induit par les Treg selon le contexte et la fonction cellulaire régulée. Le premier mécanisme implique la production de cytokines inhibitrices. L'IL-10 et le TGF- β ont été décrits depuis longtemps comme ayant des propriétés suppressives. En outre, il a été montré que ces cellules exercent également des fonctions suppressives via la production d'IL-35 [130]. La régulation par sécrétion d'IL-10 semble un mécanisme commun aux Treg naturels et aux Treg adaptatifs antigènes spécifiques (appelés également Tr1). L'IL-10 a d'abord été décrite comme une cytokine spécifiquement Th2 [131] car inhibitrice de la sécrétion des cytokines Th1. Il semble toutefois que cette cytokine, effectivement produite dans un contexte Th2, ait un rôle immunorégulateur plus général en inhibant les réactions inflammatoires à plusieurs niveaux. L'IL-10 inhibe la différenciation des cellules dendritiques à partir des monocytes circulants [132], la production de cytokines par les mastocytes [133] ainsi que la survie et la fonction des éosinophiles [134]. Chez l'homme, l'IL-10 présente par ailleurs la capacité d'inhiber les réponses de type Th1. Elle bloque en effet la production d'IL2, d'IFN- γ par les lymphocytes Th1 mais aussi d'IL-4 et d'IL-5 à partir de lymphocytes de type Th2 en interférant avec les voies de signalisation CD28-CD80 dépendantes. L'IL-10 est en effet capable d'agir directement sur la transduction intracellulaire du signal généré par le CD28 [135] et de diminuer les signaux de costimulation. Même s'il est effectivement produit par des lymphocytes de type Th2 et possède un rôle inhibiteur pléiotrope, l'IL-10 est impliqué à de nombreux niveaux dans l'antagonisme des réponses inflammatoires. Des modèles d'asthmes murins ont permis de montrer que les Treg induisent une production importante d'IL-10 par les Th2, aboutissant à la neutralisation du modèle physiopathologique [136]. Le rôle d'IL-10 dans la suppression des réponses inflammatoires a été montré au niveau du poumon mais aussi dans d'autres muqueuses. La suppression spécifique de l'IL-10 induit la colite spontanée, le développement de l'inflammation et l'hyperréactivité des voies aériennes chez les souris exposées à l'allergène inhalé [137], [138]. De même Presser et al, ont montré que seule l'inhibition d'IL-10, et pas celle de TGF- β , inhibe l'effet protecteur des Treg sur AHR [139]. A l'inverse, le TGF- β semble avoir un rôle très important dans l'induction et la différenciation de

lymphocytes vers un profil régulateur, alors que son implication dans la suppression spécifique des réponses immunes par les Treg reste quant à elle sujet à débat, en fonction des modèles [140]. Toutefois, plusieurs travaux ont évoqué son rôle dans la suppression *in vitro* [141] mais également *in vivo* dans un modèle d'asthme [82].

Le second mécanisme de suppression implique l'activité cytotoxique des Treg. Cette cytotoxicité serait médiée par la sécrétion de perforine et de granzyme A et B ; et toucherait les cellules T effectrices, les monocytes et les cellules dendritiques. [142], [143], [144]. Enfin, un troisième axe de régulation par les Treg est envisagé via l'interaction avec certaines voies métaboliques des Lc T effecteurs. Il a récemment été montré que certaines sous populations de Treg expriment deux enzymes membranaires, le CD39 et le CD73, qui permettent d'hydrolyser l'ATP et de libérer des quantités très importantes d'adénosine extracellulaire. Ce produit du catabolisme de l'ATP active un récepteur spécifique, le récepteur à l'adénosine 2A, qui permet d'une part d'inhiber les fonctions effectrices des Lc T [145], et d'autre part, maintient une anergie et facilite la génération de Treg adaptatifs en favorisant la production de TGF- β [146] par les cellules cibles.

De nombreuses données suggèrent l'implication des Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dans la résolution de l'asthme allergique [147], [148], avec un rôle apparemment prédominant de l'IL10 par rapport au TGF- β . Au niveau pulmonaire, il a été démontré que les Treg peuvent *in vivo* inhiber des modèles d'asthme murin. La déplétion de Treg naturels par un anticorps anti CD25 augmente les infiltrats éosinophiliques, l'hyperréactivité bronchique et la production d'IgE [149]. Chez le rat, le développement *in vivo* de Treg adaptatifs spécifiques de l'allergène des CD25⁺FoxP3⁺CTLA⁺, après challenge allergénique, a été démontré [150]. Chez les individus allergiques, il existe une augmentation de la fréquence des cellules T sécrétrices d'IL-4 spécifiques de l'allergène et une diminution de la fréquence des Treg sécrétant de l'IL-10 en comparaison d'individus non allergiques [151]. De plus, les profils cytokiniques observés dans une cohorte d'enfants allergiques et non allergiques montrent qu'une augmentation des taux d'IL-4, IL-5, IL-13 est associée avec l'allergie et que l'IL-10 est associée avec un test cutané négatif [152]. Les Treg CD4⁺CD25⁺ pourraient aussi supprimer la réponse allergique vis-à-vis d'allergènes inhalés. Les cellules T CD25⁺ issues de donneurs non allergiques, mais pas de donneurs allergiques, suppriment la prolifération et la sécrétion d'IL-5 par leurs propres cellules T CD4⁺CD25⁻ stimulées par l'allergène [153]. En dehors de la saison pollinique, les cellules T CD25⁺, issues de sujets allergiques ou non, suppriment puissamment la prolifération cellulaire T et la production de cytokines Th2 en réponse à l'allergène. Cependant, lors de la période symptomatique, c'est-à-dire en haute saison

pollinique, des cellules T CD25⁺ issues de donneurs allergiques présentent un défaut d'activité inhibitrice [154], contrairement aux sujets contrôles. Outre la réduction de leur fonction suppressive, les Treg naturels isolés du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques sont moins efficaces dans l'induction de DC tolérogéniques comparativement aux Treg naturels de sujets contrôles. Ce défaut d'induction, lié à l'expression réduite de l'IL-10 par les Treg naturels des sujets allergiques asthmatiques, est corrélé à la sévérité de l'asthme [155]. Un traitement avec des corticostéroïdes inhalés restaure les fonctions suppressives de ces cellules et augmente l'expression de l'IL-10 et l'induction des DC tolérogéniques [155].

Lymphocytes Th22

Une nouvelle population de Lc T a été décrite postérieurement aux Th17, ce sont les Th22. Ces cellules produisent bien évidemment de l'IL-22 mais aussi de l'IL-26 mais pas de l'IL-17. Elles expriment le facteur de transcription AhR et les récepteurs chimiokines CCR6 et CCR10 [156], [157]. Leur récepteur est exprimé au niveau digestif, cutané et pulmonaire, ce qui suggère un rôle dans l'immunité des muqueuses. Elles ont été décrites dans les maladies cutanées notamment la dermatite atopique [158]. Une production dépendante des cellules de Langerhans et une action sur les cellules épithéliales induisent un remodelage [159], [160]. L'IL-22 est augmentée dans les sérums et dans les surnageants de CMN de sujets allergiques asthmatiques [161], [162]. Chez la souris, dans un modèle d'asthme expérimental induit à l'OVA, la neutralisation de l'IL-22 augmente l'éosinophilie pulmonaire. Dans un second modèle, le transfert de DC pulsées à l'OVA à des souris naïves augmente l'éosinophilie, tandis que les DCs préincubées avec l'IL-22 abolissent cette réponse [163]. Ces résultats confèrent un rôle protecteur à cette cytokine. Plus récemment, Besnard et al, ont montré que l'IL-22 jouait un rôle pro-inflammatoire au cours de l'induction de l'asthme allergique puisque les souris déficientes en IL-22 développent une forme atténuée de la maladie. A l'inverse, dans la phase effectrice, l'IL-22 avait un effet protecteur dépendant de l'IL-17A. Ce travail met donc en lumière une double fonction de l'IL-22 dans l'asthme allergique chez la souris [164].

Les lymphocytes B

Les lymphocytes B jouent un rôle important dans les maladies allergiques, y compris l'asthme allergique, pour la synthèse des IgE spécifiques aux allergènes sous l'influence des réponses dérégulées à cellules Th2. Chez la souris, les cytokines de type Th2, l'IL-4 ou l'IL-13, stimulent la commutation isotypique vers l'IgG1 et vers l'IgE. Chez l'homme, l'IL-4, induit

la commutation vers l'IgE et vers un isotype d'IgG (IgG4) qui interagit d'une manière peu efficace avec les récepteurs FcεRI et active faiblement le complément. Le contact avec l'allergène dans la phase de sensibilisation induit la synthèse, par les lymphocytes B, des anticorps IgE spécifiques de l'allergène. Cette phase met de deux à trois semaines pour se développer pleinement. Les anticorps se fixent rapidement à leurs récepteurs de haute affinité FcεRI présents essentiellement sur les mastocytes et les basophiles (DeFranco, 2009).

Comme la synthèse des IgE est dépendante des cytokines libérées par les cellules Th2, elle est régulée par les facteurs qui influencent le développement et les activités de ces dernières. C'est le cas par exemple des cellules Th1, Th17, des lymphocytes NKT, et des T régulateurs. Les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les basophiles participent également à la régulation de la production des IgE par les cellules B.

Les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2)

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) représentent une nouvelle famille d'origine hématopoïétique. Ce sont des cellules effectrices du système immunitaire inné, programmées pour réagir rapidement en réponse aux infections, caractérisées par l'absence de marqueurs de lignée, une morphologie lymphoïde, une dépendance de la chaîne γ c commune, et l'expression du récepteur à l'IL-7 CD127. Elles jouent un rôle dans la formation des tissus lymphoïdes et dans le remodelage post-infectieux ou post-traumatique. Elles jouent aussi un rôle dans la protection de l'organisme contre les pathogènes [165]. Les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), sont un membre de la famille des ILCs, récemment identifié chez l'homme et la souris. Elles sont localisées au niveau des tissus adipeux, de la cavité péritonéale, des ganglions mésentériques, de la rate, de la moelle épinière, du poumon et du foie, mais elles sont très rares dans le sang périphérique [166], [167]. Les ILC2 produisent de grandes quantités de cytokines Th2 (IL-13 et IL-5) en réponse à l'IL-33 et l'IL-25 [168], [169], [170], [171]. Chez l'homme, comme chez la souris, IL-33 semble être un facteur activateur de la prolifération des ILC2 *in vitro*, par contre, son effet *in vivo* n'est pas encore complètement défini. Récemment, il a été montré que les ILC2 sont induites dans des modèles d'asthmes murins où elles constituent, au niveau du poumon, une source majeure d'IL13 conduisant à l'éosinophilie et l'HRB, et ce indépendamment de l'immunité adaptative [172], [173], [174]. Ainsi ces cellules peuvent constituer une nouvelle cible dans le développement des thérapies des maladies des voies aériennes telles que l'asthme.

Cellules épithéliales des voies respiratoires

Si les cellules épithéliales des voies aériennes sont connues pour jouer un rôle important dans l'immunité innée comme barrière physique, elles sont maintenant reconnues comme des cellules fondamentales dans le développement des réponses allergiques. Par leur aptitude à produire des cytokines, elles sont activement impliquées dans le développement des manifestations d'asthme d'une manière directe [175]. Que ce soit lors de la phase de sensibilisation ou au cours d'une exposition subséquente, le passage de l'antigène à travers la barrière épithéliale est crucial pour l'établissement d'une réponse inflammatoire.

Dans des circonstances normales, l'épithélium forme une barrière très stricte presque imperméable et présente une grande capacité de réparation en cas de blessure. Alors que dans l'asthme, l'épithélium bronchique est plus sensible aux dégâts, et les processus de réparation sont également fragilisés [176], [177], [178]. La perméabilité de l'épithélium asthmatique est augmentée, conduisant à un meilleur accès des allergènes inhalés, des polluants, et d'autres irritants pour les cellules basales et les tissus des voies respiratoires sous-jacentes [178]. Cette perte de fonction de barrière peut refléter une anomalie génétique [179].

Les cellules épithéliales expriment des PRR, des récepteurs capables de reconnaître différents types d'agresseurs, et des récepteurs de cytokines produites durant l'inflammation. L'activation de ces récepteurs induit une augmentation de l'expression des protéines immunorégulatrices, comme IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF, IFN- γ , et des chimiokines [180], [181], [182] afin de recruter des cellules inflammatoires. De plus, sous la stimulation des allergènes et/ou des microbes (virus, bactéries, champignons), ou de particules stimulantes, les cellules épithéliales libèrent les cytokines comme TLSP, IL-33, IL-25, qui déclenchent et amplifient les réponses immunitaires caractéristiques [37], [175]. Ces cytokines clés activent et programment les DCs à induire une réponse Th2 en régulant positivement l'OX40 ligand (OX40L) en plus d'interagir directement avec les mastocytes en stimulant la production de cytokines Th2 [35]. Le rôle des cytokines produites par les cellules épithéliales sera présenté en détail dans la partie dédiée aux médiateurs.

Les granulocytes tissulaires

Mastocytes (MC)

Les progéniteurs mastocytaires circulent dans le sang et se domicilient dans les tissus. Sous l'influence de facteurs locaux, et plus particulièrement du Stem Cell Factor (SCF) produit par les cellules stromales, ces progéniteurs se différencient en mastocytes [183]. Elles sont impliquées dans l'asthme par leur capacité à sécréter une large variété de médiateurs

après activation par des allergènes durant la phase effectrice. En fonction de leur contenu en protéases et plus particulièrement en tryptases et chymases, les mastocytes sont divisés en deux sous-types majeurs : les MC_T et les MC_{TC}. Les MC_T ne contiennent que de la tryptase, alors que les MC_{TC} contiennent de la tryptase et de la chymase. Les MC_T prédominent dans les voies respiratoires normales [184].

Lors d'une deuxième exposition à l'allergène, celui-ci est reconnu par des IgE spécifiques, liés aux FcεRI à la surface des mastocytes. Le complexe IgE/allergène induit l'agrégation des récepteurs, activant les mastocytes qui libèrent des médiateurs. Ces derniers sont classés en médiateurs préformés, médiateurs lipidiques nouvellement synthétisés et cytokines. Les médiateurs préformés sont contenus dans des granules sécrétoires et libérés dans l'environnement cellulaire quelques minutes après l'activation. Ces granules contiennent notamment de l'histamine, des protéases neutres (tryptases, carboxypeptidases A et éventuellement les chymases) et des protéoglycanes (héparines et chondroïtine sulfate E). Les principaux médiateurs lipidiques synthétisés après activation des mastocytes sont les prostaglandines (PGs) et les leucotriènes (LTs). Certains métabolites comme PGD₂ et LTC₄ ont de multiples effets. Ils sont impliqués dans le recrutement des cellules, dans la bronchoconstriction et dans la sécrétion de mucus [185], [183]. Les mastocytes activés sont une source importante de cytokines qui maintient la réaction inflammatoire et cause la chronicité de l'asthme. Les mastocytes produisent en grande majorité du TNF-α. Cette cytokine augmente l'expression des molécules d'adhérence endothéliales et épithéliales et l'HRB [186], [183]. Les mastocytes produisent également d'autres cytokines telles l'IL-1β, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, ainsi que des facteurs de croissance (GM-CSF, le SCF) [187], [188]. Ces médiateurs sont de puissants agents bronchoconstricteurs et augmentent la perméabilité microvasculaire [189].

Plusieurs études ont décrit l'implication des mastocytes dans la pathogenèse de l'asthme. Les mastocytes sont associées à l'hyperréactivité bronchique et à une inflammation chronique [190], [191], [192], [193]. Cependant, les mécanismes précis par lesquels les mastocytes régulent le remodelage des parois respiratoires restent à déterminer. Les protéases libérées par les mastocytes, par leur interaction avec les protéines de la matrice et les protéoglycanes, ont été incriminées dans le remodelage de la paroi des voies respiratoires, [194], [195, 196], [197]. D'autres études préconisent que le développement de la phase tardive de l'asthme puisse être dépendante du TNF-α produit par les mastocytes [198, 199].

Les basophiles

Les basophiles représentent une petite population des leucocytes du sang périphérique (<1%). Elles sont très peu présentes dans les tissus. Les basophiles sont morphologiquement et fonctionnellement très semblables aux mastocytes résidants des tissus. Les basophiles circulants expriment divers récepteurs incluant des récepteurs de cytokines (récepteurs pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-33), de chimiokines (notamment CCR2, CCR3), du complément, de facteurs de croissance et des récepteurs aux Fc des Ig [183], [200]. Les basophiles activés libèrent des médiateurs inflammatoires dont les principaux sont l'histamine, le LTC₄, l'IL-4 et l'IL-13 [201]. Il est admis que les médiateurs libérés par ces cellules peuvent avoir des conséquences importantes voire dramatiques pour les patients puisque une libération accrue d'histamine pourrait induire un choc anaphylactique [202]. Les basophiles jouent un rôle critique, pendant la phase effectrice et dans l'exacerbation des réponses Th2, par leur capacité à produire un grand nombre de cytokines pro Th2 (IL-4, IL-13, TSLP, IL-25) [201], [203], [204]. En outre, les basophiles ont une expression élevée des récepteurs de l'IL-33 T1/ST2 et produisent de l'IL-4, de l'IL-6, de l'IL-13 et de l'histamine en réponse à cette cytokine [205], [206]. Des études récentes ont démontré que les basophiles peuvent, en l'absence de DC, présenter les antigènes aux cellules T CD4 naïves *in vitro* et *in vivo*. Ces cellules jouent le rôle de cellules présentatrices de l'antigène pendant l'initiation de la réponse Th2 contre un allergène à activité protéasique, un parasite (helminthe) ou un antigène [207], [208-210]. Par contre Hammad et al, ont montré que les basophiles ne sont pas capables de capturer l'antigène inhalé (HDM) ni de le présenter au LcT. De ce fait elles ne sont pas nécessaires pour la phase aiguë de l'inflammation allergique au niveau du poumon induite par HDM. Dans ce modèle d'asthme, seules les DCs sont nécessaires et suffisantes pour l'initiation de la réponse Th2, tandis que les basophiles participeraient à l'amplification de la réponse Th2 [211]. Il reste à déterminer si les basophiles sont impliqués dans l'inflammation allergique chronique du poumon.

Les éosinophiles

L'inflammation qui se produit dans l'asthme est souvent décrite comme éosinophilique. Les éosinophiles sont présents non seulement dans la paroi des voies respiratoires, mais aussi dans les expectorations et le liquide de lavage bronchoalvéolaire dans l'asthme mal contrôlé [212]. Ces cellules sont recrutées à partir de la moelle osseuse en tant que précurseurs sous les effets de facteurs incluant PGD₂, leucotriènes (LT), cytokines et chimiokines (IL-3, IL-5, GM-CSF, éotaxine 1, 2 et 3, RANTES) [212, 213]. Plusieurs cytokines régulent

l'éosinophilie. Dans une première étape, la stimulation de la production et la mobilisation des éosinophiles de la moelle osseuse est principalement contrôlée par l'IL-5, des chimiokines telles que RANTES/CCL5 et l'éotaxine, tandis que l'IL-4 et l'IL-13 interviendraient pour favoriser la transmigration des éosinophiles à partir du réseau vasculaire vers les compartiments tissulaires en augmentant l'expression des molécules d'adhésion de l'endothélium [214]. Le leucotriène B₄, les leucotriènes cystéinyl (LTC₄, LTD₄ et LTE₄) et la prostaglandine (PG) D₂ interviennent également dans l'accumulation et la migration des éosinophiles [215]. Une fois présents dans les tissus, les éosinophiles contribuent à la manifestation des symptômes par le relargage de leurs granules contenant différents médiateurs proinflammatoires comme la MBP (major basic protein) [216], l'ECP (eosinophil cationic protein) [217], l'EDN (eosinophil-derived neurotoxin) [218] et l'EPO (eosinophil peroxydase). Ces molécules jouent un rôle dans les changements au niveau de la surface de l'épithélium. La MBP provoque une dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine et de leucotriènes qui, à leur tour, vont causer une bronchoconstriction [219]. Les éosinophiles libèrent des superoxydes qui potentiellement induisent des lésions tissulaires et également des cytokines et des chimiokines [220]. Il a été récemment démontré que l'EDN des éosinophiles modulait les DCs pour amplifier la réponse Th₂ en stimulant le TLR2 [221]. Par la capacité à générer des TGF- β et induire la prolifération des fibroblastes, la synthèse du collagène, et la maturation des myofibroblastes, ils contribuent également au remodelage tissulaire bronchique [222]. Les éosinophiles ont également la capacité de générer des médiateurs eicosanoïdes tels que la prostacycline (PGI₂) et les leucotriènes. En outre, les éosinophiles synthétisent et libèrent des cytokines tels que l'IL-3, IL-5, GM-CSF et des chimiokines (RANTES, IL-8, MIP-1 α) qui jouent un rôle dans la phase retardée. Le rôle effecteur des éosinophiles a été montré dans différents modèles expérimentaux d'asthme [223, 224]. Des études utilisant des souris déficientes en éosinophiles ont montré une corrélation entre l'absence d'éosinophiles et la réduction de la réponse Th₂ au niveau du poumon [225-227]. Jacobsen et al, ont associé ces observations à l'absence de l'accumulation des DCs au niveau des ganglions des souris déficientes traitées à l'OVA. Ce qui suggère que les éosinophiles circulants sont nécessaires pour la migration des DCs pulmonaires vers les ganglions [227].

Les neutrophiles

Chez l'homme, les neutrophiles semblent impliqués dans la réaction allergique, et plus particulièrement dans l'asthme sévère. En effet, le nombre de neutrophiles est augmenté dans les LBA et les biopsies bronchiques des patients asthmatiques [228, 229]. Les neutrophiles

activés pourraient produire des médiateurs moléculaires impliqués dans la réaction pulmonaire allergique tels les lipides (LTA₄, LTB₄, PAF...) les cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β , CXCL8), les protéases (élastase, collagénase...) et les dérivés oxygénés. L'ensemble de ces produits participerait à l'amplification de la réaction locale et pourrait causer le rétrécissement des voies aériennes et la sécrétion de mucus [230]. Récemment, Jönsson et al, ont démontré que l'activation des neutrophiles par les IgG, est à la fois nécessaire et suffisante pour induire une anaphylaxie. L'administration de neutrophiles provenant de souris normales, ou même de neutrophiles humains, restaure en effet l'anaphylaxie, chez des souris résistantes au choc, et la destruction des neutrophiles prévient la réaction anaphylactique et la mort associée au choc. Ils ont également montré que le principal médiateur responsable du choc anaphylactique est le PAF [231]. Ces résultats révèlent un rôle des neutrophiles dans l'anaphylaxie chez la souris.

Les principaux médiateurs de la réaction allergique

De nombreux médiateurs sont impliqués dans la physiopathologie de l'asthme. Ils sont sécrétés généralement par différentes populations cellulaires. Inversement chaque population cellulaire sécrète plusieurs médiateurs. Ces molécules ont des effets multiples et souvent redondants sur les voies aériennes et sur les cellules présentes localement pour induire des modifications pathologiques caractéristiques de la maladie: oedème, hypersécrétion de mucus, recrutement des cellules immunitaires, lésions tissulaires, hyperréactivité bronchique. La multiplicité des acteurs rend très difficile l'établissement du rôle de chacun de ces médiateurs dans la physiopathologie de l'asthme.

Les IgE

Les IgE sont un isotype d'immunoglobulines (Ig). D'un point de vue structural, similairement aux différentes classes d'Ig, les IgE sont composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes lourdes contiennent quatre domaines constants (C ϵ 1-C ϵ 4) et un domaine variable et les chaînes légères un domaine constant et un domaine variable. Elles sont produites par les lymphocytes B activés, présents dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses, lors de la commutation isotypique. Cette dernière consiste en un changement de classe des domaines constants des chaînes lourdes sans affecter le domaine variable et donc la spécificité vis-à-vis de l'antigène [232].

L'IgE est reconnue par les récepteurs Fc ϵ RI (récepteur de haute affinité) et Fc ϵ R2 (CD23) (récepteur de faible affinité). Le récepteur Fc ϵ RI se compose de trois sous-unités (α , β

et γ): la sous-unité α est responsable de la liaison avec les IgE, la sous-unité β augmente la stabilité du récepteur et potentialise la signalisation intracellulaire et finalement la sous-unité γ , qui est commune aux autres récepteurs Fc, est responsable de la transduction du signal intracellulaire. Il existe deux formes de récepteurs Fc ϵ RI : la forme tétramérique ($\alpha\beta\gamma_2$) et la forme trimérique ($\alpha\gamma_2$). La forme tétramérique est la forme classique de ce récepteur et se retrouve à la surface des basophiles et des mastocytes. La forme trimérique est présente en particulier chez les monocytes, les éosinophiles, les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques [233], [232], [234]. La liaison de l'IgE au récepteur Fc ϵ RI est une condition nécessaire au déclenchement de la phase d'hypersensibilité immédiate dont sont responsables les mastocytes et basophiles. L'expression du récepteur Fc ϵ RI est modulable, elle est augmentée par la présence d'IgE qui stabilise le récepteur à la surface. Elle l'est aussi par l'IL-4 qui promeut sa synthèse. Les mastocytes et basophiles ont une densité de récepteurs accrue quand la production d'IgE est augmentée. En sécrétant de l'IgE, le lymphocyte B déclenche de nouveaux types de mécanismes de présentation antigénique. En effet, la liaison de l'IgE au récepteur Fc ϵ RI porté par la cellule dendritique augmente leur potentiel de capture antigénique et leur production en cytokines et chimiokines qui favorisent la réponse Th2 [235], [35], [236]. Par ailleurs, Il a été mis en évidence que le Fc ϵ RI induit l'expression de l'enzyme IDO [237], dont les propriétés immunorégulatrices ont déjà été évoquées. Il semble que le Fc ϵ RI joue, à la surface des DCs, un rôle complexe mêlant à la fois des voies pro et anti-inflammatoires.

Contrairement aux autres récepteurs des immunoglobulines, Le Fc ϵ RII (CD23) n'appartient pas génétiquement à la superfamille des immunoglobulines mais à celle de la superfamille des lectines. Il est exprimé sous deux isoformes: le CD23a et le CD23b. Le CD23a est exprimé par les cellules B activées par l'antigène avant leur différenciation en plasmocytes, alors que l'expression de CD23b est induite par l'IL-4 sur une variété de cellules incluant les macrophages, les monocytes, les éosinophiles, les cellules de Langerhans, les lymphocytes T, les cellules B et les cellules épithéliales. Le CD23 peut faciliter la présentation antigénique indépendante au CMH, de manière analogue au Fc ϵ RI à la surface des DCs. De plus, un mécanisme de présentation antigénique facilitée « facilitated antigen presentation » a été mis en évidence au niveau des lymphocytes B activés, lesquels expriment CD23 [238]. Ce processus est basé sur la capture des complexes IgE-antigène par CD23, ce qui conduit à la présentation de l'antigène aux lymphocytes Th2.

Les Cytokines et chimiokines

Nous traiterons ici seulement les cytokines impliquées dans la réaction allergique, alors que les chimiokines seront décrites dans le chapitre II. Les principales cytokines appartenant à la réponse Th2 et leurs effets seront exposés dans les paragraphes suivants:

L'IL-4 est impliqué dans la polarisation de la réponse humorale. Elle permet avec l'IL-13 l'activation de la commutation de classe, et stimule donc la synthèse des IgG1 et IgE, alors qu'il inhibe la synthèse des IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgM. Cette interleukine permet d'augmenter l'expression du CMH de classe II par les Lc B, ce qui favorise la présentation antigénique en présence de faibles doses antigéniques. L'IL-4 agit également comme un signal activateur proinflammatoire sur les granulocytes, et active par exemple les mastocytes cutanés, favorisant leur sécrétion d'IL-5 [239]. Certains travaux suggèrent enfin que l'IL-4 ait une action profibrotique, car elle active la production de collagène sur des fibroblastes hépatiques [240] et dans certaines formes de fibroses pulmonaires [241]. Le récepteur de l'IL-4 active par phosphorylation les protéines adaptatrices STAT6 [242], ce qui induit l'expression du facteur de transcription GATA-3 au sein des Lc T. Ce facteur a un rôle essentiel dans la polarisation des T CD4⁺ vers un profil Th2 en contrôlant les gènes de certaines cytokines [243]. Chez l'homme GATA-3 permet ainsi de réprimer la transcription du gène de l'IFN- γ , alors qu'il active au contraire celui de l'IL-4 [244]. L'expression de GATA-3 n'est toutefois pas limitée aux T CD4⁺, on la retrouve également dans les cellules NKT [245], les NK [246] et certains épithélia [247]. Des polymorphismes génétiques affectant le promoteur du gène de l'IL-4 et de son récepteur ont été décrits depuis de nombreuses années. Dans certains cas ce polymorphisme amplifie la transduction du signal en aval du récepteur, avec une augmentation en intensité et en durée de la stimulation produite par l'IL-4. Une telle particularité génétique favorise donc clairement les réponses Th2 et prédispose aux allergies (individus atopiques).

IL-13, mis à part son rôle essentiel dans la commutation de classe des immunoglobulines, agit sur les macrophages tissulaires en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires de type IL-12, IL-8 et IL-6, mais inhibe également l'IL-10. Ce mécanisme permet de bloquer le développement d'une réponse de type Th1 antagoniste et amplifie la réponse Th2. IL-13 agit également au site inflammatoire sur les cellules tissulaires, par exemple sur l'épithélium bronchique, en favorisant la sécrétion de mucus par les cellules calciformes et en potentialisant l'hyperréactivité bronchique par une action sur les cellules

musculaires lisses péribronchiques [248]. Chez la souris, des études ont établi que l'IL-13 est nécessaire et suffisant pour induire l'HRB [249].

L'IL-3 est un facteur de croissance impliqué dans le développement de nombreux précurseurs hématopoïétiques. Toutefois, il provoque spécifiquement la prolifération des mastocytes et favorise leur synthèse d'histamine.

L'IL-5 permet de stimuler l'éosinophilopoïèse et générer un stock d'éosinophiles qui seront ensuite recrutés au site inflammatoire. Cette interleukine est également un facteur de croissance mastocytaire qui favorise chez la souris la prolifération des lymphocytes B pré-activés. Les souris IL-5 KO [250] ont montré le rôle critique de la génération des éosinophiles par cette cytokine et son impact sur le développement de modèles pathologiques allergiques. L'IL-5 semble également impliqué dans l'accumulation des éosinophiles vers le site inflammatoire après stimulation allergénique [251]. Elle facilite ce recrutement en modulant l'expression de protéines d'adhésion et de récepteurs chimiokines à la surface des éosinophiles [252].

L'IL-9 est induite par des pneumallergènes sur les cellules mononuclées [253] et les éosinophiles [254] de patients allergiques, ce qui explique les taux élevés de cette cytokine dans les LBA après challenge allergénique [255]. Des souris transgéniques surexprimant l'IL-9 développent également une fibrose pulmonaire sous-épithéliale caractéristique du remodelage asthmatique, aboutissant à l'altération de la fonction respiratoire [256], et ce indépendamment d'un recrutement éosinophilique. Par ailleurs, l'utilisation de modèles d'asthme expérimental chez la souris montrent que l'IL-9 favorise la prolifération des précurseurs éosinophiliques au niveau de la moelle osseuse, même si la neutralisation de cette interleukine à l'aide d'un anticorps n'inhibe pas le développement de l'inflammation éosinophilique [257]. Récemment, deux équipes ont mis en évidence que l'association du TGF- β à l'IL-4 induit la différenciation d'une population effectrice distincte caractérisée par une production importante d'IL-9 et par conséquent nommée Th9 [258], [259]. Ces cellules sont impliquées dans différents processus immunitaires, en particulier l'asthme.

TSLP est une cytokine caractérisée récemment avec une forte capacité de modulation des réponses immunitaires. Elle est exprimée dans divers types cellulaires incluant les cellules épithéliales bronchiques, les fibroblastes pulmonaires et les cellules musculaires lisses

bronchiques. Les DCs et les mastocytes produisent également le TSLP sous certaines conditions inflammatoires [260, 261]. Chez l'homme, des niveaux élevés de TSLP ont été trouvés dans les cellules épithéliales des voies aériennes des patients asthmatiques [262, 263], [37]. De plus, l'expression de cette cytokine au niveau des voies aériennes est corrélée avec l'expression des cytokines Th2 et la sévérité de l'asthme [264]. Bien que le rôle de TSLP dans l'asthme ne soit pas entièrement défini, il a été montré que TSLP active et programme les DCs à induire une réponse Th2. En effet, les cellules dendritiques activées par la TSLP vont maturer et sécréter des chimiokines telles que TARC, MDC qui vont attirer les lymphocytes Th2 ainsi que l'eotaxine-2 qui va attirer à son tour les éosinophiles [265, 266]. Il a été démontré que TSLP pouvait induire la différenciation Th2 à partir des T CD4⁺ naïfs directement, en l'absence des DCs conduisant à la production d'IL-4 [267]. En plus de ses effets sur les DCs et sur les cellules T CD4⁺ naïves, la TSLP pourrait également activer les mastocytes pour produire des cytokines effectrices des réponses Th2 [268], [212], [269]. De plus, des souris déficientes pour le récepteur de TSLP ont un asthme allergique atténué. Tandis que, l'expression d'un transgène exprimant TSLP dans les poumons induit un asthme allergique, avec une inflammation des voies aériennes, une hyperréactivité bronchique, caractérisé par la présence de cytokines de type Th2 et des IgE [264, 270]. Zhang et al, ont démontré que le blocage de TSLP, à l'aide d'un récepteur soluble TSLPR, réduit l'expression des molécules de costimulation au niveau des DCs activées par le TSLP *in vitro* et l'administration par voie intratrachéale de ce récepteur TSLPR avant la sensibilisation, réduit l'éosinophilie, les IgE et la production de cytokines Th2 *in vivo* [271]. Plus récemment, la TSLP a été impliquée dans la rupture de la tolérance allergénique. Il semble que de faibles doses de TSLP soient capables d'empêcher l'induction des Treg [272] sans favoriser en parallèle la réponse Th2.

GM-CSF est une autre cytokine importante qui est produite par les cellules épithéliales des voies respiratoires suite à l'exposition aux allergènes protéolytiques ou d'autres sensibilisants connus pour leur capacité d'induire des réponses Th2 [273]. GM-CSF stimule la prolifération et la différenciation des précurseurs des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes. Il active également fonctionnellement des formes matures correspondantes et peut induire la libération de métabolites de l'acide arachidonique et la production accrue de produits intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) [212]. L'importance de GM-CSF dans les réponses Th2 a été décrite chez la souris. Stampfli et al, ont montré que la surexpression de GM-CSF, au niveau des poumons, inhibe la tolérance à l'antigène inhalé et oriente la réponse

T vers un profil Th2 [274]. D'autres auteurs, ont montré que la neutralisation de GM-CSF réduit la réponse Th2 dans un modèle d'asthme induit par HDM [275, 276].

IL-25 (IL-17E) est produite par des cellules épithéliales ainsi que d'autres cellules innées, comme les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes Th2 [277, 278]. L'expression d'IL-25 et de son récepteur IL-25R sont augmentées dans les biopsies des patients asthmatiques [279, 280]. Chez la souris, la surexpression d'IL-25 dans les cellules épithéliales de poumon induit une réaction inflammatoire allergique [277], alors que, la neutralisation de l'IL-25 réduit l'inflammation des voies aériennes et le remodelage bronchique [277, 281].

L'IL-33 est un membre de la famille d'IL-1. Elle est synthétisée par les cellules épithéliales, par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les adipocytes. [282, 283]. Son récepteur (ST2) est exprimé principalement sur les mastocytes matures, les basophiles, les cellules Th2, les cellules NK, les NKT et sur les cellules lymphoïdes innées de type 2 chez la souris et chez l'homme [284], [206], [285], [286]. L'IL33 augmente l'expression des marqueurs de maturation, tels que CD40, CD80 et OX40L au niveau des DCs qui deviennent très efficace à induire les réponses Th2 [68], [69]. Chez la souris, l'administration d'IL-33 induit une AHR, une hyperplasie des cellules caliciformes et la production de cytokines Th2 dans les poumons [206]. A l'inverse, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-IL-33 avant la sensibilisation et avant chaque provocation à l'OVA diminue fortement l'inflammation pulmonaire allergique [287]. Chez l'homme, l'expression d'IL-33 est augmentée au niveau des cellules épithéliales des patients asthmatiques comparativement aux sujets sains. Cette expression est plus importante dans les asthmes sévères [288]. Des polymorphismes génétiques affectant IL-33 et ST2 sont associés à l'asthme [289].

Histamine

L'histamine est sécrétée essentiellement par les basophiles et les mastocytes. Elle agit sur différents types de cellules par l'intermédiaire de quatre récepteurs distincts (HR) [290]. Selon le niveau d'expression des récepteurs et le type cellulaire, l'histamine peut avoir des effets pro ou anti-inflammatoires. Bryce, et al, ont démontré l'implication du récepteur H1 dans la régulation de la réponse allergique au niveau du poumon. En effet, les souris déficientes en H1R ne développent pas de l'asthme et présentent particulièrement, un défaut

de migration des cellules T vers le poumon [291]. En outre, le récepteur H4 semble également jouer un rôle important dans les maladies allergiques [292], [293].

L'histamine a une propriété bronchoconstrictrice puissante par son action directe sur les récepteurs H1 exprimés sur les cellules musculaires lisses. Elle entraîne aussi une extravasation vasculaire également dépendante des récepteurs H1, et par conséquent, un oedème muqueux qui participe à l'obstruction bronchique. Elle induit également la contraction des muscles lisses et la sécrétion de mucus [294], [293].

Médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques sont des composés formés à partir des phospholipides membranaires. Ceux issus du métabolisme de l'acide arachidonique, un des acides gras retrouvés abondamment dans les phospholipides, sont nommés éicosanoïdes. Les principaux éicosanoïdes générés sont le leucotriène (LT)B₄, la prostaglandine (PG)E₂ et le thromboxane (TX)A₂ [295, 296]. Ils sont synthétisés par de nombreux types cellulaires. Ces médiateurs jouent un rôle important dans la pathophysiologie de nombreuses pathologies dont l'asthme sévère. Les principales fonctions biologiques de ces médiateurs ont été décrites avec les cellules qui les produisent.

Chapitre II : Les chimiokines

Généralités

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire (entre 8 et 14 kDa). Elles sont impliquées dans le trafic, d'où leur nom (CHEMOtactic cytoKINES), et l'activation cellulaire, aussi bien en condition physiologique que pathologique (inflammation, organogénèse, angiogénèse, diffusion métastatique, polarisation de la réponse immune...). Les chimiokines agissent via leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G (GPCR). Elles sont produites et majoritairement secrétées (exceptées CX3CL1 et CXCL16), sous forme de pro-peptides, de façon constitutive, mais aussi par diverses voies d'induction, ainsi ces molécules prennent part aux mécanismes homéostatiques et également en réponse à une inflammation. Actuellement, les chimiokines comportent près de 50 membres chez les mammifères. Elles sont contrôlées par de subtils systèmes de régulation malgré la complexité due à la pléiotropie et à la redondance généralement circonscrite à la même famille, puisque une chimiokine peut activer plusieurs récepteurs différents et un récepteur peut lier différentes chimiokines et pour en ajouter à cette complexité un type cellulaire peut exprimer plusieurs récepteurs à la fois (Figure 10).

Structure et classification

En dépit d'une faible homologie de séquence, les chimiokines présentent une structure tridimensionnelle hautement conservée, assurée par le pontage entre une ou deux paires de résidus de cystéine localisés dans la région N-terminal (Figure 9). Sur cette base, est née, en l'an 2000, la nouvelle classification des chimiokines [297]. Les 50 membres de cette famille, ont été classés en quatre groupes. Ainsi, on trouve les CXC (α), les CC (β), les C (γ) et les CX3C (δ) chimiokines (Figure 11).

Les CXC chimiokines ou CXC ligands (CXCL)

Ce groupe comporte 16 membres répartis dans deux sous-groupes selon la présence ou non d'un motif ELR (Glutamine-Leucine-Arginine) adjacent aux CXC définitoires. La majorité des gènes CXCL se retrouve dans un cluster sur le chromosome 4, à l'exception de CXCL12, CXCL14 et CXCL16 codés par le chromosome 10.

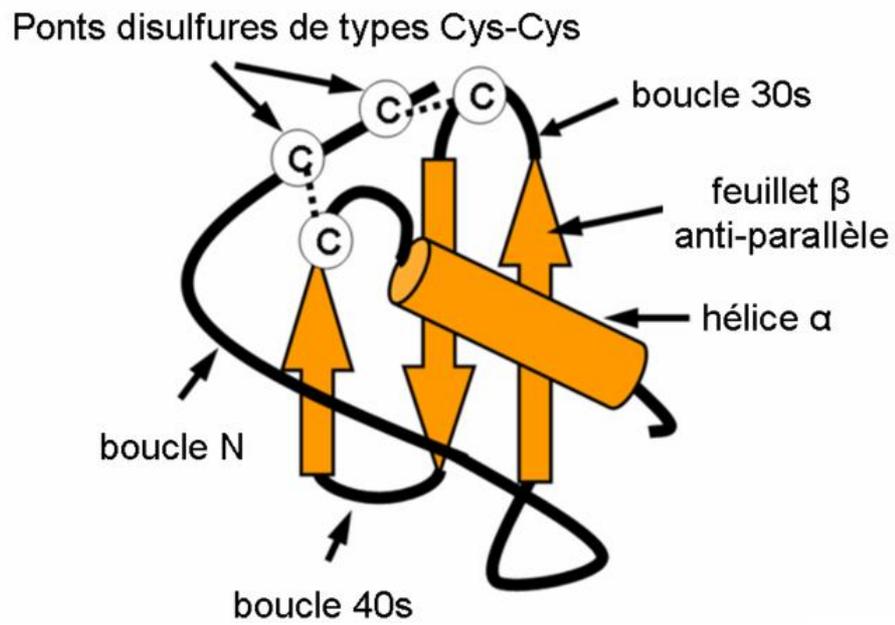


Figure 9 : Structure tridimensionnelle des chimiokines [298].

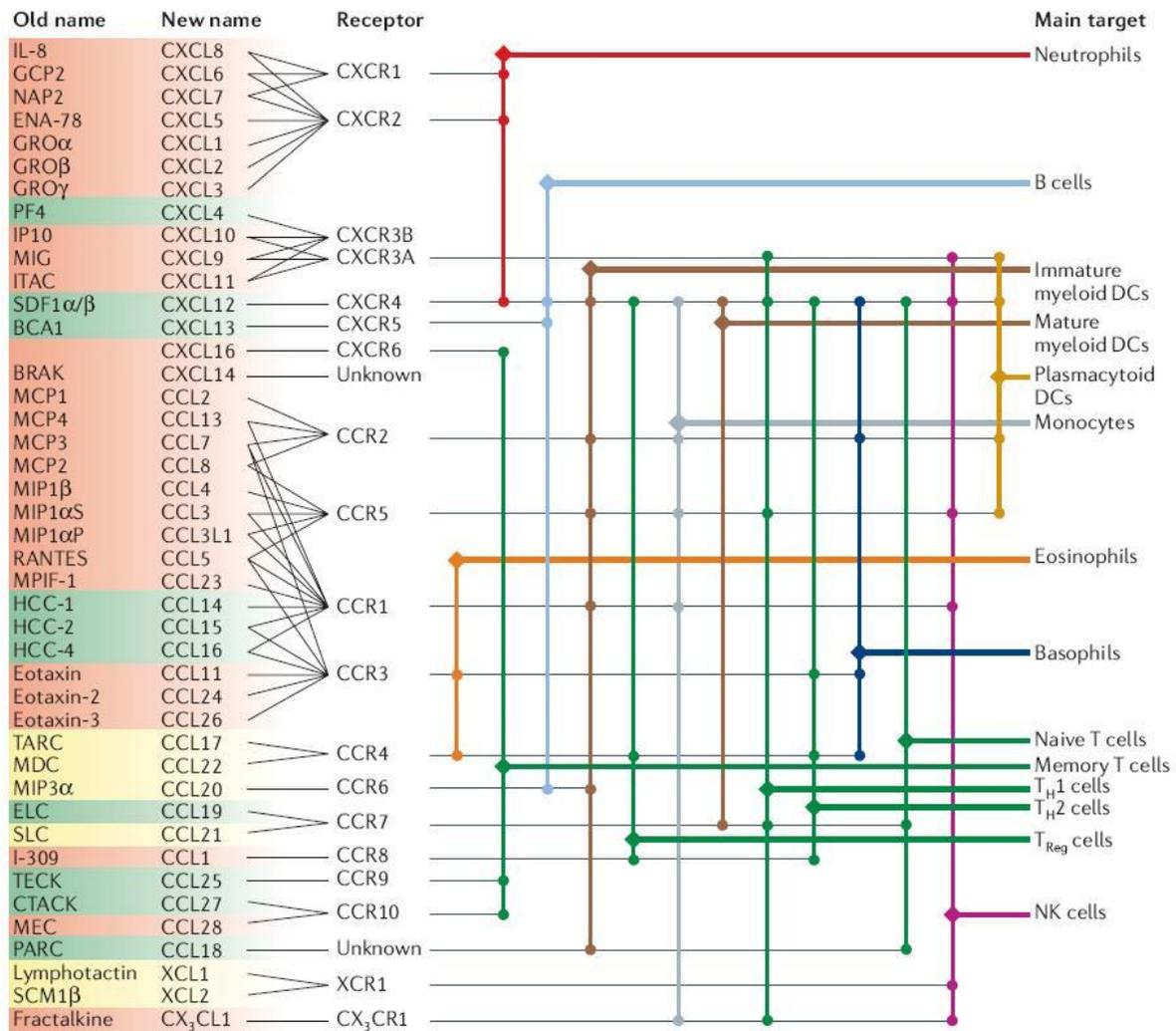


Figure 10 : Chimiokines et récepteurs associés. Le diagramme présente la propriété de redondance fonctionnelle de certaines chimiokines, capables d'activer plusieurs récepteurs. Par ailleurs, l'expression de ces récepteurs à la surface de différents types leucocytaires est précisée [299].

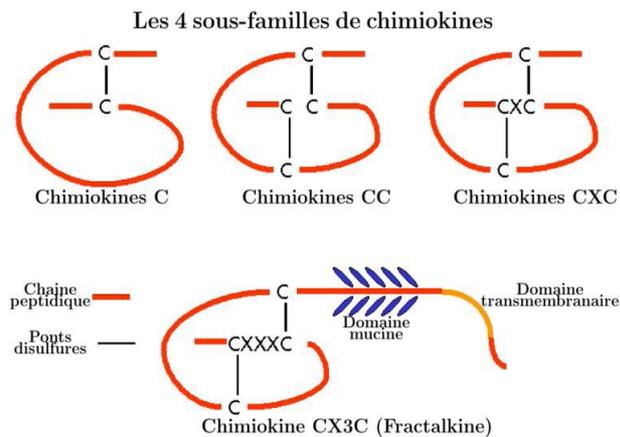


Figure 11 : Les quatre sous familles de chimiokines classées selon leur structure [300].

Les CXC chimiokines ELR+

Les chimiokines contenant le motif ELR sont au nombre de 8 : CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL15. Ces chimiokines attirent préférentiellement les polynucléaires neutrophiles. Elles sont produites par différentes cellules en réponse à des stimuli cytokiniques pro-inflammatoires (l'IL-1 et le TNF- α). Le rôle de ces chimiokines est de promouvoir l'adhésion des neutrophiles aux cellules épithéliales et la migration à travers l'endothélium. Ces chimiokines ont aussi un rôle angiogénique puisqu'elles sont chimioattractantes pour les cellules endothéliales [301].

Les CXC chimiokines ELR-

Ce sous-groupe est composé de CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16. Ces chimiokines attirent préférentiellement les Lc et les monocytes avec une faible action sur les neutrophiles [302], [303] et contrairement aux ELR-, elles ont des propriétés anti-angiogéniques [304].

Les CC chimiokines ou CC

Ce groupe comporte 28 membres. Le locus de la plupart de ces CC-chimiokines se situe sur le chromosome 17, à l'exception de CCL19 qui se trouve sur le chromosome 9 et des CCL24 et CCL26 qui sont sur le chromosome 7. Les premières cibles de ces chimiokines sont les cellules mononuclées. Ces chimiokines sont impliquées à la fois dans les processus d'homéostasie et d'inflammation. Les CC-chimiokines pro-inflammatoires, impliquées dans l'allergie, sont généralement inductibles, et celles engagées dans l'homéostasie sont exprimées constitutivement. Les CC chimiokines impliquées dans l'allergie comptent les CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL17, CCL22, CCL24 et CCL26 [305, 306], [307]. Les CC chimiokines impliquées dans l'homéostasie sont le CCL19, CCL20 et CCL21. Ces trois chimiokines dirigent les lymphocytes T et les cellules dendritiques vers les sites spécifiques au travers du tissu lymphoïde [308]. Les CC chimiokines impliquées dans le développement sont CCL17 et CCL25 [309], [310].

Les C chimiokines ou CL

Cette famille comprend 2 membres, XCL1 et XCL2. XCL1 est capable d'induire la chimiotaxie de Lc CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que des cellules NK [311]. Elle ne présente pas de propriétés chimiotactiques vis-à-vis des monocytes ou des neutrophiles [312]. En plus de sa fonction chimiotactique sur ces populations, XCL1 peut induire un effet suppressif et

cytotoxique contre des tumeurs ou des cellules T effectrices [313]. XCL1 et son récepteur XCR1 sont faiblement exprimés dans les Lc Treg de patients asthmatiques allergiques. Cette sous expression est corrélée avec une diminution de fonction régulatrice des Treg, leur fonction régulatrice peut être rétablie par administration de XCL1 [314].

Les CX3C chimiokines ou CX3CL

Le seul membre de cette famille est CX3CL1. On connaît néanmoins deux formes distinctes de cette chimiokine : une forme membranaire et une forme soluble. La forme soluble a une activité chimiotactique vis-à-vis des Lc T et des monocytes. La forme membranaire, exprimée sur les cellules endothéliales activées et les cellules épithéliales bronchiques, favorisent l'adhésion ferme de ces leucocytes [315]. Plusieurs études ont montré l'implication de cette chimiokine dans l'asthme. Chez les patients allergiques, CX3CL1 est fortement présente dans le sang et le LBA. De plus, une forte expression membranaire de cette chimiokine est observée au niveau des cellules endothéliales et épithéliales bronchiques [316]. Ce qui pourrait contribuer au recrutement rapide des lymphocytes T vers les voies aériennes. Chez la souris, l'absence de son récepteur CX3CR1 ou son blocage réduit les paramètres de la réaction allergique pulmonaire. Le transfert de cellule CD4 de souris sauvages dans les souris déficientes en CX3CR1 restaure les paramètres de l'asthme, et l'administration d'un anti-CX3CR1-bloquant empêche l'inflammation chez les CX3CR1 déficientes reconstituées avec des cellules Th2 de souris sauvages [317].

La séquence consensus BBXB

Les chimiokines possèdent une séquence particulière avec un enchainement de résidus à caractère basique, de type XBBXB, ou encore XBBBXXBX où B est un acide aminé basique (l'arginine, l'histidine ou la lysine). Cette particularité structurelle revêt une grande importance dans les fonctions biologiques de ces protéines. Ce cluster est notamment impliqué dans la liaison aux glycosaminoglycanes (GAG). Plusieurs paramètres primordiaux définissent la capacité de ces séquences à fixer les GAG, notamment le nombre de séquences BBXB, leur position dans la structure tertiaire de la chimiokine, la topographie des acides aminés basiques, qui peuvent notamment jouer sur la spécificité de liaison à certains GAG [318]. Ainsi, la mutation en alanine des résidus basiques de la séquence BBXB (44RKNR47) dans CCL5 entraîne une réduction de sa capacité à fixer l'héparine, et modifie sa sélectivité vis-à-vis de différents GAG [319]. En outre, cette séquence est impliquée dans la fixation de

CCL5 à l'un de ses récepteurs, le CCR1, mais ne semble pas impliquée dans la fixation au CCR5.

Régulation des chimiokines

Après biosynthèse et sécrétion, les chimiokines peuvent être soumises à l'action protéasique de différentes enzymes présentes au niveau des tissus ou par les cellules médiant l'inflammation (par exemple les protéases du neutrophile, ou encore le CD26 présentant une activité peptidasique). Le clivage des chimiokines peut augmenter ou baisser leur activité. Par exemple, CCL5 clivé par le CD26 devient inactif sur le CCR1 et CCR3 mais présente une activité augmentée sur le CCR5 [320]. Tandis que, le clivage de certaines chimiokines par les protéases engendre la perte de l'activité biologique de la chimiokine cible [321, 322]. Les glycosaminoglycanes (GAG) participent à la régulation des chimiokines en les protégeant de la dégradation et en augmentant le gradient local, les GAG peuvent même changer la conformation des chimiokines et ainsi modifier leur activité *in vitro* [323]. Il existe de nombreux stimuli capables de moduler la production de chimiokines. En effet, en tant que médiateurs de l'immunité innée et acquise, les chimiokines sont produites en réponse à l'intrusion de pathogènes. Ainsi, des cellules mononucléées du sang périphérique stimulées par du LPS ou par la concanavaleine A (lectine extraite de *Canavalia ensiformis*) accroissent leur sécrétion de CXCL8. De même, la production de CCL18 est fortement induite chez les PBMC par l'exposition aux enterotoxines staphylococcales A et B [324].

Certaines cytokines peuvent moduler la production de chimiokines. Ainsi l'IL-1 β et le TNF- α sont des inducteurs de l'expression de nombreuses chimiokines, notamment CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL20, et CXCL [325]. De plus, l'IFN- γ potentialise fortement la production de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [326], mais aussi celle de CCL5 [327] par les cellules épithéliales avec le TNF- α et à l'inverse, inhibe la production de CXCL8 et CCL22. Les mécanismes moléculaires des effets synergiques entre l'IFN- γ et le TNF- α ne sont pas complètement élucidés. Par ailleurs, les cytokines Th2, comme l'IL-4 et l'IL-13, induisent la production de CXCL8, CCL7, CCL11, CCL13, et CCL20 par les cellules épithéliales bronchiques [328], [329]. L'IL-4 augmente l'expression de CCL11 par les fibroblastes de la muqueuse nasale [330] et pulmonaires [331]. Il ressort de ces études que la production de chimiokines est étroitement régulée au cours de la réaction allergique par les cytokines.

D'autres facteurs interviennent dans la régulation des chimiokines, ce sont les glucocorticoïdes (GC). En effet, le traitement des pathologies pulmonaires chroniques par des GC conduit à une forte inhibition de l'infiltrat cellulaire au sein du tissu pulmonaire. Le

mécanisme clé de ce mode d'action consiste en la suppression de l'activation de gènes proinflammatoires. De nombreuses chimiokines possèdent des éléments de réponses aux GC (GRE) au niveau de leur promoteur. Ainsi, GC sont capables d'inhiber la production de CCL2, CCL5, CXCL8 [332], CCL3 [333], CCL11 et CCL13 [334]. *In vitro*, le budésonide inhibe la production de CCL11 en accélérant la dégradation des ARNm [335]. De plus, *in vivo* dans un modèle de souris sensibilisé à l'OVA, le traitement avec la dexaméthasone abolit la production de CCL11 [336]. Cependant, les GC sont capables de potentialiser l'effet d'autres stimuli tel que les cytokines [337].

Récepteurs de chimiokines

Comme nous venons de le voir les chimiokines sont pléiotropes, et s'organisent en un réseau redondant de complexes ligands/récepteurs. A l'instar des chimiokines, il existe quatre sous-groupes de récepteurs divisés en CCR, CXCR, XCR et CX3CR par analogie avec leur ligand. Les récepteurs chimiokiniques appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et notamment à la sous classe A [338]. On compte actuellement 20 récepteurs.

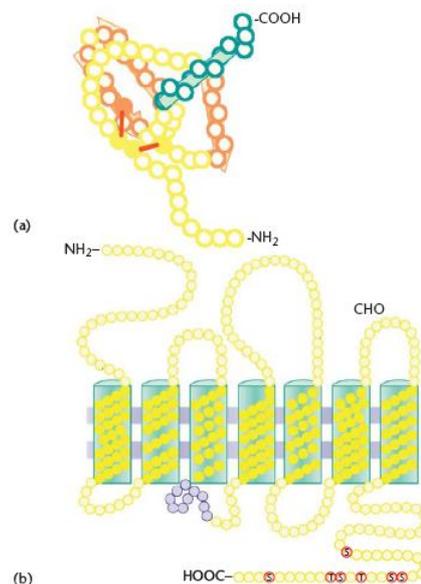


Figure 12 : Structure des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et interaction chimiokine–récepteur. Les récepteurs des chimiokines sont constitués de sept domaines riches en résidus hydrophobes sous forme d'hélice α transmembranaire (TM1-TM7), reliées entre elles par 3 boucles hydrophiles extracellulaires (ECL1-ECL3) et 3 cytoplasmiques (ICL1-ICL3). L'extrémité N-terminale et les boucles extracellulaires forment le site de liaison du ligand. Le domaine C terminal contient des sites de phosphorylation de résidus sérine et thréonine qui permettent la régulation de l'activité et de l'expression du récepteur.

Mécanisme d'activation et de transduction du signal

La fixation du ligand induit une modification de la conformation du récepteur, provoquant la rupture de l'interaction ionique forte entre la 3ème et la 6ème hélice [339], amenant ainsi le récepteur dans sa conformation active. Ce changement de conformation se répercute sur les boucles intracellulaires, leur permettant d'interagir avec la protéine G hétérotrimérique associée et de l'activer. Il existe 2 classes principales de protéines G hétérotrimériques, la première membranaire associée aux GPCR, la seconde cytoplasmique. Ces protéines G hétérotrimériques sont composées de sous unités α , β et γ . Les sous-unités β et γ sont étroitement liées et peuvent être considérées comme une seule unité fonctionnelle. Le complexe hétérotrimérique se présente dans un premier temps sous une forme inactive, lié à la guanosine di-phosphate (GDP). Lorsque le ligand active le récepteur, entraînant un changement conformationnel, ceci induit un relargage rapide de GDP de son site de fixation sur la sous unité α . Cette GDP est immédiatement remplacée par une GTP (guanosine tri-phosphate), ce qui entraîne une baisse d'affinité de la sous-unité α pour le complexe $\beta\gamma$, qui se dissocie. La voie de signalisation induite par la sous unité α diffère en fonction de la protéine G recrutée, la G_s induit de l'AMPc alors que la G_i l'inhibe. Le complexe $\beta\gamma$ active la phospholipase C et favorise un pic de calcium intracellulaire et l'activation des protéines Rac et Rho-A, impliquées dans la mobilisation du cytosquelette via la polymérisation de l'actine et la réorganisation des microtubules [340], [341]. Les kinases mises en jeu déterminent le panel de fonctions cellulaires qui vont en résulter. La GTP du complexe sous-unité α -GTP subit une hydrolyse, du fait de l'activité GTPasique de la sous-unité α , pour redonner une GDP. Le complexe α -GDP se réassocie alors avec le complexe $\beta\gamma$, et redevient inactif (Figure 13). Les récepteurs aux chimiokines sont des GPCR de classe A. Des études *in vitro* ont montré que l'administration de toxine pertussique inhibe le recrutement de leucocytes par les chimiokines. Or cette toxine empêche le relargage de GDP de la sous-unité α de type G_i , et bloque ainsi la protéine dans son état inactif, les G_i sont impliquées dans la transduction du signal en activant les kinases de type phosphoinositide-3 (PI3K), ce qui entraîne la formation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), impliqué dans la migration cellulaire, toutefois la migration de certains types cellulaires, notamment les Lc, n'est pas tout à fait altéré dans des souris PI3PK KO [342], ce qui implique d'autres voies alternatives. De plus, des animaux KO pour la kinase janus 3, de la voie STAT, démontrent l'implication de cette voie de signalisation résultante d'une activation du CCR9, CXCR4 [343] et CCR1, CCR2, CCR5 [344]. La voie STAT est la voie d'activation par les interleukines qui induit la transcription de gènes de réponse cellulaire prolongée. Le fait que cette voie ait été

récemment décrite aussi pour les chimiokines, les impliquent de plus en plus dans des fonctions cellulaires plus complexes et prolongées de la réponse immune qu'une simple diapédèse.

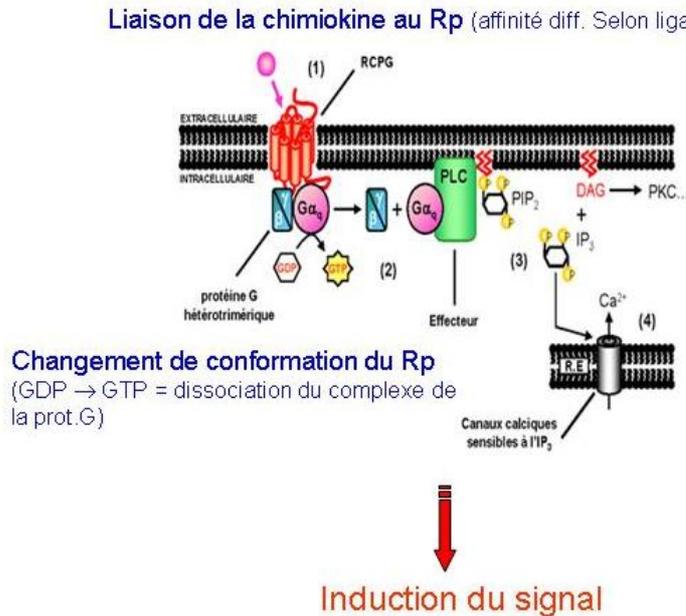


Figure 13 : Activation d'un GPCR et l'induction du relargage de calcium.

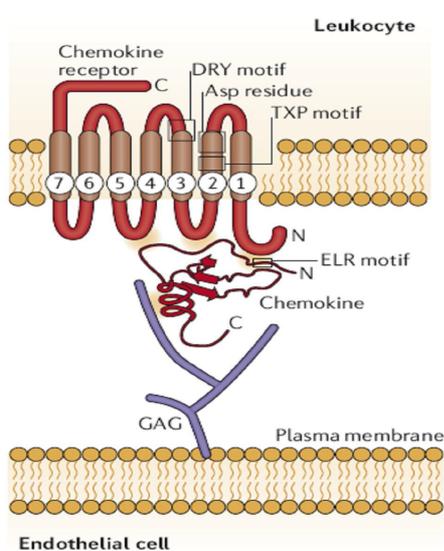
Régulation des interactions chimiokine-récepteur

Les chimiokines, dont le potentiel isoélectrique (pI) est basique, interagissent avec leurs récepteurs via les boucles extracellulaires, notamment la partie N-terminale qui présente des résidus à caractère acide. Comme nous l'avons vu cette liaison va conduire à la modification conformationnelle du récepteur et induire toute la cascade d'évènements constituant la signalisation. Cependant, de nombreux facteurs peuvent influencer l'interaction entre la chimiokine et son récepteur. Il peut s'agir de facteurs environnementaux ou encore de propriétés inhérentes à la chimiokine.

Régulation par la présentation des chimiokines à leurs récepteurs

La biodisponibilité des chimiokines est régulée par les GAG qui tapissent la surface des cellules endothéliales et des cellules épithéliales. En effet, les chimiokines sont capables de se lier aux GAG linéaires sulfatés tels que l'héparine ou l'héparane sulfate. Dès lors, les GAG sont capables d'immobiliser les chimiokines à la surface cellulaire aussi bien *in vitro* [345] qu'*in vivo* [346]. Cette interaction est connue pour faciliter la rétention des chimiokines à la surface des cellules et permet ainsi d'augmenter la concentration locale. Ce comportement modifie la présentation du ligand à son récepteur (Figure 14). De plus, les GAG sont capables

de favoriser l'oligomérisation des chimiokines [347]. En effet, certaines chimiokines sont capables de s'assembler en dimères ou encore en oligomères. Bien qu'*in vitro* l'oligomérisation ne semble pas être un prérequis à l'activation du récepteur, il a été montré que des mutants monomériques de MCP-1, MIP-1 β et RANTES étaient incapables de recruter des leucocytes *in vivo* [323], soulignant de ce fait le caractère essentiel de ce comportement. Il existe également des processus pathogéniques qui impliquent l'interaction entre une chimiokine et une molécule tierce. En effet, le virus de la variole secrète une protéine de 35 kDa, vCCI, qui interagit avec plusieurs chimiokines et les empêche de se lier à leurs récepteurs [348].



6. réponse cellulaire appropriée
5. Transduction du signal
4. Activation du récepteur via la GPCR
3. Interaction chimiokine/récepteur (motifs ELR en N-ter)
2. Interaction GAG/chimiokine (feuillets β en C-term)
1. Expression des GAG au niveau l'endothéliale

Figure 14 : Interaction GAG/chimiokine/GPCR.

Régulation par inhibition compétitive

Afin de réguler la signalisation induite par les chimiokines, il est possible de mobiliser le récepteur avec un ligand d'affinité supérieure à la chimiokine n'induisant pas la signalisation : un antagoniste. Par exemple, les analogues de la substance P (SPA) sont capables d'inhiber *in vivo* la mobilisation de Calcium dépendante de CXCR2, et de bloquer l'angiogénèse induite spécifiquement par le CXCL8 [349]. Plusieurs autres molécules ont été développées dans un but thérapeutique, et permettent d'éteindre le signal de récepteurs spécifiques. Ainsi, quelques 4-hydroxypiperidines ont montré leur capacité à réguler l'activité de CCL3 et CCL5 via le blocage de CCR1 *in vitro*. En effet, l'administration de ces composés inhibe l'acidification extracellulaire et la mobilisation de calcium et inhibe la migration de

PBMC induite par CCL3 et CCL5 [350]. Il existe également des organismes pathogènes capables de synthétiser des antagonistes des chimiokines. Par exemple, le virus de l'herpes-8 associé au sarcome de Kaposi code 3 molécules de structure proche des chimiokines humaines. Ces trois chimiokines (viral macrophage inflammatory protein-I vMip-I, -II vMip-II, et III vMip-III) ont une action antagoniste sur plusieurs récepteurs alors qu'elles en activent d'autres [351], [352]. Les chimiokines peuvent fixer plusieurs récepteurs, et inversement ce qui complique la régulation. Ce réseau se sophistique encore avec les jeux agoniste/antagoniste. En effet, en plus de leur capacité à activer divers récepteurs, certaines chimiokines ont des propriétés antagonistes pour leurs homologues [353]. Ainsi, des ligands du CXCR3, tels que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, préférentiellement exprimés par les cellules Th1 se sont avérés être des antagonistes du CCR3 [354], caractéristique des cellules Th2. En même temps, le CCL11, agoniste du CCR3, est un antagoniste du CCR2 [355]. Ces différents croisements agonistes/antagonistes, permettraient une régulation subtile et extrêmement sensible des mécanismes mis en place lors de l'intervention des cellules immunitaires.

Régulation par modification post-traductionnelle

Les chimiokines subissent une série de modifications post-traductionnelles qui ont de nombreux effets sur le comportement futur de ces protéines. Elles peuvent être activatrices, inhibitrices ou encore potentialiser l'effet des chimiokines. Ainsi, CCL5 devient mature après un clivage de la méthionine en N-terminal. En effet, le CCL5 produit par *E.Coli*, qui est complètement replié mais qui conserve son résidu N-terminal, perd son activité chimiotactique et de mobilisation du calcium sur les cellules THP-1 [356]. Plus encore, ce CCL5 est un antagoniste du CCL5 mature et de CCL3 [357]. Cependant, CCL5 clivé garde sa capacité à lier et activer le CCR5, et même avec une affinité plus forte que son homologue intact. La conversion de l'acide glutamique N-terminal en glutamine altère les propriétés inflammatoires de CCL8 [358]. En revanche, XCL1 recombinant produit par *E.Coli* (non glycosylé) est moins actif que son correspondant produit par des cellules d'insecte S2 (O-glycosylé) au regard de tests de mobilisation de calcium, de chimiotaxie et de prolifération de cellules T [359]. L'une des modifications la plus commune est la formation de ponts disulfures entre deux cystéines. La création spécifique de ces ponts permet le repliement correct de la molécule dans sa conformation active. Ainsi le CCL18 produit dans un système eucaryote (CHO) dans notre laboratoire présente 2 ponts disulfures entre les cystéines Cys10-Cys34, et Cys11-Cys50, alors que le CCL18 produit par *E.Coli* ne possède que le pont entre

les cystéines Cys11-Cys50. Les tests en chimiotaxie sur des Lc T naïfs et les basophiles, ainsi que les tests d’histaminolibération, ont montré que la concentration d’activité maximale de CCL18 produit par la CHO est de 10^{-9} M, contre 10^{-7} M pour le CCL18 produit par *E.Coli*. La réduction du pont Cys10-Cys34 dans la CCL18-CHO entraîne la diminution de son activité biologique, à des niveaux équivalents de ceux observés pour la CCL18-*E.Coli* [Thèse Benjamin Legendre, 2009].

Régulation par désensibilisation du récepteur

Le phénomène de désensibilisation intervient après activation du récepteur par la chimiokine. Il y a phosphorylation du domaine carboxy-terminal du récepteur par des GRK (G protein – coupled Receptor Kinase) et recrutement de la β -arrestine cytoplasmique au niveau du récepteur avec en parallèle un découplage de la protéine G. Il s’ensuit la formation de puits recouverts de clathrine et l’endocytose du récepteur qui sera soit recyclé à la membrane plasmique soit dégradé via leur orientation vers les compartiments lysosomiaux (Figure 15). Le but de la régulation par désensibilisation, dans le cas d’un homologue, est la limitation de la redondance fonctionnelle, et dans le cas d’un ligand hétérologue, d’une répression de voies antagonistes.

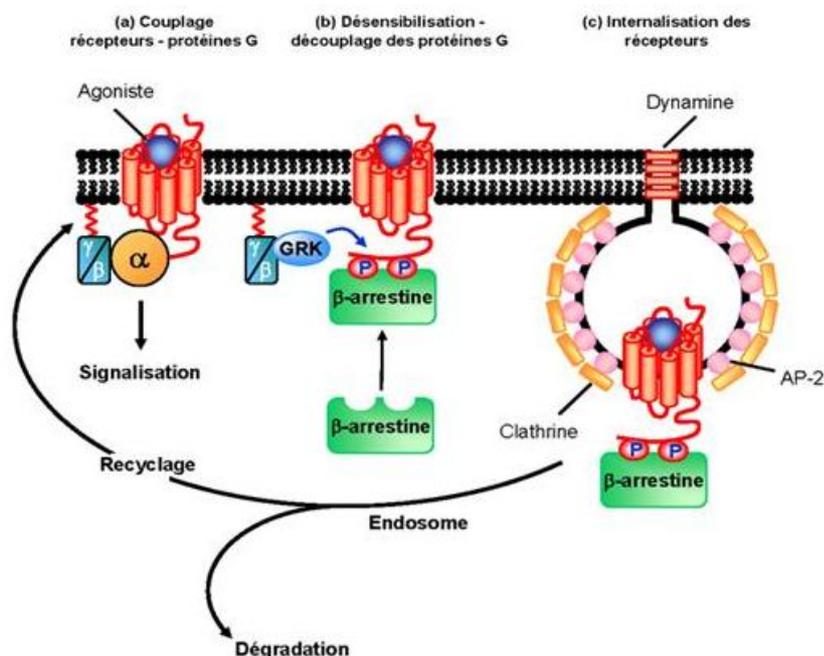


Figure 15 : Mécanisme de désensibilisation d’un GPCR.

Activité chimiotactique : La diapédèse

La diapédèse est le mécanisme par lequel les leucocytes du torrent circulatoire s'insinuent entre les cellules endothéliales en réponse à des signaux inflammatoires (Figure 16). Cette transmigration implique une série d'événements faisant intervenir différents acteurs. La première étape est le roulement, les leucocytes sont ralentis à la surface endothéliale préactivée (Fragments bactériens, cytokines pro-inflammatoires, histamine, thrombine...), grâce aux E et P sélectines qui interagissent avec les L sélectines [360], la délétion de ces gènes dans un modèle *in vivo* inhibe la réponse Th2 [361]. Cette adhésion est de faible affinité, elle favorise le contact entre les récepteurs chimiokines leucocytaires et les chimiokines piégés dans les GAG, conduisant à des phases successives d'attachement et de détachement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales, ce phénomène est nommé « rolling ». Durant cette phase la vitesse est peu rapide et favorise le contact des chimiokines avec leur récepteur ce qui donne lieu à la seconde phase, dite d'activation, la liaison au récepteur active la protéine G, le pic de calcium intracellulaire contrôle l'export des intégrines dont le LFA-1 à la surface. Ces intégrines se lient aux molécules d'adhésions endothéliales, dont le VCAM1 et l'ICAM1 [362]. Cette interaction, de forte affinité, constitue la troisième phase, dite d'adhésion ferme. La dernière phase, la diapédèse, consiste en la mobilisation du cytosquelette avec émission de pseudopodes et motricité cellulaire. Durant cette phase des protéases sont produites pour digérer les protéines de jonctions cellulaires endothéliales et la matrice extracellulaire permettant le passage leucocytaire au sein du tissu [363].

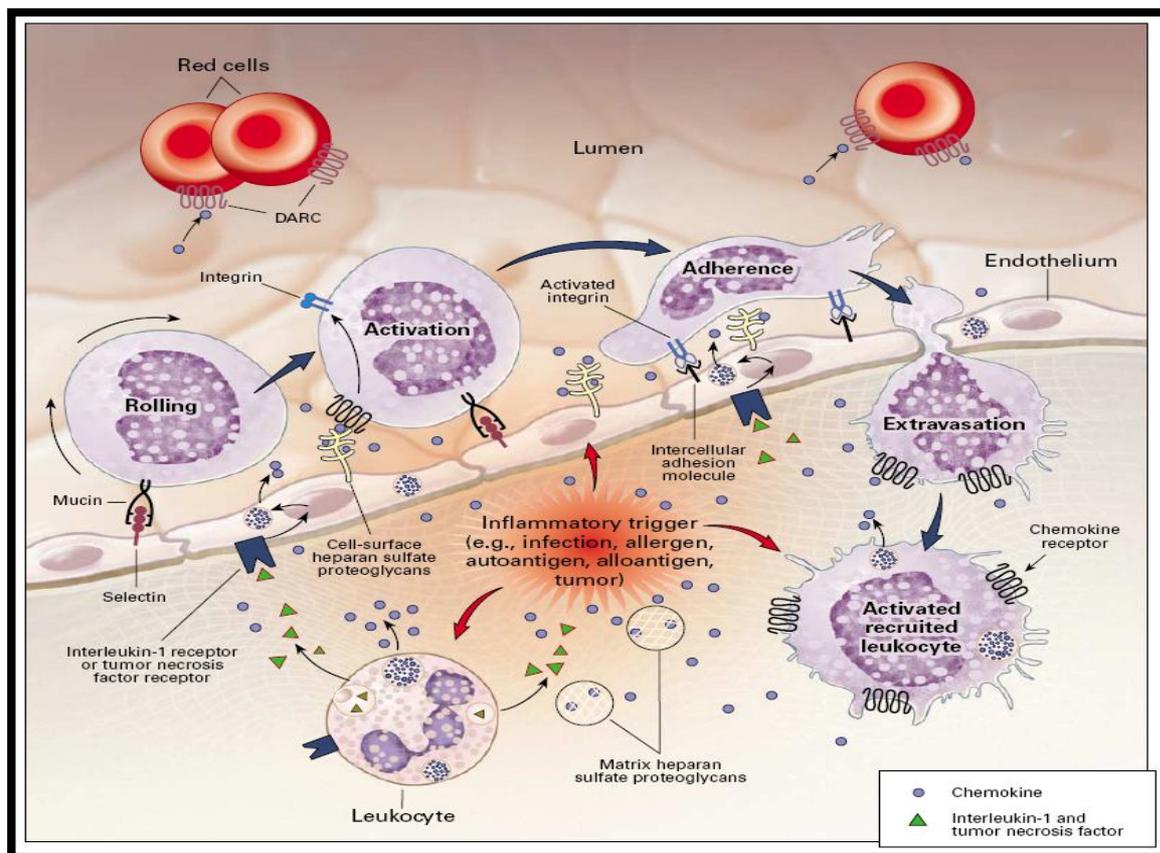


Figure 16 : Etapes de la migration leucocytaire transendothéliale. Le schéma permet de souligner la complexité des interactions moléculaires entre la cellule ciblée par la chimiokine et l'endothélium vasculaire. Cette interaction est dépendante de sélectines lors de la phase de roulement, puis des intégrines à partir de la phase d'adhésion ferme.

Activités Extrachimiotactiques

Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées aux activités qui impliquent les chimiokines autres que la migration, allant du maintien de la survie à des capacités de différenciation et de polarisation cellulaire. L'équipe de Graham a démontré *in vitro* un effet inhibiteur de la prolifération de cellules souches hématopoïétiques par le CCL3 [364]. 10 ans après, Stellato et al, ont décrit pour la première fois l'expression d'un récepteur chimiokinique fonctionnel sur des cellules de structures, le CCR3 à la surface des cellules épithéliales bronchiques et intestinales sans pour autant s'aventurer dans une description de fonctionnalité [365]. Au même moment Braun et al, ont constaté que CCL2 inhibait la production de l'IL-12 par des DCs stimulées avec des agents bactériens [366]. De façon intéressante les chimiokines semblent agir sur la différenciation des leucocytes. L'étude de Marsland concerne les DCs et le CCL19, une chimiokine exprimée constitutivement dans les organes lymphoïdes et qui attire les LcT naifs et les DCs matures via le CCR7 pour les mettre en contact. Ils ont montré

in vitro que le CCL19 induisait la maturation de DC de rate de souris en augmentant l'expression des molécules de costimulation et la production de cytokines pro Th1 de type IL-12 et TNF- α [367]. Cette fonctionnalité a été confirmée *in vivo* avec des souris plt/plt déficientes en CCL19 et ne produisant pas de CCL21 au niveau des ganglions lymphatiques. Ils ont également montré que CCL19 facilite l'endocytose et avait un rôle, avec le CCL21, anti apoptotique sur les DCs matures. Ainsi il a été démontré un rôle des chimiokines dans la finalisation de la maturation et la survie de DC ayant capturé un antigène. Au même moment Cappello et al, on décrit la même chose avec le CCL16 et des DCs humaines différenciées *in vitro*, à savoir une action sur la maturation des DCs avec augmentation de l'expression de molécules de costimulation et du CCR7 et une action favorisant un profil Th1 avec une baisse d'IL-10 [368]. Ainsi, CCL16 semble agir dans la maturation précoce des DCs au niveau des épithélia [369, 370]. Cette maturation est finalisée par CCL19 et CCL21 au niveau ganglionnaire. Cet effet extrachimiotactique des chimokines ne se limite pas qu'aux DCs, puisque Karpus et al, ont démontré un effet du CCL2 et CCL3 sur la polarisation lymphocytaire T en présence d'APC, générant un profil Th2 ou Th1 aussi efficace qu'un apport d'IL-4 ou IFN- γ exogènes [371]. Cette étude a été confirmée *in vivo* par Gu et al, quelques années plus tard, avec des souris CCL2 KO [372]. Ces données démontrent un rôle important des chimiokines dans la réponse immunitaire, en dehors de l'effet purement migratoire avec un recrutement et une localisation différentielle des différentes cellules et sous populations leucocytaires. Cet apport sur la fonctionnalité des chimiokines devrait être corroboré par des études plus approfondies, notamment en situation pathologique.

Les Chimiokines dans l'asthme

L'intérêt s'est bien sûr porté sur les chimiokines pro Th2 et leurs récepteurs, étant donné que l'asthme est une maladie dans laquelle le recrutement des cellules Th2 joue un rôle critique. Le plus étudié est CCR3 et ses ligands. En effet, ce récepteur de chimiokines est exprimé sur différents acteurs cellulaires de la réaction allergique en particulier sur les éosinophiles, basophiles, mastocytes et Lc Th2. Une surexpression de ses ligands dans l'environnement pulmonaire a également été retrouvée (Lavage broncho alvéolaire, cellules épithéliales bronchiques, muqueuses bronchiques, cellules musculaires lisses, expectorations...) après challenge allergénique [373-375]. Des études plus poussées *ex vivo* et *in vivo*, dans des souris CCR3 KO et des modèles de xénogreffes avec des peaux de patients allergiques ont confirmé son rôle dans le trafic des éosinophiles et dans leur localisation tissulaire lors d'une réaction allergique [376], [377].

Un deuxième récepteur impliqué dans l'asthme est le CCR4. Ce récepteur joue un rôle important dans le recrutement des cellules Th2 au site de l'inflammation, car il est fortement exprimé sur les Lc Th2. Le nombre de cellules Th2 exprimant CCR4 ainsi que l'expression de ses deux principaux ligands CCL17 (TARC) et CCL22 (MDC) sont augmentés après stimulation allergénique dans les voies aériennes asthmatiques [378], [379]. Vijayanand et al, [380] ont montré une corrélation positive entre les nombres de cellules T CCR4⁺ dans le sang et la sévérité de l'asthme. Par contre, les études réalisées chez des souris déficientes en CCR4 ou chez des souris où le CCR4 est neutralisé ont conduit à des résultats conflictuels sur le rôle de ce récepteur dans la pathogénèse de l'asthme. Certaines études montrent que le CCR4 ne modifie pas l'inflammation pulmonaire allergique [381], [382]. Alors que, dans d'autres le CCR4 est décrit comme étant nécessaire pour un recrutement efficace des lymphocytes Th2 spécifiques de l'antigène dans les poumons [383]. Récemment, Perros et al, ont montré que le blocage de CCR4 supprime l'éosinophilie, l'hyperplasie des cellules à mucus, la synthèse d'IgE et l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin humanisé [384].

Le CCR8 est également exprimé préférentiellement sur les cellules Th2, et les souris CCR8 KO dans un modèle d'asthme expérimental présentent un défaut de production des cytokines Th2 et de recrutement d'éosinophiles au niveau pulmonaire [385]. Cependant cette étude est très controversée par d'autres équipes qui ont démontré que l'absence du CCR8 ne présente aucun effet sur l'inflammation allergique [386] et que des anticorps bloquant le CCR8 n'ont pas d'effet sur la réaction allergique dans un modèle animal d'asthme [387]. Le CCL1, ligand du CCR8, est augmenté au niveau pulmonaire au cours des challenges allergéniques et son inhibition diminue l'infiltrat d'éosinophiles [388].

Les récepteurs CXCR3 et le CCR5 sont également exprimés sur les cellules T humaines au niveau du poumon [389] et l'expression de ces récepteurs est augmentée après challenge allergénique chez les souris. En 2008, Suzaki, et al, ont démontré qu'en bloquant ces deux récepteurs on pourrait empêcher le développement de l'asthme dans un modèle de souris [390]. Le récepteur CXCR3 est le récepteur le plus abondant sur les mastocytes dans le muscle lisse des voies aériennes dans l'asthme. Ceci est corrélé avec la plus grande expression du ligand de CXCR3 (CXCL10) dans des biopsies bronchiques des asthmatiques comparés aux sujets sains [391]. L'expression de CXCL10 est augmentée également après provocation allergénique chez les sujets asthmatiques allergiques [392], [393], [394]. Chez la souris, surexprimant le CXCL10 dans les cellules épithéliales, l'inflammation pulmonaire est amplifiée [394]. A l'inverse, chez des souris déficientes en CXCL10, la réaction pulmonaire allergique est réduite. Ainsi, CXCL10, chimiokine associée à la réponse Th1, contribue à

l'inflammation pulmonaire [394]. En revanche, dans un autre modèle, la neutralisation systémique de CXCL10, après que la réponse Th2 soit établie, amplifie l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire et diminue les taux d'IFN- γ présents dans les poumons et les ganglions drainants [395]. Il semblerait donc que l'effet bénéfique ou délétère de CXCL10 soit dépendant, non seulement, de la phase de la réaction pulmonaire allergique mais également de la localisation de CXCL10.

Le CCR2 et son ligand CCL2 ont été impliqués dans le recrutement de cellule T dans l'asthme. Les études *in vivo* ont montré que l'HRB est atténuée chez des souris déficientes en CCR2 [396]. En plus, il a été suggéré que le récepteur CXCR4 exprimé sur les cellules T soit une cible thérapeutique potentielle dans l'asthme, vu que des études ont précédemment montré que CXCL12, le ligand CXCR4, a des propriétés chimiotactiques pour une variété de cellules [397, 398].

Les récepteurs CCR4 et CCR8, fortement exprimés sur les lymphocytes Th2, sont également exprimés sur les Lc T régulateurs [399] qui participent à la résolution de la réaction inflammatoire. Une théorie récente suggère que l'expression d'un même récepteur par des cellules effectrices et régulatrices permettrait une contre régulation de la réaction inflammatoire au sein d'un même tissu [400].

Chimiokines d'intérêt

CCL17 et CCL22

Les premiers travaux à l'origine de l'identification de CCL17 ont mis en évidence une production constitutive de cette chimiokine au niveau du thymus, ainsi qu'une sécrétion transitoire dans les cellules mononuclées stimulées par PHA (la phytohemagglutinine) [309]. Ces données sont à l'origine du nom TARC (pour Thymus and Activation-Regulated Chemokine). CCL17 est sécrétée par les cellules dendritiques [309], [401], les cellules endothéliales [402], les cellules épithéliales bronchiques [373], les monocytes, les keratinocytes [403] et les fibroblastes [404]. Le CCL17 est le ligand de CCR4. Il pourrait aussi se lier au récepteur CCR8, mais ces données sont controversées [405], [406]. A ce jour, CCL17 présente une grande spécificité fonctionnelle vis-à-vis du CCR4 [407]. Chez l'homme, l'expression préférentielle du CCR4 à la surface des lymphocytes Th2, mais pas des Th1, explique un chimiotactisme préférentiel de CCL17 sur ces cellules. Cette grande spécificité est à l'origine de l'association entre CCL17 et l'inflammation Th2 [401].

CCL22 a été identifiée à l'origine dans les macrophages matures d'où l'appellation MDC (macrophage-derived chemokine) [408], [409]. CCL22 a des points en commun avec

CCL17. Le gène de MDC est localisé sur le même chromosome codant pour le gène de CCL17 et les deux molécules reconnaissent le même récepteur CCR4 [410], [407]. CCL22 est produite par une variété de cellules comme les DCs, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes (B et T). Elle peut également être produite par les cellules NK et les basophiles [411], [408], [412], [413]. La protéine mature, sécrétée et non traitée se compose de 69 acides aminés. CCL22 est décrite comme chimioattractante pour les monocytes, les éosinophiles, certaines DCs, les cellules NK et particulièrement les lymphocytes T de type Th2 [414]. En effet, l'expression de CCR4, le récepteur de MDC, est plus forte sur les lymphocytes de type 2. Les formes tronquées de la protéine, où manquent les deux ou quatre premiers acides aminés (MDC 69-3 et MDC 69-5), n'interagissent pas avec le CCR4 et ne peuvent pas attirer des cellules T. En revanche la protéine (MDC 69-3) a une activité chimiotactique appréciable pour les monocytes [415]. Ce qui suggère l'existence d'autres récepteurs que CCR4 pour les formes tronquées. D'autres observations laissent penser qu'il existerait un autre récepteur jusqu'ici non identifié pour CCL22. En effet, des cellules comme les NK répondent fortement à CCL22 malgré la faible expression de CCR4 au niveau de ces cellules [408].

CCL17 et CCL22 sont modulées par les cytokines. Elles sont notamment induites par l'IL-4, l'IL-13 et TNF- α . Par contre l'IFN- γ induit la production de CCL17, mais inhibe celle de CCL22 [416], [417]. D'autres stimuli sont capables d'induire leur sécrétion, c'est le cas de l'allergène Der p 1 qui sur des MD-DC de patients allergiques augmentent le recrutement des cellules Th2 via la sécrétion des CCL17 et CCL22 [58]. Chez la souris le SCF (Stem Cell Factor) et IgE peuvent induire la sécrétion de CCL17 et CCL22 par les mastocytes [418].

Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent un rôle capital de ces chimiokines dans l'asthme allergique. Ces deux chimiokines sont produites davantage par les lymphocytes T naïfs activés isolés du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques comparativement aux sujets contrôle [419]. Chez les sujets asthmatiques, les concentrations de CCL22 dans le LBA sont plus importantes que celles observées chez les sujets contrôle et corrént avec l'HRB [420]. Des niveaux importants de CCL17 ont été détectés dans les sérums [421] et les LBA [422] de patients asthmatiques. Une augmentation de l'expression de CCL17 et CCL22 est également observée dans les cellules épithéliales bronchiques des patients asthmatiques [420], [373]. Après provocation allergénique, chez les sujets atteints d'asthme allergique, les taux de CCL17 et CCL22 dans le LBA et leur expression dans les cellules épithéliales sont augmentés [392], [379], [393]. Les modèles murins d'asthme allergique ont démontré un rôle essentiel de CCL17 et CCL22 dans le développement de la pathologie. L'expression protéique de ces deux chimiokines est augmentée dans les tissus pulmonaires [423], [424]. Cette production

semble permettre la mise en place d'un gradient chimiotactique autorisant le recrutement massif des lymphocytes Th2 vers les voies aériennes. Dans un modèle d'asthme à l'OVA, chez les souris C57BL/6, l'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps anti-CCL17 durant la phase de sensibilisation et avant chaque provocation à l'OVA diminue la réaction inflammatoire allergique [424]. De même la neutralisation de CCL22 entraîne une diminution de l'éosinophilie et inhibe l'HRB [423]. L'ensemble de ces données démontre un rôle central assez bien établi de CCL17 et CCL22 dans l'asthme expérimental murin et souligne le potentiel thérapeutique de la neutralisation de ces chimiokines dans l'inhibition inflammatoire et dans la protection fonctionnelle respiratoire.

CCL18

Découverte entre 1997 et 1998 par plusieurs équipes, CCL18 est connue sous différents noms dont les principaux sont PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine) [425], DC-CK1 (Dendritic Cell ChemoKine 1) [426], AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-associated CC chemokine-1) [427] et MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4) [428], [429]. Cette chimiokine est issue d'une duplication de deux gènes de CCL3 avec une délétion et une utilisation sélective de certains exons [430]. Cette duplication étant apparue après la diversification des rongeurs et des primates, CCL18 n'est pas exprimée chez la souris. La protéine mature est composée de 69 acides aminés, mais des formes tronquées de cette protéine existent aussi chez l'homme [431], [324]. CCL18 est constitutivement et fortement exprimée au niveau du poumon. Elle est exprimée plus faiblement au niveau des ganglions et du thymus et de façon marginale au niveau de l'intestin grêle et de la moelle osseuse.

Les sources cellulaires sont essentiellement les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. Les DCs immatures expriment CCL18 de façon constitutive aussi bien au niveau ARNm que protéique [426], [432], [433]. Il existe plusieurs stimuli capables d'induire ou d'inhiber la production de CCL18 par ces cellules. Ainsi, l'IFN- γ et le TNF- α sont capables de réprimer la production de CCL18 [432], [427]. En revanche, les cytokines de type Th2 comme IL-4, IL-10 et IL-13 augmentent fortement sa sécrétion [432], [434], [337]. L'environnement de la DC joue également un rôle sur son profil de sécrétion chimiokinique. En effet, la mise en hypoxie de DC immatures induit une baisse de la production de CCL18 [435], qu'elle soit constitutive ou induite par l'IL-4 (adjuvant de GM-CSF). D'autres stimuli d'origine exogène, comme l'anticorps chimérique (Combinaison de IgG2a souris et de IgG2b rat) [436] ou PGE2 [432], sont capables de moduler la production de CCL18 par les DCs

immatures. La maturation des MD-DC, induite par l'activation de CD40 et gp130, potentialise leur production de CCL18 [437]. En outre, le rôle du LPS sur la sécrétion de CCL18 par les MD-DC est controversé. En effet, Vulcano et al, montrent que le LPS inhibe la production de CCL18 [432], alors que d'autres observent une augmentation de l'expression [433], [438]. Il a été également constaté que le LPS n'avait pas d'incidence sur la sécrétion de CCL18 [434]. L'utilisation de concentrations différentes pour stimuler les MD-DC pourrait expliquer les différences observées. Récemment, une étude a montré que la maturation de MD-DC par du LPS accroît la sécrétion de CCL18 sous une stimulation par la thrombine [439], via l'activation de PARs (protease-activated receptors). Une stimulation avec le CD40L [433], les pathogènes (*Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC), *C. albicans* et le virus de l'influenza) [432] ou un mélange de facteurs de maturation (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et PGE2) [434] diminuent la production de CCL18 par les MD-DC. La régulation de la sécrétion de CCL18 au cours de la maturation des MD-DC est complexe et dépend vraisemblablement d'un contexte cytokinique. Les autres types de DC, les cellules de Langherans, les pDC et les mDC ne produisent pas CCL18 de façon constitutive [433], [427]. Par ailleurs, l'IL-10 induit la production de CCL18 par les m-DC mais pas par les pDC [432]. En outre, cette chimiokine est produite par les macrophages. En fonction du mode d'activation, les macrophages peuvent être divisés en deux types : les macrophages M1 et les macrophages M2. L'activation des macrophages par l'IFN- γ , le TNF- α , le GM-CSF ou le LPS conduit à la génération de macrophages M1. Les macrophages M2 peuvent être générés par de nombreux stimuli incluant l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, le M-CSF, les complexes immuns et les ligands de TLR [440]. *In vitro*, les macrophages M1 n'exprime pas CCL18, alors que les M2 produisent d'importantes quantités de CCL18 [441], [337]. *In vivo*, l'expression de l'ARNm de CCL18 est retrouvée dans les macrophages alvéolaires de sujets contrôle et de sujets asthmatiques [337]. Chez les sujets fumeurs, la production de CCL18 par les macrophages alvéolaires présents dans le LBA est réduite comparativement aux sujets non fumeurs [442]. Après infection à *Mycobacterium tuberculosis*, la production de CCL18 est augmentée [441].

Jusqu'à présent le récepteur CCR spécifique de CCL18 n'a pas été encore clairement défini. Cependant, des informations intéressantes des propriétés de la signalisation dépendante de CCL18 ont été caractérisées. Ainsi, la capacité de la toxine pertussique à inhiber la chimiotaxie induite par CCL18 sur les Lc T et B suggère l'implication d'une protéine G α i et d'un GPCR à l'instar des autres chimiokines [426], [443], [444]. De plus, l'inhibition d'ERK (extracellular signal-regulated kinase) dans les fibroblastes pulmonaires inhibe l'induction de la production de collagène par CCL18 [443]. Il a été démontré que CCL18 est capable de se

fixer au CCR3, mais sans induire son activation. CCL18 agit comme antagoniste de CCR3 [445]. En effet, il inhibe *in vitro* le recrutement des éosinophiles sous le contrôle de CCL11. Une firme pharmaceutique américaine du nom de «Oxygen», a publié un brevet qui affirme la liaison du CCL18 au CCRL2, connu aussi sous les noms: HCR, CRAM-A, CRAM-B, CKRX et Eo1. Ce récepteur est fortement exprimé par les macrophages, les DCs et certains sous types de Lc T et présente une forte homologie avec le CCR1. Les cellules CHO exprimant le CCRL2 répondent au CCL18 en chimiotaxie. Les souris CCRL2^{-/-} présentent un recrutement normal des DCs dans les poumons, le trafic des DCs chargées en antigène vers les ganglions est, par contre, altéré. Ces souris sont protégées de l'asthme expérimental dans un modèle d'OVA [48]. Une autre équipe affirme que ce récepteur est non signalant et qu'il constitue un simple leurre pour le CCL19 ligand du CCR7 [446]. Une étude récente a montré le rôle de CCL18 dans la migration métastatique du cancer du sein et incrimine le récepteur signalant PITPNM3 par des arguments de colocalisation cellulaire, d'immunoprécipitation et de transfection [447].

L'une des premières activités de CCL18 est son pouvoir chimiotactique envers les Lc T, que ce soit des T CD4⁺ ou CD8⁺ [425]. Adema et al, ont montré que les cellules T naïves répondent plus au CCL18 que les mémoires [426]. Guan et al, ont également montré que la stimulation par CCL18 induit un flux calcique intracellulaire au niveau de cellules CD4⁺, des CD8⁺ et des cellules T naïves [428]. CCL18 est capable de se fixer aux cellules T mémoires du sang périphérique CLA⁺ (skin-homing) et des lignées T mémoires CLA⁺, et d'induire leur migration *in vitro* [448]. De Nadaï et al, ont montré que CCL18 attire les Lc Th2 polarisés *in vitro* par une stimulation IL-4/anti IL-12, mais n'attire pas les Th1 (polarisés par IL-12/anti IL-4). En plus de ses propriétés chimioattractantes, CCL18 est capable d'activer la polymérisation de l'actine dans des Lc Th2 polarisés *in vitro* [449]. CCL18 attire également les Lc B CD38⁻, naïfs, de la couronne périfolliculaire des amygdales [448]. En revanche, les Lc B des centres germinaux ne sont pas attirés. CCL18 n'attire pas la lignée monocyttaire THP-1, ni les monocytes ou les neutrophiles fraîchement isolés [425]. Cependant des monocytes cultivés pendant 3-4 jours deviennent sensibles au CCL18 : induction d'un flux calcique intracellulaire, d'une polymérisation de l'actine et de la migration à travers un filtre. Cette activation par CCL18 des monocytes est transitoire puisque après 1 semaine de culture ils ne répondent plus à la stimulation par la chimiokine [450]. De même, CCL18 est capable d'attirer les DCs immatures, mais est incapable d'induire la migration de DC matures [432]. CCL18 est capable d'induire non seulement la chimiotaxie de basophiles, mais également le relargage d'histamine par ces derniers [449]. De même, CCL18 est capable d'induire la

production de collagène par des lignées de fibroblastes pulmonaires et dermiques. Cette induction passe par l'activation de la voie ERK (extracellular signal-regulated kinase) via la protéine G [443]. CCL18 est capable également de supprimer la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques, stimulés par GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et SLF (Steel Factor) [451], et augmente la survie et adhésion des monocytes/macrophages.

CCL18 dans l'asthme allergique

Plusieurs données laissent penser que CCL18 joue un rôle important dans la réaction allergique pulmonaire. Chez les sujets asthmatiques allergiques, les taux de CCL18 dans les expectorations induites sont augmentés comparativement aux sujets contrôle [452]. Cette chimiokine est retrouvée en plus grande quantité dans le LBA de patients asthmatiques allergiques que celui des sujets sains. De Nadaï et al, ont montré que des PBMC issues de patients asthmatiques allergiques stimulées par l'allergène Der p 1 secrètent plus de CCL18 par comparaison avec celles issues de sujets sains. Une partie du CCL18 retrouvée dérive directement des pDC stimulées par Der p 1, et une autre partie provient d'une activation monocyttaire par l'IL-4 et l'IL-3 produits par les cellules T stimulées par Derp 1. CCL18 recrute *in vitro* des cellules Th2 polarisées et des basophiles, mais reste inopérant vis-à-vis des cellules Th1 et des éosinophiles [449]. D'autre part, le CCL18 induit l'activation des basophiles, le relargage de calcium intracellulaire et la libération d'histamine.

Chapitre III : Les récepteurs du système immunitaire inné

Introduction

Les poumons représentent la plus grande surface épithéliale de l'organisme exposée au milieu extérieur. Lors de la respiration les voies aériennes et les alvéoles pulmonaires sont en permanence en contact avec une multitude de particules et de microorganismes véhiculés par le flux aérien et parfois déposés à la surface de l'arbre trachéobronchique. A la différence d'autres surfaces épithéliales comme la peau ou le tube digestif, les alvéoles sont peu colonisées par les microorganismes. Ce phénomène résulte d'un système complexe de défense particulièrement efficace. Il s'agit d'une part de la caractéristique anatomique des voies respiratoires et d'autre part du système de défense: le système immunitaire.

La réponse du système immunitaire aux agents infectieux peut être subdivisée chez les vertébrés en deux sous-ensembles, la réponse innée et la réponse adaptative. L'immunité innée est très importante car elle est la première ligne de défense contre les pathogènes. Bien que non spécifique, elle est toutefois capable de contrôler les infections et permet à l'immunité acquise de se mettre en place. Cette première réponse immunitaire est orchestrée entre autres par les cellules épithéliales, les macrophages et les cellules dendritiques (DC). Ces cellules, en contact avec le milieu extérieur, ont la capacité de faire une distinction entre les antigènes de l'hôte, les antigènes inoffensifs de la flore commensale et les antigènes provenant des pathogènes. L'immunité innée est souvent considérée comme étant peu spécifique puisqu'une réponse immunitaire semblable est induite en réponse à divers pathogènes. La réponse immune innée est complétée par une réponse immune adaptative, caractérisée par la mise en place de réponses lymphocytaires B et T spécifiques et adaptées à la destruction du pathogène rencontré. Cette réponse spécifique est caractérisée par une mémoire immunologique qui permettra une destruction plus efficace et plus rapide lors d'un deuxième contact avec le même pathogène.

Les récepteurs du système immunitaire inné

Lorsqu'un micro-organisme entre en contact avec les cellules de l'organisme, il doit être détecté comme agent étranger, c'est-à-dire être discriminé du soi, par les cellules du système immunitaire. Cette étape de reconnaissance fait intervenir les récepteurs de l'immunité innée, les PRR (Pattern Recognition Receptor). Ces récepteurs, synthétisés de manière constitutive, sont caractérisés par leur capacité à reconnaître les «molécules signature» des agents

pathogènes appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). Ces PAMPs consistent en des structures relativement invariantes présentes par exemple sur l'enveloppe des procaryotes ou autres pathogènes, et absentes des cellules de l'hôte [453, 454]. Parmi les PAMPs, figurent notamment les lipopolysaccharides (LPS), composants de l'enveloppe des bactéries à Gram-négatif, le peptidoglycane (PGN), trouvé abondamment dans l'enveloppe des bactéries à Gram-positif et à un moindre degré dans celle des bactéries à Gram-négatif, l'acide lipoteïchoïque, l'ARN double brin présent uniquement chez les virus, etc...

Les récepteurs des signaux de danger peuvent être classés en quatre grandes catégories : les récepteurs de type Toll like receptors (TLR), les récepteurs de type NOD-like receptors (NLR), les retinoid acid-inducible gene-I (RIG-I)-like receptors (RLRs) et les lectines de type C (CLR). Nous décrirons plus amplement les protéines NLR dans ce chapitre.

Les récepteurs aux lectines de type-C

Les récepteurs aux lectines de type-C (C-type lectin receptors ou CLR) regroupent les protéines contenant un domaine lectine de type-C capable de reconnaître des carbohydrates. Les CLR sont représentés par des protéines associées aux cellules, participant à l'endocytose des microorganismes et à la signalisation intracellulaire et par des protéines solubles (ex : les collectines) impliquées dans l'opsonisation des microorganismes [455]. Parmi les protéines associées à la membrane plasmique des cellules immunitaires, on trouve le récepteur au mannose (MR), la dectine-1, la dectine-2 et le DC-SIGN. Ces récepteurs ont été décrits comme étant capables de lier un grand nombre de pathogènes. [456], [457], [458]. Après détection du ligand, les CLR s'engagent dans l'endocytose et la phagocytose du pathogène mais aussi dans la régulation de la réponse inflammatoire [459].

Les TLR (Toll Like Receptor)

Les TLR constituent la famille des PRR la plus étudiée dans l'inflammation allergique. Ce sont des protéines transmembranaires caractérisées par un domaine riche en leucine (LRR), couplé à un domaine proche de celui du récepteur à l'IL-1, nommé TIR [460]. Le domaine LRR est impliqué dans la reconnaissance des ligands [461]. Ces protéines sont situées à la membrane plasmique et à la membrane des endosomes. À ce jour, 13 molécules TLRs sont retrouvées chez les mammifères: 10 chez l'homme (TLR1-10) et 12 chez la souris (TLR1-9 et TLR11-13) [454]. Un ligand a été identifié pour la plupart des TLRs humains (Tableau 1). Après la reconnaissance d'un ligand, deux molécules TLR s'homodimérisent ou

s'hétérodimérisent afin d'initier une cascade de signalisation aboutissant à l'induction d'une réponse pro-inflammatoire. Les voies de signalisation initiées par les TLRs sont la voie NF- κ B [462] et la voie d'interférons de type I [463, 464] (Figure 17). Leur aptitude à activer les cellules présentatrices de l'antigène (CPA), notamment DC, place ces récepteurs à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Des études ont établi que l'induction d'une réponse Th1 ou Th2 par certains TLR dépendait en fait de la dose de PAMP utilisée et de la cinétique du traitement. Il a été montré en particulier, que dans un modèle murin de sensibilisation à un antigène inhalé, le type de réponse adaptative induite dépend de la dose de LPS inhalée en même temps que l'antigène. Des faibles doses de LPS déclenchent une réponse Th2 dans ce modèle, alors que des doses fortes induisent une réponse Th1 [465]. D'autres études ont montré, dans un modèle expérimental d'asthme, que le ligand de TLR2 (Pam3CSK4) induit une réponse de type Th2. Cet effet est obtenu lorsque ce ligand est administré aux souris au moment de la sensibilisation [466]. Par contre, l'administration des ligands de TLR2 pendant la provocation réduit l'inflammation des voies aériennes [467], [468], [469]. Par ailleurs, la stimulation du TLR9 par des le CpG induit une forte réponse Th1 qui inhibe le phénotype allergique et ce à toute les doses [470]. Récemment, des allergènes ont été décrits comme activateurs directs de TLR. Il s'agit de la blatte et Der p 2 qui peuvent activer le TLR2 [471] et le TLR4 respectivement. Il a été montré que le TLR4 est impliqué dans l'induction d'une réponse Th2 chez des souris exposées aux extraits d'acariens (HDM) contenant de faibles niveaux de LPS [472]. Les auteurs ont attribué cette réponse Th2 d'une part, à l'activité protéasique de HDM [473]. D'autre part, Ils ont proposé que l'allergène Der p 2 puisse augmenter la réponse à l'endotoxine en agissant en tant que protéines chaperonnes comme le MD-2, en favorisant la signalisation de TLR4 [474]. En effet, des homologies structurales entre l'allergène Der p 2 et MD-2 ont été montrées [44].

Les RLRs

Cette famille est composée de trois membres: retinoic acid inducible gene I (Rig-I), melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) et laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). Ces protéines cytosoliques possèdent deux domaines CARD couplés à un domaine ARN hélicase appelé «DexD/h box RNA helicase retinoic acid-inductible gene I». Le domaine CARD transmet le signal alors que le domaine ARN helicase interagit avec les ARN double brin (ARNdb) ou simple brin (ARNsb). LGP2 ne possède pas de domaine CARD [475]. Cependant, il partage avec Rig-I et MDA5 la capacité de lier les ARNdb, et peut induire ou réprimer l'activation des réponses antivirales de MDA5 et de Rig-I [476].

L'activation des RLR par leurs ligands (Tableau 1) déclenche une cascade de réponses antivirales comprenant l'induction d'interférons de type-I, l'activation de l'inflammasome et l'expression des cytokines et des chimokines proinflammatoires [477].

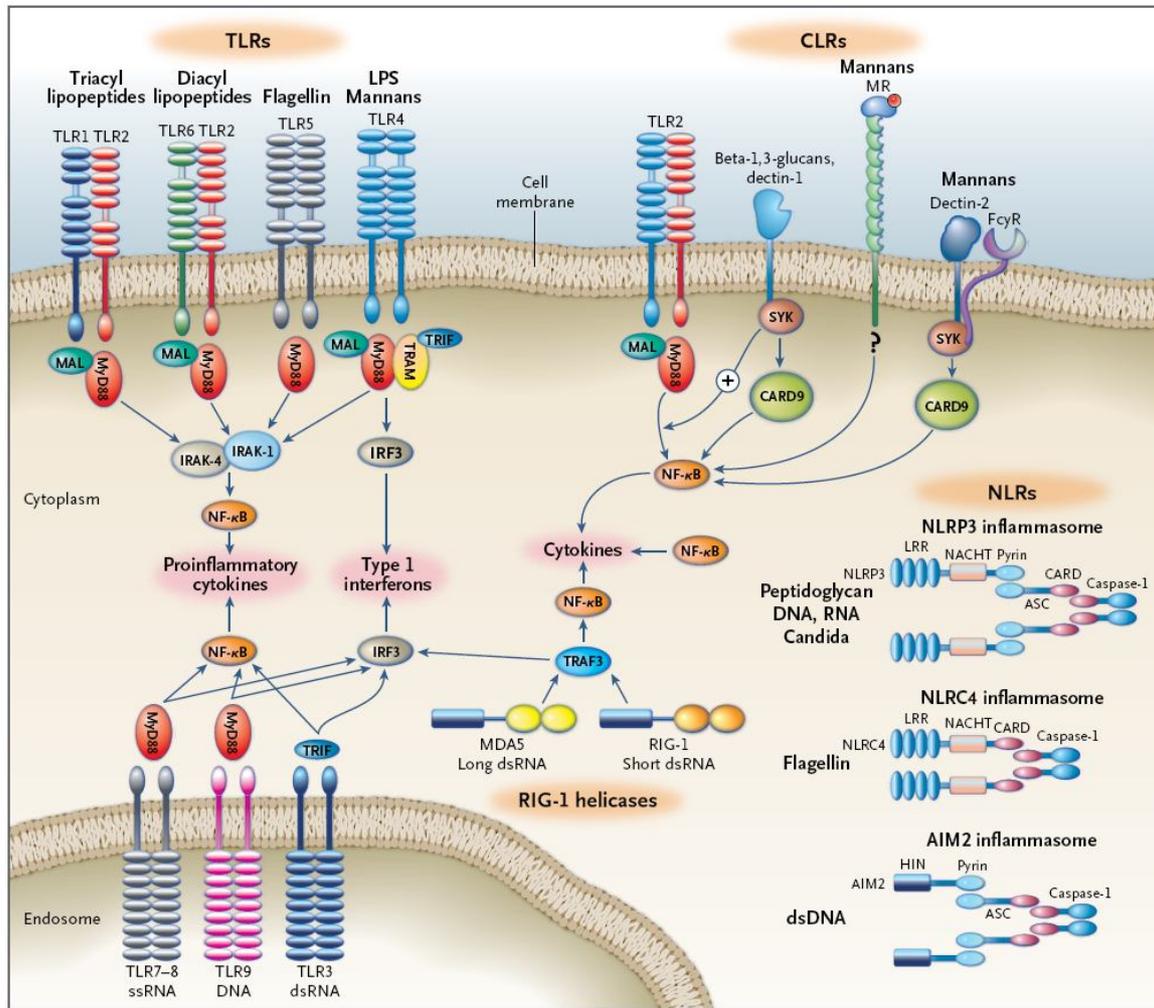


Figure 17: Représentation schématique de la structure et les principales voies de signalisation de quelques PRR [478].

Tableau 1: Les différents PRR et leurs ligands [478]

Table 1. Overview of Pattern-Recognition Receptors (PRRs) and Their Respective Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) Ligands, According to PRR Class.*		
Recognized PAMP	Microorganism in Which PAMP Is Found	Signaling Molecule
TLRs		
TLR2-1 Triacyl lipopeptides	Bacteria	MyD88–TIRAP
TLR2-2 Peptidoglycan Lipoarabinomannan Phospholipomannan Glycosylphosphatidylinositol	Bacteria Mycobacteria Candida Trypanosoma	MyD88–TIRAP
TLR2-6 Diacyl lipopeptides Lipoteichoic acid Zymosan	Mycoplasma Streptococcus Saccharomyces	MyD88–TIRAP
TLR3 ssRNA virus dsRNA virus	West Nile virus Reovirus	TRIF
TLR4 Lipopolysaccharide Fungal mannans Envelope proteins	Gram-negative bacteria Candida Respiratory syncytial virus	MyD88–TIRAP, TRIF–TRAM
TLR5 Flagellin	Flagellated bacteria	MyD88
TLR7 and TLR8 ssRNA viruses	Influenza virus, vesicular stomatitis virus	MyD88
TLR9 dsDNA viruses CpG motifs	Herpes simplex virus Bacterial and fungal DNA	MyD88
CLRs		
Mannose receptor Fungal mannans	Candida	Unknown
Dectin-1 Beta-1,3-glucans	Fungi	SYK–CARD9, RAF1
Dectin-2–FcRγ Mannans	Candida hyphae	SYK–CARD9
MINCLE–FcRγ Mannans Mycobacterial cord factor	Candida Mycobacteria	SYK
Mannose-binding lectin Repetitive oligosaccharides	Bacteria and fungi	Soluble receptor
NLRs		
NOD1 Muramyl tripeptide peptidoglycans	Gram-negative bacteria	RIP2
NOD2 Muramyl dipeptide peptidoglycans	Gram-positive bacteria	RIP2
NLRP1 Anthrax toxin	Bacillus anthracis	ASC–caspase-1
NLRP3 Peptidoglycans Bacterial toxins	Bacteria Listeria, staphylococcus	
NLRC4 Flagellin	Shigella, salmonella, legionella	ASC–NAIP5, caspase-1
AIM2 dsDNA	Francisella tularensis	ASC–caspase-1
RIG-I helicase receptors		
RIG-I Short dsRNA 5' Triphosphate ssRNA	Paramyxoviruses, orthomyxoviruses, rhabdoviruses, flaviviruses Paramyxoviruses, orthomyxoviruses, rhabdoviruses, flaviviruses	IPS1
MDA5 Long dsRNA	Picornaviruses, reoviruses, flaviviruses	IPS1

Les NOD-like récepteurs (NLRs)

Les NLRs sont des récepteurs cytosoliques reconnaissant les motifs microbiens intracellulaires. Cette famille inclut un nombre grandissant de protéines intracellulaires possédant un domaine d'oligomérisation appelé NBD ou NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) telles les protéines de résistance des plantes (protéines R), le facteur régulateur de l'apoptose Apaf-1 et les protéines de mammifères NOD (protéines possédant des répétitions riches en leucine ou LRRs). Ces protéines sont dénommées NLRs (NACHT-LRRs), NOD-LRRs ou également CATERPILLER. Il en existe 23 formes chez l'homme et 34 chez la souris [479]. Ces gènes sont exprimés dans les phagocytes (macrophages, DCs, neutrophiles), mais aussi dans les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires [480], [481], [482], [483], [484]. L'importance de ces protéines dans les réactions inflammatoires et immunitaires des vertébrés commence seulement à être appréhendée.

Structure des NLRs

Les NLR sont des protéines structurellement liés aux protéines de résistance aux maladies des plantes (protéine R) [485], [486]. Les membres de la famille des NLRs sont caractérisés par trois domaines fonctionnels différents : un domaine de reconnaissance du ligand en C terminal LRRs (leucine rich repeats), un domaine central liant les nucléotides (NBD) nécessaire à la dimérisation de la protéine et qui est un prérequis pour la transduction du signal par un domaine N-terminal effecteur [487]. Le NBD des protéines NLRs des mammifères est constitué de domaines NACHT (nommé d'après les initiales des premières protéines identifiées le possédant : NAIP, CIIA, HET-E et TP1) et NAD (NACHT associated domain). Le domaine NACHT contient sept motifs distincts incluant à son extrémité N-terminale une boucle P spécifique des ATP/GTPases ainsi qu'un site de fixation de l'ion magnésium [488], [489]. Le domaine effecteur des protéines NLRs est composé de domaines hautement diversifiés impliqués dans des interactions protéine-protéine. Cependant la plupart des protéines NLRs humaines contiennent un domaine pyrine ou un domaine CARD (caspase-activating and recruitment domain) (Figure 18) impliqué dans des interactions homotypiques avec des protéines effectrices possédant le même domaine.

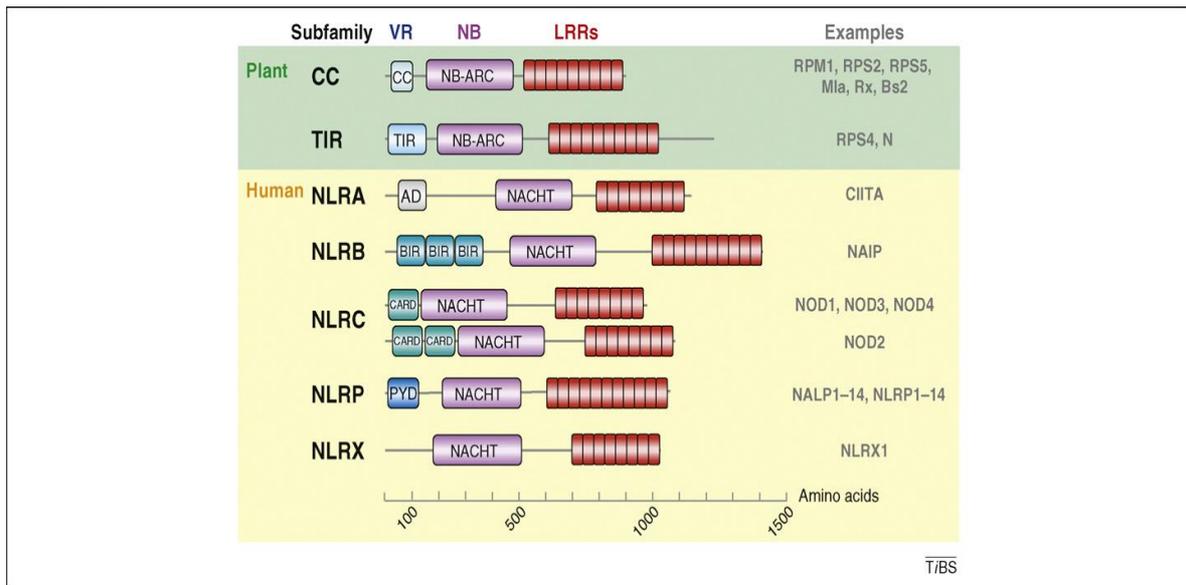


Figure 18 : Structure de la famille des NOD-like récepteur (NLR). Les NLR sont caractérisés par 3 domaines: un domaine LRR, capable de lier le ligand, un domaine central NACHT nécessaire à leur oligomérisation, et un domaine variable de liaison protéine-protéine (PYD ou CARD) [490].

Classification

En 2008, une nomenclature standard unifiée pour les gènes de la famille NLR a été proposée par J.P. Ting, et al (2008). On y distingue 5 sous-familles en fonction de leur extrémité effectrice N-terminale: La sous-famille NLR-C présente des domaines de recrutement de caspases (CARD), NLR-P des domaines pyrine (PYD), NLR-A des domaines acides, NLR-B des domaines inhibiteurs de baculovirus (BIRs) [491] et enfin NLR-X qui présente des domaines inconnus [492], [493]. L'ensemble des membres de la famille NLR sont présentés dans le **tableau 2**. Les membres des NLR les plus étudiés sont NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2) et NALP3 (NLRP3) qui appartiennent aux sous-familles NLR-C et NLR-P respectivement. Dans ce chapitre nous aborderons seulement les caractéristiques et les fonctions des membres de ces deux sous-familles.

Tableau 2 : Les membres de la famille NLR, d'après J. P. Ting et al, 2008 [494].

Approved Name		Other Names and Aliases	NLR Family	Domain Organization
CIITA	class II, major histocompatibility complex, transactivator	NLRA; MHC2TA; C2TA	NLRA	(CARD)-AD-NACHT-NAD-LRR
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	NLRB1; BIRC1; CLR5.1	NLRB	BIR3x-NACHT-LRR
NOD1	nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	NLRC1; CARD4; CLR7.1	NLRC	CARD-NACHT-NAD-LRR
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2	NLRC2; CARD15; CD; BLAU; IBD1; PSORAS1; CLR16.3	NLRC	CARD2x-NACHT-NAD-LRR
NLRC3	NLR family, CARD domain containing 3	NOD3; CLR16.2	NLRC	CARD-NACHT-NAD-LRR
NLRC4	NLR family, CARD domain containing 4	CARD12; CLAN; CLR2.1; IPAF	NLRC	CARD-NACHT-NAD-LRR
NLRC5	NLR family, CARD domain containing 5	NOD27; CLR16.1	NLRC	CARD-NACHT-NAD-LRR
NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	NALP1; DEFCAP; NAC; CARD7; CLR17.1	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR-FIIND-CARD
NLRP2	NLR family, pyrin domain containing 2	NALP2; PYPAF2; NBS1; PAN1; CLR19.9	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	CIAS1; PYPAF1; Cryopyrin; CLR1.1; NALP3	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP4	NLR family, pyrin domain containing 4	NALP4; PYPAF4; PAN2; RNH2; CLR19.5	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP5	NLR family, pyrin domain containing 5	NALP5; PYPAF8; MATER; PAN11; CLR19.8	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP6	NLR family, pyrin domain containing 6	NALP6; PYPAF5; PAN3; CLR11.4	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP7	NLR family, pyrin domain containing 7	NALP7; PYPAF3; NOD12; PAN7; CLR19.4	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP8	NLR family, pyrin domain containing 8	NALP8; PAN4; NOD16; CLR19.2	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP9	NLR family, pyrin domain containing 9	NALP9; NOD6; PAN12; CLR19.1	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP10	NLR family, pyrin domain containing 10	NALP10; PAN5; NOD8; PYNOD; CLR11.1	NLRP	PYD-NACHT-NAD
NLRP11	NLR family, pyrin domain containing 11	NALP11; PYPAF6; NOD17; PAN10; CLR19.6	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP12	NLR family, pyrin domain containing 12	NALP12; PYPAF7; Monarch1; RN02; PAN6; CLR19.3	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP13	NLR family, pyrin domain containing 13	NALP13; NOD14; PAN13; CLR19.7	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRP14	NLR family, pyrin domain containing 14	NALP14; NOD5; PAN8; CLR11.2	NLRP	PYD-NACHT-NAD-LRR
NLRX1	NLR family member X1	NOD9; CLR11.3	NLRX	X-NACHT-NAD-LRR

Les NLR-C

Cette sous famille est représentée par les deux NLR: NOD1 et NOD2. Ces protéines NOD, les plus connues, ont été les premiers NLR à être identifiés. L'existence de NOD1 a été rapportée en 1999 par deux groupes [495], [496] sur la base d'une approche génomique pour trouver des homologues d'Apaf-1 et de son homologue chez le nématode CED-4. La découverte de NOD2 a suivi deux ans après [481]. NOD1 et NOD2 détectent la présence de PAMPs provenant de composants de la paroi bactérienne dans le cytoplasme. Ces deux protéines présentent une organisation structurale semblable, qui consiste en un domaine effecteur composé respectivement d'un ou deux CARD, un NBD comprenant un domaine NACHT et trois NADs, et un domaine de reconnaissance du ligand constitué de dix répétitions riches en leucines. Chez l'Homme, NOD1 est une protéine de 108 kDa, composée de 953 résidus d'acides aminés [497], [496]. NOD1 est exprimé par tous les types cellulaires [498], [499] et reconnaît le peptidoglycane de type *meso*-DAP retrouvé essentiellement chez

les bactéries à Gram négatif et chez quelques bactéries à Gram positif comme les espèces *Bacillus* et *Listeria monocytogenes* [500, 501], [502]. La structure minimale reconnue par NOD1 est l'acide g-D-glutamyl-meso-diaminopimélique (iE-DAP). NOD2 est exprimé au niveau des monocytes, macrophages, neutrophiles, des cellules dendritiques et des cellules épithéliales intestinales [503], [481, 504]. Ce récepteur est un senseur général des bactéries à Gram positif et à Gram négatif puisqu'il reconnaît la structure minimale commune à tous les peptidoglycanes : le MDP [505], [506] (Figure 19). Les principaux ligands identifiés pour NOD1 et NOD2 sont récapitulés dans le Tableau 3. Récemment, des études ont identifié d'autres ligands pour NOD2, il s'agit du dipeptide de muramyl de N-glycolyl des mycobactéries [507] et de l'ARN viral du virus syncytial respiratoire [508]. Il a été également montré que NOD1 et NOD2 sont impliqués dans la détection de parasites intracellulaires (*Trypanosome cruzi* et *T. gondii* respectivement) [509], [510]. Ceci démontre que NOD1 et NOD2 pourraient répondre à une plus grande variété de PAMPs qu'initialement pensé et que le champ d'investigation pour l'identification de nouveaux activateurs des NLR reste ouvert.

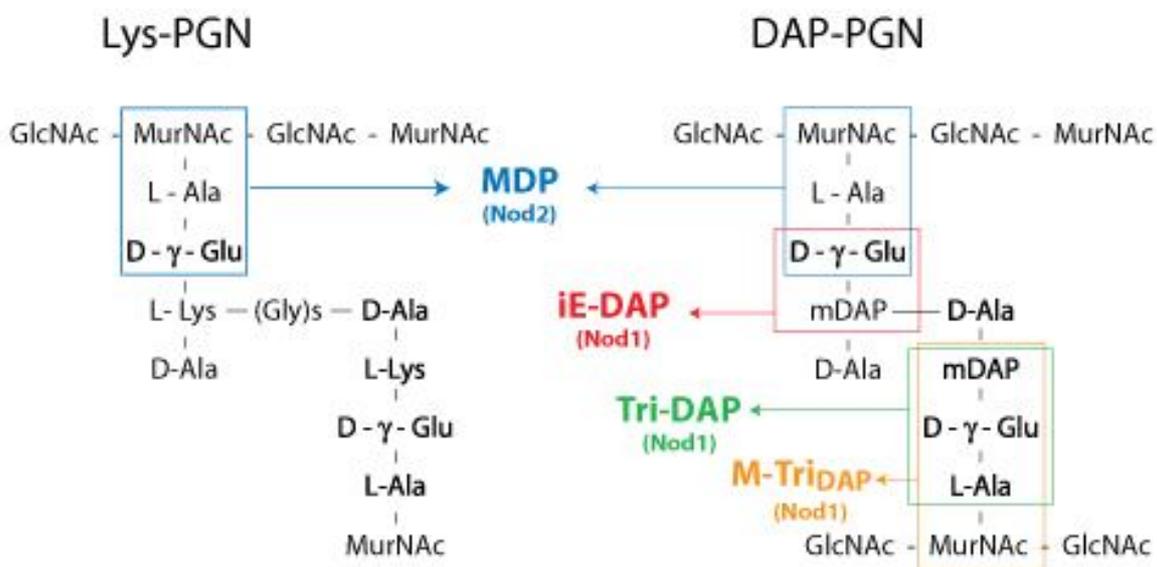


Figure 19 : Structures reconnues par NOD1 et NOD2. NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide (MDP), la structure minimale commune à tous les peptidoglycanes, ainsi que le muramyl-triLys des peptidoglycanes de type Lys, alors que NOD1 reconnaît des muuropeptides du peptidoglycane de type meso-DAP, M-triDAP et M-tetraDAP.

Tableau 3 : Ligands de NOD1 et NOD2. (Tiré du site www.enzolifesciences.com)

hNOD1		
	Microbial motifs	<i>meso</i> -Lanthionine, <i>meso</i> -DAP γ -D-Glu- <i>meso</i> -DAP (IE-DAP) L-Ala- γ -D-Glu- <i>meso</i> -DAP (TriDAP) D-Lactyl-L-Ala- γ -Glu- <i>meso</i> -DAP-Gly (FK156) Heptanoyl- γ -Glu- <i>meso</i> -DAP-D-Ala (FK565)
	Bacterial extracts	<i>Bacillus</i> species ^a , <i>B. anthracis</i> spores, <i>L. pneumophila</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>M. tuberculosis</i>
	Live bacteria	<i>S. flexneri</i> (G ⁻ Intra Ep), <i>H. pylori</i> (G ⁻ Extra Ep), Enteroinvasive <i>E. coli</i> (G ⁻ Intra Ep), <i>Pseudomonas</i> species ^b (G ⁻ Intra Ep, F), <i>Chlamydia</i> species ^c (G ⁻ Intra Ep, En, F), <i>L. monocytogenes</i> (G ⁺ Intra Ep, En)
mNOD1		
	Microbial motifs	GlcNAc-(anhydro)MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu- <i>meso</i> -DAP-D-Ala (TCT) D-Lactyl-L-Ala- γ -Glu- <i>meso</i> -DAP-Gly (FK156)
NOD2		
ALX-151-035	Microbial motifs	MurNAc-L-Ala-D-isoGln (muramyl dipeptide) MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-L-Lys (M-triLys)
	Bacterial extracts	<i>Bacillus</i> species ^a , <i>B. anthracis</i> spores, <i>Lactobacillus</i> species ^d , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> species ^e , <i>L. pneumophila</i> , <i>M. tuberculosis</i>
	Live bacteria	<i>L. monocytogenes</i> (G ⁺ Intra Ep), <i>S. pneumoniae</i> (G ⁺ Intra Ep, M), <i>S. typhimurium</i> (G ⁻ intra Ep), <i>S. flexneri</i> (G ⁻ intra Ep)

Transduction du signal par NOD1 et NOD2

En absence d'infection, les NLR sont maintenus dans le cytoplasme sous forme inactive grâce à des interactions intraprotéiques entre leurs parties LRR et NOD. Lorsque la partie LRR est tronquée ou mutée, les NLR sont constitutivement actifs [511]. Lors de la reconnaissance de PAMPs, les protéines NOD vont devenir actives, rompant ainsi leurs liaisons intra-protéiques. Leur domaine NOD devient alors accessible et la dimérisation de la protéine est possible (Figure 20). La nature de l'interaction entre le récepteur et son ligand est restée longtemps inconnue. Cependant, une étude récente a montré que l'interaction du domaine LRR de NOD1 avec son ligand Tri-DAP se fait de façon directe [502]. L'étape de la dimérisation de la protéine NOD considérée est une étape indispensable pour le recrutement de serine-thréonine kinase (RICK ou RIP2) grâce à des interactions CARD-CARD [512]; [513], [514], [481]. RIP2 se lie ensuite directement avec NEMO (NF- κ B essential modulator) qui induit la translocation de NF- κ B [479]. RIP2 peut également interagir avec TAK1 conduisant à l'activation des MAPkinases (Figure 21) [515], [516]. Les voies activées par les NOD rejoignent les voies de signalisation des TLR [487], ainsi la réponse pourrait être amplifiée. L'ensemble de ces voies de transduction aboutit à la production de cytokines proinflammatoires et de chimiokines (IL6, CXCL8/IL8, CXCL1/KC, CXCL2/MIP-2, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES), de peptides antimicrobiens ainsi qu'au recrutement de neutrophiles [517], [518], [519],[483], [520], [521].

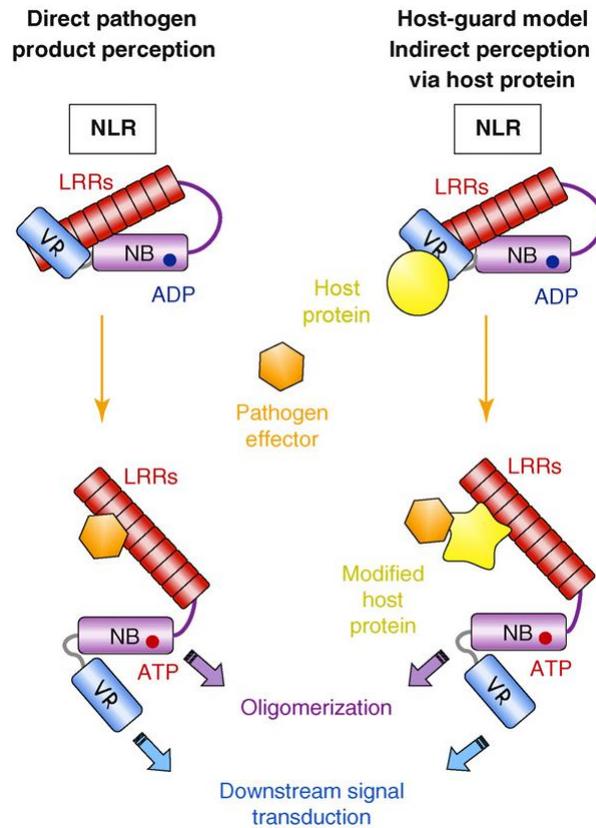


Figure 20 : Modèle d'activation des NLR, d'après Kadota et al, 2010 [490]. La détection de ligand par voie directe (a) ou indirecte (b) induit l'activation des protéines NOD, rompant ainsi leurs liaisons intra-protéiques. Leur domaine NOD devient alors accessible et l'auto-oligomérisation de la protéine est possible.

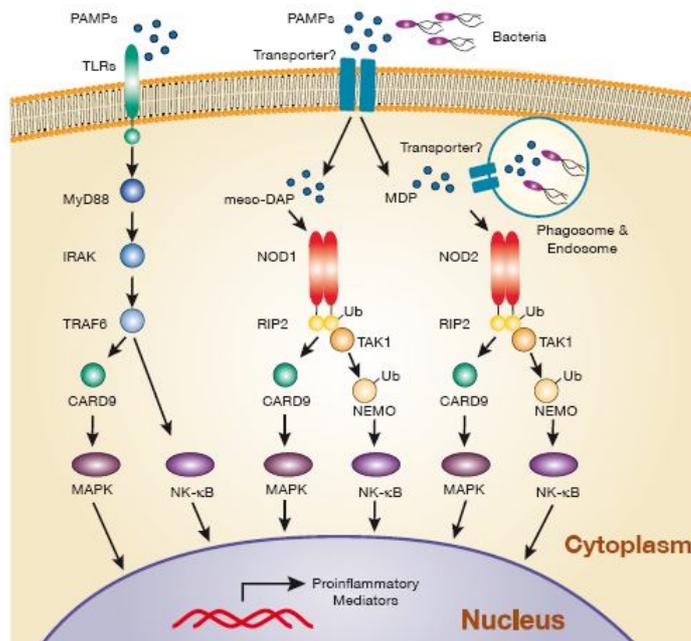


Figure 21 : Voies de signalisation activées en aval des NODs (d'après Kanneganti et al, 2007) [522]. L'activation des protéines NOD1 et NOD2 par leurs ligands respectives meso-DAP et MDP, induit le recrutement de RIP2 et l'activation des voies NF-κB et MAPKs.

NLR-P

Cette sous-famille se compose de 14 membres qui sont caractérisés par la présence des pyrimidines à l'extrémité N-terminale. Bien que les fonctions de beaucoup de NALPs soient en grande partie inconnues, plusieurs de ces NLRs sont essentiels pour la régulation de l'inflammasome dépendante de la caspase 1 [523]. Deux types, au moins, d'inflammasomes de NLRP ont été identifiés: NLRP1 et NLRP3 [524], [525]. Le mieux décrit à ce jour est l'inflammasome NLRP3. L'inflammasome, complexe moléculaire, réalise l'assemblage d'un récepteur intracellulaire appelé NLRP avec un adaptateur ASC (Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD) aboutissant au recrutement et à l'activation de la caspase-1 (par dimérisation). Cette caspase-1 (ou Interleukin-1 Converting Enzyme) protéolyse les précurseurs pro-IL-1 β et pro-IL-18 pour donner l'IL-1 β et IL-18 respectivement (Figure 22). Ces cytokines proinflammatoires sous forme inactives (pro-IL-1 β et pro-IL-18) sont produites en aval de l'activation des voies NF-κB ou AP1 suite à l'activation des voies TLRs, NLRs ou autres PRRs [526]. NALP3 détecte des «signaux de danger» endogènes ou exogènes parmi lesquels l'ATP [527], [528], les cristaux d'acide urique [529], [530], l'ARN viral et bactérien, l'ADN [531], [532], [531], l'alum [533] etc...(Tableau 4). Récemment il a été montré que plusieurs antibiotiques (néomycine, polymyxine B, gramicidine et tyrothricine) entraînent une

sécrétion d'IL-1 β via l'activation de l'inflammasome NLRP3 [534]. Les modalités de reconnaissance de tous ces signaux ne sont pas complètement élucidées, mais il est probable que ces activateurs génèrent un intermédiaire commun reconnu par NLRP3 [535]. Trois modèles d'activation indirecte de NLRP3 ont été proposés [536]. Le premier implique l'activation du récepteur P2X7 par l'ATP, ce récepteur en retour active alternativement le canal Pannexin-1 générant un efflux potassique et potentiellement la migration cytoplasmique des ligands [537], [538]. Le deuxième modèle suggère que la formation de l'inflammasome est déclenchée par la production du ROS (Reactive Oxygen Species) [539], [540]. Ce dernier est produit par NADPH oxydase suite à une perturbation de l'endocytose par exemple. Le troisième mécanisme implique la rupture du lysosome après la phagocytose, ce qui mène à la libération des activateurs de l'inflammasome NLRP3 telle que la cathepsine B [541], [542, 543]. La possibilité d'interaction entre les différentes voies proposées dans la régulation de ce complexe multiprotéique n'est pas encore élucidée. Par ailleurs, des études ont montré que la caspase-1 peut aussi être maturée grâce à des complexes protéiques NOD2-NALP1 ou NOD2-NALP3 suite à la stimulation de macrophages par MDP [544], [545].

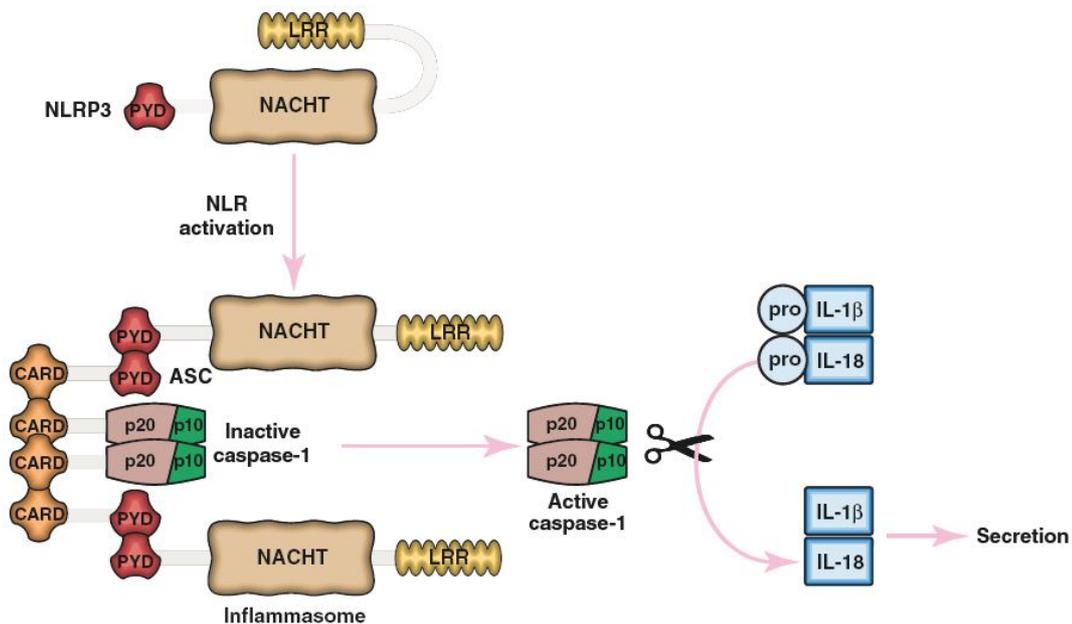


Figure 22: Activation de l'inflammasome NLRP3, d'après Shaw et al, 2011 [546]. La fixation des ligands sur les domaines LRR des protéines NLR résulte en un changement conformationnel. Les protéines NLR recrutent l'adaptateur ASC par l'intermédiaire du domaine pyrine (PYD, qui va pouvoir lier la pro-caspase1 (p20/p10) par des domaines de recrutement de caspase (CARD). Ce grand complexe se nomme l'inflammasome et constitue la plate-forme pour l'autoactivation de la caspase-1. La caspase-1 active (p20/p10) va cliver ses substrats, en particulier la pro-IL-1 β et pro-IL-18, et induire leur sécrétion sous forme active.

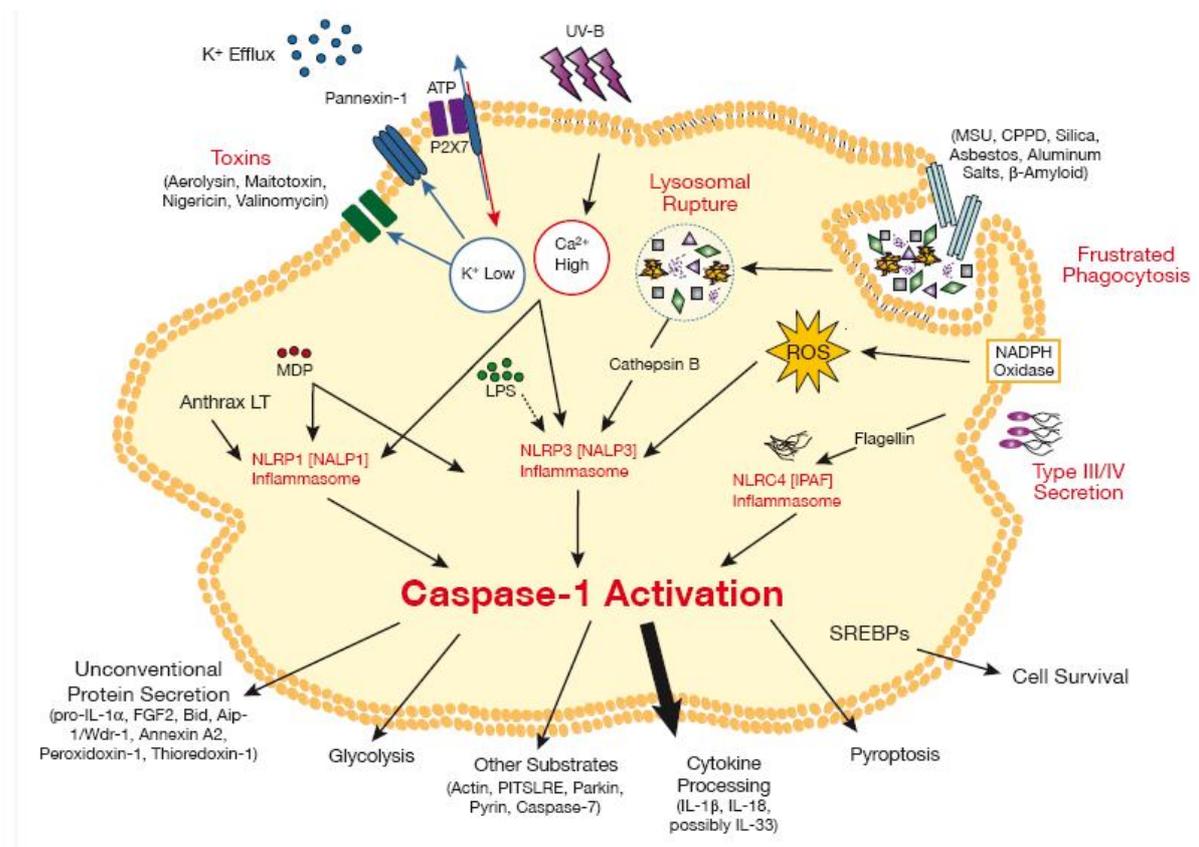


Figure 23: Voies de l'activation de l'inflammasome par les PAMPs et DAMPs. Tiré de McIntire et al, 2009 [547]. Trois modèles ont été proposés afin d'expliquer les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3, qui conduisent au clivage de la pro-IL-1 β par la caspase-1 et à la libération de la cytokine. L'efflux de potassium, la production de ROS et désintégration des lysosomes mènent à l'activation de NLRP3.

Tableau 4: Ligands des la sous famille NLR-P (Tiré du site www.enzolifesciences.com)

NLRP1 (NALP1)		
	Microbial motife	MurNAc-L-Ala-D-isoGln (muramylidipeptide; MDP)
	Microbial toxine	Lethal factor from <i>B. anthracis</i>
NLRP3 (NALP3)		
ALX-151-035	Microbial motife	MurNAc-L-Ala-D-isoGln (muramylidipeptide; MDP)
		Bacterial RNA
ALX-420-038 / -039		Imidazoquinoline Compounds (R837, R848)
ALX-581-007 to 020		LPS
ALX-746-021		Poly I:C
	Live bacteria	<i>S. aureus</i> (G ⁺ Intra M) , <i>L. monocytogenes</i> (G ⁺ Intra M)
	Viruses	Influenza virus, Sendai virus
	Microbial toxine	Aerolyein (<i>A. hydrophila</i>)
		Listeriolysin O
		Maitotoxin (Marine dinoflagellate)
BML-CA421		Nigericin (<i>Streptomyces hygroscopicus</i>)
BML-KC140		Valinomycin
	DAMPs	Alum
		Asbestos
ALX-480-021		ATP, NAD ⁺ (P2X7 receptors)
		β-Amyloid
		Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) deposition (CPPD)
		Hemozoin (<i>Plasmodium</i> species)
ALX-420-038 / -039		Imidazoquinoline Compounds (R837, R848)
		Reactive oxygen species (ROS)
		SDS
		Silica
		TNCB, TNP-CI
ALX-400-047		Uric Acid Crystals (Monosodium Urate)
		UVB

Mécanismes d'entrée des ligands de NOD dans la cellule

Puisque les NLR sont des récepteurs cytosoliques, il a tout d'abord été supposé que les protéines NOD reconnaissent des pathogènes intracellulaires [548], [549], [550]. Cependant, de nombreuses études ont montré que NOD1 et NOD2 peuvent également reconnaître des pathogènes extracellulaires et que ces récepteurs participent à la réponse immunitaire contre ces micro-organismes [551], [552], [553]. Même si les mécanismes, par lesquels les produits de dégradation du peptidoglycane parviennent jusqu'aux récepteurs NOD, ne sont pas encore clairement élucidés, certaines hypothèses ont été émises en fonction

du type cellulaire et de la bactérie impliquée. Quatre voies principales sembleraient possibles [554, 555]: Le premier mécanisme concerne les bactéries invasives (comme *Shigella flexneri*) [549] qui, après leur internalisation dans les cellules, s'échappent de la vacuole et se répliquent dans le cytosol. Durant la croissance bactérienne, le peptidoglycane est continuellement renouvelé. Chez certaines bactéries à Gram négatif, la dégradation du peptidoglycane, par les transglycosidases et les peptidases, libère des fragments dans le périplasma qui sont ensuite réimportés dans le cytoplasme de la bactérie pour y être recyclés [556]. Cependant, une partie infime de ces fragments de peptidoglycane peut être exportée dans le cytosol des cellules infectées [557]. Le second mécanisme, permettant la libération de PAMPs dans le cytoplasme, implique le phénomène de phagocytose par les cellules présentatrices d'antigène (macrophages et DC). Ainsi, NOD2 est activé dans les macrophages stimulés avec des ligands bactériens générés dans les phagolysosomes [558]. Le troisième mécanisme concerne le passage des ligands à travers la membrane plasmique. Récemment plusieurs systèmes de transport des ligands extracellulaires de NOD1 et NOD2 ont été proposés. Au niveau des cellules épithéliales il a été décrit que les transporteurs PepT1 et PepT2 sont responsables du transport du MDP et iE-DAP respectivement [559], [560], [561], mais d'autres transporteurs encore inconnus pourraient être impliqués. L'accès au cytoplasme pourrait se faire aussi à travers des canaux formés au niveau de la membrane plasmique. Une variété de pathogènes, particulièrement des gram⁺ (*S.pneumonia*, *S. aureus*, *B. anthracis*, *C.septicum*), possède des toxines formant des pores qui constituent un canal transmembranaire au niveau de la membrane cellulaire pour transporter des composants nocifs à l'intérieur de la cellule, ce qui conduit à la mort cellulaire [562], [563]. Le dernier mécanisme est l'entrée par médiation d'un système de translocation qui permet la sécrétion des effecteurs dans le cytosol. C'est le cas de *Helicobacter pylori* qui utilise un système de sécrétion de type IV au niveau des cellules épithéliales afin d'activer NOD1 [564]. Par ailleurs, des études récentes ont démontrées que les cellules épithéliales et les macrophages peuvent faire rentrer les ligands de NOD1 et NOD2 par endocytose [565], [566]. La localisation subcellulaire de NOD2 et NOD1 a également été étudiée. En plus de leur localisation cytoplasmique, ces récepteurs sont associés à la membrane plasmique [567], [568], [569], [570], [571]. NOD1 et NOD2 sont recrutés au niveau des sites d'invasion de *Shigella flexneri* probablement via un mécanisme dépendant du cytosquelette d'actine [569, 572]. Ce recrutement de NOD au niveau de la membrane peut être une stratégie pour assurer une proximité entre le récepteur et son ligand durant une invasion bactérienne ou une endocytose du ligand.

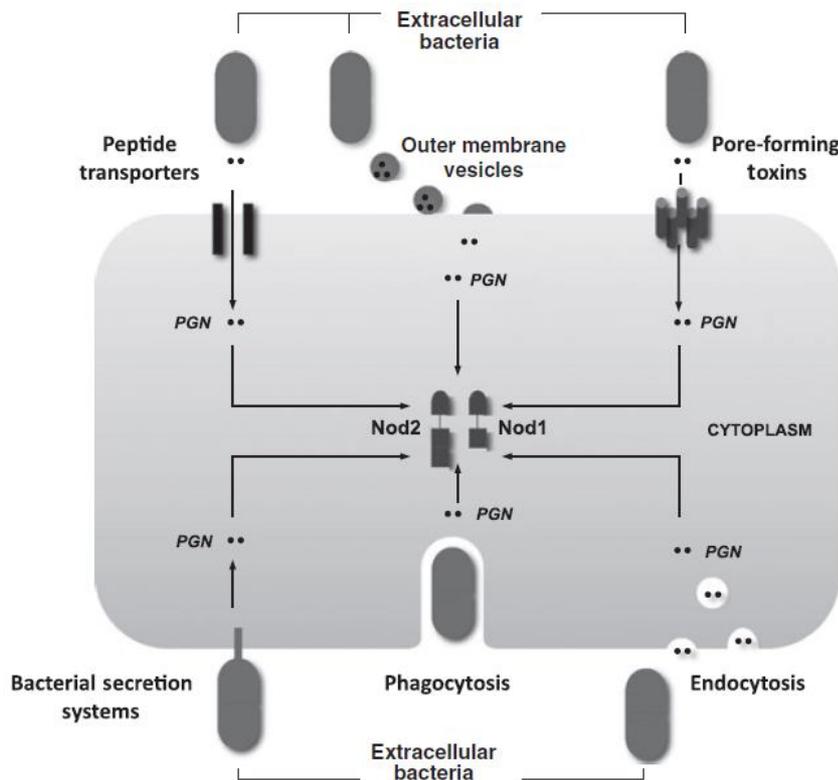


Figure 24 : Voies d'entrée de peptidoglycan dans des cellules hôtes. Tiré de Clarke, T.B. and J.N. Weiser, 2011 [573]. Les ligands de NOD1 et NOD2 peuvent atteindre leurs récepteurs par plusieurs voies: 1) par infection dans le cas des bactéries invasives, 2) par l'intermédiaire de transporteurs ou de système de sécrétion et 3) par endocytose ou phagocytose.

Le récepteur NOD1: lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative

Comme les TLR, les récepteurs NOD participent à la première ligne de défense innée mais ils sont également impliqués dans l'initiation des réponses adaptatives. Un grand nombre d'études *in vitro* ont montré l'implication de NOD1 dans la reconnaissance de plusieurs bactéries pathogènes comme *Shigella flexneri* [549] des *Escherichia coli* entéro-invasives [574], *Chlamydia* [517], *Chlamydomphila pneumonia* [550], *Pseudomonas aeruginosa* [575], *Campylobacter jejuni* [521], *Listeria monocytogenes* [576], *Helicobacter pylori* [520] ou encore *Legionella pneumophila* [577]. Par contre, *in vivo* seules certaines études ont montré l'importance des gènes NOD1 dans les réponses antibactériennes. Par exemple l'impact de NOD1 sur l'activation des cellules épithéliales par *Chlamydia in vitro* n'est pas confirmé *in vivo* quand des souris déficientes pour NOD1 sont infectées par voie vaginale [517]. Pour l'heure NOD1 a seulement été directement impliqué dans le contrôle *in vivo* de l'infection par *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* et

Legionella pneumophila. En effet des souris NOD1^{-/-} présentent une charge bactérienne accrue, après infection par voie intragastrique, orale, systémique ou inhalé, par rapport aux souris contrôle [578, 579], [580], [581], [577]. Néanmoins, l'identification de peptidoglycane intracellulaire par NOD1 induit des voies efficaces dans la défense de la cellule. En effet, la stimulation de NOD1 induit l'activation des voies de signalisations NF-κB et de MAPK et par conséquent la transcription et la production de médiateurs inflammatoires, y compris des cytokines, chimiokines et molécules d'adhésions, qui sont impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires. De même, l'activation de ces protéines induit la sécrétion de peptides antimicrobiens (comme la β defensine) [582], [520], [583] et la production des NO (nitric oxide) [584], qui sont considérés comme des effecteurs clés de l'immunité innée. Récemment, Travassos et al, [571] ont rapporté que la stimulation de NOD1 déclenche l'induction d'autophagie. Ce dernier est un important mécanisme de défense de l'hôte, permettant à la cellule de digérer une partie de son contenu, que ce soit du cytoplasme, des protéines ou des organites cellulaires. Ce mécanisme peut viser aussi les bactéries et les virus intracellulaires. [585, 586], [586].

Plusieurs études ont montré que les ligands des NOD induisent la sécrétion de CXCL8/IL8, CXCL1/KC et CXCL2/MIP-2 par les cellules humaines et murines [582], [518], [587], [588]. Ces chimiokines sont impliquées dans le recrutement des neutrophiles vers le site de l'inflammation. En effet, l'injection de l'agoniste de NOD1 aux souris par voie intraperitoneale induit le recrutement des neutrophiles au site d'injection [518]. Par ailleurs, Il a été montré que la production d'IL8 par des cellules épithéliales ou les cellules endothéliales exposées aux bactéries est dépendante de NOD1 [574, 578]. L'activation de NOD1 induit aussi la sécrétion de CCL5/RANTES chez la souris et l'Homme [589], [588]. Ceci suggère que l'activation des récepteurs NOD pourrait induire le recrutement d'autres types cellulaires, autres que les neutrophiles, comme les lymphocytes, éosinophiles, NK ... D'autres études ont montré que la stimulation des macrophages et des DCs par les ligands des NOD induit la libération de plusieurs cytokines comme le TNF-α, IL-6 et IL-1β. En revanche, il est connu que les agonistes de NOD1 ou NOD2 montrent peu d'activité en terme de sécrétion de cytokines. Cependant, la réponse est amplifiée par costimulation avec le LPS [500]. Quelques études se sont intéressées à la collaboration entre les TLR et les récepteurs NOD1 et NOD2. Une combinaison des récepteurs NOD2 et du TLR4 induit une plus grande sécrétion de l'IL-6, IL-12 et du TNF-α comparativement à la stimulation d'un seul des récepteurs [590], [591, 592]. Une autre équipe a démontré que le récepteur NOD1 agit en synergie avec les TLR2, 4, 5 et 7/8 et que la production de plusieurs cytokines (ex : TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-

10 et GM-CSF) était significativement augmentée [593]. Au niveau des DCs primaires humaines, les agonistes de TLR ainsi que ceux des NOD peuvent agir en synergie dans l'induction de la maturation des cellules dendritiques, en augmentant l'expression de plusieurs molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CD40) [594], [595]. L'effet de synergie se traduit aussi par l'augmentation de la sécrétion de l'IL-8 et l'IL-6 par ces cellules [484, 594, 596]. De même, la coopération entre les ligands de TLR et les NOD induit l'IL-12 et favorise la différenciation de cellules Th1 [484]. Il apparaît qu'au delà du rôle de NOD1 et NOD2 dans la modulation de l'immunité innée, ces protéines dirigent également l'immunité adaptative. Ceci a été démontré d'abord dans des études identifiant le MDP, l'agoniste NOD2, comme composant de l'adjuvant de Freund complet (CFA) [597]. L'effet adjuvant du MDP s'est avéré totalement dépendant de NOD2 [598]. Par la suite, il a été montré que les protéines NOD1 et NOD2 étaient impliquées dans l'induction de l'immunité adaptative de type Th2 lorsque des ligands des NOD étaient employés comme adjuvant [599, 600]. En effet, d'injection aux souris de l'antigène (ovalbumine) combiné avec l'agoniste de NOD1 (FK156) comme adjuvant, induit une réponse immune systémique de type Th2 [599]. En revanche, quand l'adjuvant utilisé est le CFA, qui contient un mélange de ligands de TLR et de NOD, la réaction induite est de type Th1 et Th17. Les auteurs ont montré aussi que les souris déficientes pour NOD1 ne peuvent pas développer une réponse systémique de type Th1, Th2 et Th17 après administration de l'OVA combiné avec le CFA. Par conséquent, ce défaut de réponse résulterait d'un défaut de synergie entre la stimulation de TLR et NOD1. Une étude récente a démontré que la réponse Th2 systémique induite, suite à l'activation de NOD1, est dépendante des cellules stromales qui produisent le TSLP, mais aussi de la molécule de costimulation OX40L exprimé au niveau des DCs [601]. Ces résultats suggèrent que l'orientation de la réponse immune par NOD1 est dirigée par le microenvironnement des cellules non hématopoïétiques.

Conformément, à son rôle d'adaptateur en aval de NOD1, Rip2 a été démontré essentiel dans l'initiation de la réponse adaptative [602]. D'ailleurs, les souris déficientes pour RIP2 ne sont pas capables de produire des cytokines et d'activer des cellules (neutrophiles, macrophages) en réponse au ligand de NOD1. Suite à un challenge avec l'ovalbumine combiné avec le ligand de NOD1, ces souris présentent un défaut de réponse Th2 alors que, la réponse reste inchangée lors d'un challenge avec l'ovalbumine combiné avec de l'alum. Concernant la protéine NOD2, Dan et al, ont démontré que l'activation du récepteur NOD2 par voie intra nasale induit une réponse Th2 dans un modèle souris de tolérance allergénique [603].

Il est clair que NOD1 contrôle de multiples aspects de la réponse immunitaire, à la fois innée et adaptative. De ce fait, ces récepteurs sont potentiellement impliqués dans plusieurs types de pathologies affectant le système immunitaire. Par conséquent, les NLR ou les voies de signalisation qu'ils activent représentent autant de cibles thérapeutiques. Les NLR pourraient aussi jouer un rôle important dans la vaccination. De ce fait, il est primordial de tenir compte de la présence de leurs ligands dans les préparations bactériennes données comme adjuvants.

Les récepteurs NOD et pathologies

Les NLRs, bien que connus depuis peu, sont déjà liés à de nombreuses maladies inflammatoires. Des variations génétiques de plusieurs protéines NLRs ont été associées à des maladies inflammatoires et/ou à des immunodéficiences [491, 604], [605, 606], [607], [608]. Ceci souligne l'importance de ces protéines comme sentinelles intracellulaires de la défense immunitaire. Le premier NLR impliqué est NOD2. En effet, des polymorphismes dans les régions codantes de NOD2 ont été initialement associés à la maladie de Crohn [604]. Un peu plus tard on a découvert que des mutations dans le gène de NOD2 sont aussi associés au syndrome de Blau [607] et à la sarcoïdose juvénile (ou maladie de Besnier-Boeck-Schaumann) [609]. Plus récemment, il a été également démontré que les variations génétiques dans le NLRP3 sont associées à la maladie de Crohn [610], [611]. Ce récepteur est impliqué aussi dans un certain nombre de maladies auto-immunes et inflammatoires [612], [613], [614], [615], [525] (Tableau 5). Des études ont corrélé l'existence de polymorphismes d'insertion/délétion localisés dans un des introns de NOD1 avec la prédisposition aux maladies allergiques comme l'eczéma [616] et l'asthme avec des niveaux élevés d'IgE [617], mais aussi aux maladies inflammatoires de l'intestin [605]. Un polymorphisme de NOD2 est également associé à la gravité de certaines maladies atopiques et à la prévalence de l'asthme et ce avec une élévation des taux sériques d'IgE [618]. Une étude récente a montré qu'une mutation dans le gène de NOD2 peut influencer le développement et la progression de la BPCO chez des sujets japonais [619].

Il est important de signaler que NOD1 est exprimé dans le poumon [620] mais aussi au niveau des voies respiratoires (muqueuse nasale) [621], [622] et que le gène de NOD1 est localisé au niveau du chromosome 7 (7p14-p15) qui est associée à l'asthme. Les mécanismes reliant NOD1 aux maladies allergiques et à l'atopie ne sont pas connus. Néanmoins, il a été montré récemment que l'expression de NOD1 et Nalp3 est régulée de façon inverse durant la saison pollinique chez les patients qui ont une rhinite allergique [622]. Ces données ouvrent

des perspectives pour une nouvelle approche et de nouveaux traitements dans l'inflammation des voies aériennes. Toutes les données obtenues en laboratoire apportent une lumière nouvelle sur les mécanismes impliqués dans des maladies fréquemment rencontrées en pratique.

Tableau 5: Les NLR et les maladies chez l'homme [623]

NLR	Signaling pathway	Acts as PRR	Function(s)	Associated disease(s)
CIITA	MHC class II transcriptional regulator	?	Regulates MHC class II gene expression	Bare lymphocyte syndrome, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis
NAIP	JNK activation by TAK1 and others	Yes	Flagellin sensing, pyroptosis, inhibition of apoptosis	<i>Legionella</i> susceptibility (mice), spinal muscle atrophy
NOD1	RIP2-dependent NF- κ B and MAPK activation	Yes	PRR for bacterial PGN, inducer of apoptosis and of autophagy	Asthma (?), inflammatory bowel disease (?)
NOD2	RIP2-dependent NF- κ B and MAPK activation	Yes	PRR for bacterial PGN, attenuates TLR2 responses, induces autophagy	Blau syndrome, Crohn's disease, early-onset sarcoidosis, graft-versus-host disease
NLRC3	Unknown	?	Negative regulator of T cells	Unknown
NLRC4	Inflammasome formation	Yes	PRR for flagellin and bacterial secretion systems, inducer of pyroptosis	Unknown
NLRC5	Type I interferon responses, MHC I regulator	?	Regulates innate immune responses, influences MHC class I presentation	Unknown
NLRP1	Inflammasome formation	Yes	Activated by MDP and DAMPs	Vitiligo, Addison's disease, type 1 diabetes
NLRP2	Inflammasome formation	?	Negative regulator of NF- κ B	Beckwith-Widemann syndrome, graft-versus-host disease
NLRP3	Inflammasome formation	Yes	Responds to DAMPs	Cryopyrin-associated periodic syndromes (CAPS) ^a , type 2 diabetes
NLRP4	Unknown	?	Suppressor of NF- κ B (?)	Unknown
NLRP5	Unknown	?	Maternal effect gene	Sterility in female (mice)
NLRP6	Unknown	?	Negative regulator of NF- κ B and IL-1 β (?)	Unknown
NLRP7	Unknown	?	Negative regulator of IL-1 β (?)	Familial biparental hydatidiform moles
NLRP8	Unknown	?	Unknown	Unknown
NLRP9	Unknown	?	Unknown	Unknown
NLRP10	Caspase-1 activation	?	Negative regulator of caspase-1 activation	Unknown
NLRP11	Unknown	?	Unknown	Unknown
NLRP12	Unknown	?	Negative regulator of classical and non-canonical NF- κ B pathways involved in MHC-I gene expression	Hereditary periodic fevers with skin urticaria
NLRP13	Unknown	?	Unknown	Unknown
NLRP14	Unknown	?	Spermatogenesis	Spermatogenic failure, embryogenesis failure in mice
NLRX1	Mitochondrially located	?	ROS induction, viral sensing	Unknown
Apaf-1	Apoptosome formation	?	Inducer of apoptosis by cytochrome <i>c</i> sensing	Unknown

Contexte et objectif du travail de thèse

Les réactions de défense de l'organisme face à un organisme pathogène sont extrêmement variées et adaptées aux caractéristiques de son agresseur. Le choix des stratégies de défense se traduit par la polarisation des cellules T CD4⁺ naïves en cellules auxiliaires polarisées en Th1, Th2, Th17, Treg.... La polarisation de la réponse immunitaire spécifique est sous l'influence de nombreux facteurs tels que l'antigène, sa dose, son mode d'inoculation et son mode d'infection, le type de cellule dendritique impliquée et son phénotype, ainsi que l'environnement cytokinique.

L'asthme allergique est caractérisé par une réponse immune adaptative de type Th2 notamment liée à l'induction de différentes chimiokines pro Th2. Parmi celles-ci, les chimiokines CCL17, CCL22 et CCL18, qui sont induites dans un contexte de polarisation Th2. Les agents microbiens peuvent prévenir, aggraver ou sont soupçonnés d'induire l'asthme allergique, par des mécanismes encore incomplètement élucidés qui font intervenir des récepteurs de l'immunité innée (PRR) capables de les reconnaître. Ces dernières années, les PRR ont pris une place importante dans l'induction et l'orientation de la réponse immunologique, par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigène. Néanmoins, la réponse immune est sous l'influence d'autres facteurs comme décrit précédemment.

Au cours de ma thèse, nous avons choisi de focaliser le travail sur l'implication des chimiokines et du récepteur de l'immunité innée NOD1 dans la modulation de la réponse immune. Le but de notre travail a été double, tout d'abord, évaluer le rôle du récepteur NOD1 dans le développement de l'asthme allergique, avec une approche *in vitro et in vivo*, et d'autre part, évaluer les relations directes entre la chimiokine CCL18 et une cellule de l'immunité innée la cellule dendritique sur la réponse adaptative.

Ce travail nous a permis d'apporter de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui dirigent la réponse immune qui ne sont pas complètement élucidés.

Les manuscrits décrivant ces travaux sont présentés ci-après.

Article I

Le récepteur inné NOD1 programme les cellules dendritiques à promouvoir la réponse Th2 dans l'asthme allergique expérimental, et au niveau des cellules T naïves chez l'homme, via la production de chimiokine pro Th2 CCL17

Ait Yahia Saliha, Azzaoui Imane, Vorng Han, Marquillies Philippe, Duez Catherine, Delacre Myriam, Grandjean Teddy, Fang Ying, Plé Coline, Wallaert Benoît, Chamaillard Mathias and Tsicopoulos Anne.

Problématique et approche expérimentale

Les PRR ont une place importante dans l'induction et l'orientation de la réponse immune, constituant ainsi une cible prometteuse dans le développement de nouveaux adjuvants. NOD1 est un récepteur capable de favoriser une réponse systémique de type Th2. Cependant, l'effet de son activation sur le développement et/ou l'exacerbation des maladies allergiques est inconnu. Nous avons évalué ici l'effet de l'administration au moment de la sensibilisation de l'agoniste de NOD1 comme adjuvant, sur la modulation de la réponse immunitaire dans un modèle expérimental d'asthme allergique, mais aussi sur la modulation de la polarisation de la réponse immune dépendante des cellules dendritiques chez l'homme.

Résultats de l'article

Dans un modèle expérimental d'asthme allergique, l'administration de l'agoniste de NOD1, au moment de la sensibilisation à des souris sauvages, amplifie la réponse Th2 au niveau des poumons. Cette réponse est caractérisée par une augmentation de la production des chimiokines pro Th2 (CCL17 et CCL22). L'amplification de la réponse inflammatoire pulmonaire de type Th2 est reconstituée par le transfert adoptif de DCs dérivées de la moelle osseuse (BM-DC) stimulées avec de l'OVA combiné à l'agoniste de NOD1. Par contre les BM-DC provenant de souris déficientes en CCL17 sont incapables d'amplifier cette réponse. In vitro, les DC murines (BM-DC) et les DC humaines dérivées de monocytes (MD-DC) produisent des quantités importantes de CCL17 et CCL22 en réponse à l'agoniste de NOD1, avec une différence majeure qui est que les MD-DC humaines ne nécessitent pas de costimulation par l'allergène. De plus, les DC humaines stimulées par l'agoniste de NOD1 favorisent la polarisation de cellules T naïves vers un profil Th2.

Conclusion

Ces données montrent que l'activation de NOD1 au moment de la sensibilisation aggrave l'asthme allergique et oriente la polarisation des cellules T vers un profil Th2 par

l'intermédiaire de chimiokine pro Th2 CCL17 produite par la DC. Ces résultats soulignent l'importance de tenir compte des ligands de PRR utilisés lors de la formulation des vaccins afin d'éviter l'amplification de la réponse inflammatoire chez les asthmatiques.

Title page

CCL17 production by dendritic cells is required for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma

Saliha Ait Yahia,^{1,4} Imane Azzaoui,^{1,4} Han Vorng,^{1,4} Philippe Marquillies,^{1,4}, Catherine Duez,^{1,4} Myriam Delacre,^{5,2-4} Teddy Grandjean,^{5,2-4} Ying Fan,^{1,4} Coline Ple,^{1,4} Benoit Wallaert,^{1,4,6} Mathias Chamaillard,^{5,2-4} and Anne Tsicopoulos^{1,4,6}

¹Pulmonary Immunity, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019, Lille, France ; ²Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019, Lille, France ; ³CNRS UMR 8204, F-59000, Lille, France ; ⁴Univ Lille Nord de France, F-59000, Lille, France; ⁵Nods-like receptors in infection and immunity , Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019, Lille, France ;

⁶Clinique des Maladies Respiratoires et Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille, France

Running title: NOD1 exacerbates asthma through DC activation

Correspondence: Anne Tsicopoulos, Pulmonary Immunity, Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Prof Calmette, BP 245, 59019 Lille, France; e-mail: anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr. Ph: +33 320 877 221 Fax : +33 320 877 345

Total character number: 39567

Abbreviations used: Pattern recognition receptors (PRRs); Nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptors (NLRs); Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1); broncho alveolar lavage (BAL); airway hyperresponsiveness (AHR); Toll Like Receptor (TLR); Dendritic cells (DCs) Bone marrow-derived DCs (BM-DCs); Monocyte-derived dendritic cells (MD-DC); Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Abstract

Nucleotide-binding oligomerization domain 1 (NOD1) used as adjuvant, favours a systemic Th2-mediated response but it is unknown whether it may initiate and/or promote allergic diseases. We show herein that NOD1-mediated conditioning of dendritic cells was sufficient to exacerbate OVA-induced experimental asthma by amplifying CCL17-mediated lung Th2 responses. Surprisingly, NOD1-mediated sensitization of purified murine DCs enhanced production of CCL17 and CCL22, but not of TSLP and IL-33 *in vitro*. Consistently, adoptive transfer of NOD1-conditioned DCs exacerbated the Th2 pulmonary response in a CCL17-dependent manner *in vivo*. NOD1-mediated conditioning of human DCs also induced CCL17 and CCL22 production, but in contrast to murine DCs, did not require antigen costimulation. NOD1-primed DCs from allergic donors exhibited enhanced maturation and CCL22 secretion but no IL-10 production compared with nonallergic donors. Moreover, NOD1-stimulated human DCs favored a Th2 cell polarization profile. Altogether these data unveil that NOD1 activation exacerbates allergic asthma through a direct effect on DCs by the induction of CCL17, arguing for a need to address, for vaccine formulations, safety issues linked to the development of allergic diseases.

Introduction

The mechanisms underlying adjuvant effects are under renewed scrutiny because of the therapeutical implications for vaccine development. Pattern recognition receptors (PRRs) are key components for recognition of danger signals that ultimately shape adaptive immune responses through the activation of dendritic cells (DCs), and as such are promising candidates as vaccine adjuvants (Levitz and Golenbock, 2012). Noteworthy, some PRRs, including Nucleotide-binding oligomerization domain (Nod)-like receptor 1 (NOD1) have been shown to favour not only Th1 or Th17 adaptive responses, but also Th2 responses (Fritz et al., 2007); (Magalhaes et al., 2011), which may potentially lead to susceptibility to developing or exacerbating allergic diseases. NOD1 recognizes peptidoglycan containing *meso*-diaminopimelic acid (Chamaillard et al., 2003); (Girardin et al., 2003), which is more commonly found in gram negative bacteria. NOD1 is primarily expressed in the cytoplasmic compartment of both non immune cells, including epithelial cells and mesothelial cells (Inohara et al., 2003), and of immune cells including dendritic cells (DCs) (Inohara and Nunez, 2003); (Ogura et al., 2001); (Fritz et al., 2005). Interestingly, NOD1-mediated Th2 profiling in the spleen was mainly dependent on the stromal compartment, in relationship with the induction of TSLP, although CD11c⁺ cells were required for optimal induction of Th2 immunity (Magalhaes et al.). The pro-Th2 role of NOD1 is further supported by genome-wide association studies that revealed a molecular link between polymorphisms of NOD1, asthma and high levels of serum IgE (Hysi et al., 2005), as well as with atopic dermatitis (Weidinger et al., 2005) and allergic rhinitis (Eder et al., 2006). It is therefore of utmost importance to determine whether NOD1-mediated adjuvant effects may exacerbate allergic diseases.

The aim of this study was therefore to evaluate if systemic sensitization with NOD1 agonist may exacerbate a lung Th2 response in an experimental model of OVA-induced asthma. Given that DCs are central to the initiation of T-cell immunity in allergic asthma (Lambrecht and Hammad, 2009), we next aimed to assess the potential contribution of DCs in this setting. Our results showed that NOD1 agonist used as an adjuvant exacerbated the pulmonary Th2 response *in vivo* through the production of CCL17 by DCs. In line with our findings, conditioning of purified human DCs by NOD1 agonist also enhanced production of CCL17 and CCL22 *in vitro* resulting in a Th2 cell polarization profile that did not need antigen costimulation. Furthermore, DCs from allergic subjects responded differently from nonallergic subjects to NOD1 stimulation by exhibiting increased maturation and pro Th2 chemokine secretion and absence of IL-10 production. Altogether these data uncover a

previously unrecognized effect of NOD1, which exacerbates allergic asthma through a direct effect on DCs by the induction of the pro Th2 chemokine CCL17.

Results

NOD1 agonist administration during systemic sensitization exacerbates OVA induced cardinal features of experimental asthma.

To evaluate the adjuvant effect of NOD1 agonist on the exacerbation of asthma, we set up a model of OVA-induced asthma without systemic adjuvant, and with intranasal challenges in order to induce minimal allergic inflammation. Groups of WT C57BL6 mice were intraperitoneally sensitized at 10 days interval with OVA alone or in conjunction with the NOD1 specific agonist FK156, and control animals received ip injections of FK156 or PBS alone. Mice were then intranasally challenged at the indicated time points with OVA or PBS for the two control groups (Fig 1A). The cardinal features of experimental asthma consisting in broncho-alveolar lavage (BAL) eosinophil accumulation, induction of antigen-specific IgE antibodies, lung inflammation with mucus hypersecretion, and development of airway hyperresponsiveness (AHR), were evaluated in the different groups. WT mice sensitized with OVA without adjuvant or with OVA/FK156, and challenged intranasally exhibited a significant increase in total cell number in BAL when compared with control mice (data not shown), in relation with an increase in both lymphocytes and eosinophils in the two groups (Fig 1Ba). Furthermore, total cell, lymphocyte and eosinophil numbers were significantly higher in OVA/FK156- than in OVA- sensitized WT mice, whereas macrophage numbers were lower in OVA/FK156- than in OVA- sensitized WT mice. No significant difference was observed in the number of neutrophils between all the groups (data not shown). The assessment of the humoral response showed that the levels of serum total IgE and OVA specific IgE antibodies were significantly increased in WT mice sensitized with OVA/FK156, as compared with mice sensitized with OVA alone (Fig 1Bb). The level of OVA-specific IgG1 antibody, a marker of the Th2 response, was increased in OVA/FK156- as compared with OVA-sensitized mice (Fig 1Bb). In contrast, OVA-specific IgG2a antibody, reflecting the Th1 response, was not detected in all groups (data not shown).

In order to check the specificity of the effects of the FK156 agonist, NOD1-deficient mice were evaluated using the same study design. After OVA challenge, OVA- and OVA/FK156-sensitized *nod1*^{-/-} mice exhibited a similar airway eosinophilia and humoral immune response to OVA local challenges compared with their respective controls (Fig 1Bc), thus confirming

the specificity of action of FK156. It has been previously shown that Th2-mediated responses to inhaled OVA in experimental asthma requires low level LPS signaling through TLR4 when intra nasal sensitization route is used, whereas TLR4 is not necessary when systemic peritoneal sensitization with OVA alone is used (Eisenbarth et al., 2002); (Piggott et al., 2005). In order to check that the low concentration of LPS present in the OVA extracts (0.04 µg/mL), was not interfering with the adjuvant effect of NOD1, Worthington LPS clean OVA (labeled as OVA-clean) was used instead of crude OVA. WT mice sensitized with OVA-clean combined with FK156 and challenged with OVA-clean showed increased numbers of eosinophils and decreased numbers of macrophages in BAL fluids and increased total IgE production when compared with WT mice sensitized and challenged with OVA-clean alone (Fig 1Bd). However, the levels of induction were lower than in crude OVA- sensitized and challenged WT mice. These data support the observation that LPS is not necessary for NOD1-mediated adjuvant effect on experimental allergic asthma, but rather for the global amplification of the allergic response.

Lung inflammation was assessed in hematoxylin and eosin-stained lung sections, and showed increased inflammatory infiltrates and mucus staining in crude OVA/FK156- as compared with OVA-sensitized WT mice (Fig 1C).

Finally, to examine the functional respiratory consequences, AHR was evaluated following exposure to increasing doses of methacholine by invasive measurement of dynamic resistance (R) in mechanically ventilated WT mice (FlexiVent system). As shown in Fig 1D, OVA challenge of OVA-sensitized mice induced a significant ($p < 0.01$) increase in airway responsiveness to methacholine for the doses 25 and 50 mg/mL compared with control mice. Interestingly, OVA/FK156-sensitized mice demonstrated a higher increase in lung resistance for the dose of 50 mg/mL than mice sensitized and challenged with OVA alone. In contrast, no difference of airway responsiveness to inhaled methacholine was found between PBS/FK156- and PBS- sensitized mice.

Altogether, these results suggest that systemic immunization of mice with OVA in the presence of NOD1 agonist exacerbates the cardinal features of experimental allergic asthma as well as the functional respiratory parameters.

NOD1 agonist administration during systemic sensitization amplifies lung Th2 polarization and pro Th2 chemokine production in experimental asthma

Cardinal features of allergic asthma are associated to a Th2 immune profile. To evaluate the polarization profile, Th2-type cytokine as well as pro-Th2 chemokine concentrations were

measured in lung protein extracts by ELISA. The Th2 type cytokines IL-4 and IL-13 were significantly increased after sensitization with OVA/FK156 when compared to sensitization with OVA alone (Fig 2A). The secretion of the pro-eosinophilic cytokine IL-5 was increased in OVA- and OVA/FK156- sensitized mice as compared with PBS controls. In contrast, no significant changes were observed for the Th1 cytokine IFN- γ . We also evaluated the presence in the lung of TSLP and IL-33, two well-known pro Th2 molecules. There was no variation of TSLP, whereas IL-33 increased similarly in OVA- and OVA/FK156- sensitized mice (Fig 2A). Evaluation of mRNA expression by quantitative RT-PCR basically showed the same pattern of cytokine variations except for IL-13, which was also elevated in the OVA-sensitized group (Fig 2B). Pro-Th2 chemokine CCL17 and CCL22 levels were higher in mice sensitized with OVA/FK156 than in mice sensitized with OVA alone. In contrast, the levels of the pro-Th1 chemokine CXCL10 decreased in OVA/FK156- and OVA- sensitized mice (Fig 3A). The OVA/FK156 sensitization did not modulate the levels of CCL11 and CCL5 (data not shown). The same profiles were observed at the level of mRNA expression (Fig 3B). We next investigated the cellular sources responsible for the increased production of CCL17 and CCL22 in the lung of mice sensitized with OVA/FK156. CCL17 and CCL22 are produced by many different lung cell types, including cytokeratin⁺ epithelial cells, MHCII⁺/CD11c⁺ DCs, F4/80⁺ macrophages, CD19⁺ B cells, and CD4⁺ T cells (Penna et al., 2002); (Sekiya et al., 2000); (Nakayama et al., 2004); (Hirata et al., 2003). The intracellular production of CCL17 and CCL22 was evaluated by flow cytometry staining in cells isolated from lung of the different groups of mice. All lung cell types were found to produce the two chemokines except B cells. CCL17 secreting- DC, CD4⁺ T cell, and macrophage numbers were significantly increased after OVA/FK156 sensitization compared with the OVA group whereas CCL17 producing- epithelial cell numbers were not modified (Fig 4A). CCL22-producing cell numbers showed the same pattern of variation but the differences were not statistically significant except for macrophages (Fig 4A). When evaluating the percentage of positive cells among the different cell populations, CD4⁺ T cells but not DCs and macrophages exhibited a significant increased percentage of cells producing CCL17 in OVA/FK156- compared with OVA- sensitized mice ($34.03 \pm 2.99\%$ versus $23.55 \pm 2.62\%$ for CCL17 $p < 0.05$ for $n=4$ experiments). Representative flow cytometry stainings of CCL17 and CCL22 in CD4⁺ T cells are shown in Fig 4B. These results demonstrate that NOD1 agonist administration during the systemic sensitization phase of OVA-induced allergic asthma enhances the secretion of the pro-Th2 chemokine CCL17, which may account for the enhanced secretion of lung Th2 cytokines.

NOD1-mediated conditioning of DCs is sufficient to exacerbate experimental asthma

The above results suggested that a specific Th2 priming of T cells had occurred by cells systemically conditioned by NOD1 agonist. DCs express NOD1, are the most potent APC, and are believed to be indispensable for the initiation of T-cell immunity in allergic asthma (Lambrecht and Hammad, 2010). To clarify the role of systemic DCs in the NOD1-mediated adjuvant effect in allergic asthma, a DC adoptive transfer model was used. Bone marrow-derived DCs (BM-DCs) were pulsed with OVA in the presence or absence of NOD1 agonist FK156 and with PBS or FK156 as controls. After washing, DCs were transferred intraperitoneally to naïve WT mice, and the mice were challenged with OVA. As previously reported by others for intra-tracheal transfer (Lambrecht et al., 2000); (Matsubara et al., 2006); (Piggott et al., 2005), intra-peritoneal transfer of OVA pulsed BM-DCs reconstituted Th2 cell responses to inhaled antigen. Moreover, transfer of DCs pulsed with OVA/FK156 induced a significant increase in airway total cell number, eosinophils and lymphocytes in BAL, compared with the transfer of DCs pulsed with OVA alone or PBS alone (Fig 5A). Increased production of seric total IgE, OVA-specific IgE and IgG1 antibodies was observed as well in mice transferred with DCs pulsed with OVA/FK156, compared with those transferred with DCs pulsed with OVA, FK156 or PBS alone (Fig 5B). Th2 polarization at the lung level was also increased in mice transferred with DC pulsed with OVA/FK156 compared with the other groups as shown by the elevated expression of IL-13 and IL-5 mRNA and CCL17 at the protein level (Fig 5C). These results suggest that the adjuvant effect of NOD1 agonist on Th2 lung polarization in OVA-induced asthma is dependent upon the direct activation of systemic DCs by NOD1.

CCL17 production by DCs is essential for NOD1-mediated exacerbation of allergic asthma

To evaluate the mechanism involved in the synergic effect of OVA/FK156-pulsed DCs on Th2 lung polarization, a series of mediators involved in Th2 polarization and known to be produced by DCs, including CCL22, CCL17, TSLP and IL-33 (Kashyap et al., 2011); (Yanagawa et al., 2011); (Penna et al., 2002), were assessed in the supernatants of BM-DCs. CCL17 and CCL22 were upregulated in OVA/FK156-pulsed DCs compared with DCs pulsed with OVA, or PBS alone (Fig 6A) whereas there was no induction of TSLP and IL-33 (data not shown).

To definitely link the production of pro Th2 chemokines by NOD1 stimulated DC with the amplification of the lung Th2 profile in OVA-induced asthma, OVA and/or FK156-pulsed

DCs from *ccl17*^{-/-} mice were transferred to naïve WT mice. Transfer of *ccl17*^{-/-} DCs pulsed with OVA/FK156 induced a significant increase in airway total cell number, eosinophils and lymphocytes in the BAL, which was not different from mice transferred with *ccl17*^{-/-} DCs pulsed with OVA alone (Fig 6B). Total seric IgE and OVA-specific IgG1 antibodies also did not differ between the two groups of mice, whereas OVA-specific IgE antibodies were not detected (Fig 6C). Similarly, lung Th2 cytokine and CCL17 levels were not different between mice transferred with OVA/FK156- and the OVA- pulsed *ccl17*^{-/-} DCs (Fig 6D). Altogether these data suggest that CCL17 produced by DCs is the major mediator involved in the amplification of lung OVA-induced Th2 polarization by NOD1 agonist.

NOD1 agonist increases human DC costimulatory molecule expression and pro Th2 chemokine production

To examine the relevance of these data in humans and in allergic diseases, a specific human NOD1 agonist was used, namely FK565, to stimulate immature human monocyte-derived DCs (MD-DC) obtained from both healthy and Dermatophagoides pteronyssinus (Dpt) allergic donors. The effect of FK565 was evaluated alone or in combination with the major allergen of Dpt Der p1. In addition, DCs were cultured with LPS as a positive control and in the absence of any stimulus as a negative control. The cell surface phenotype in terms of the costimulatory molecules CD40, CD80, CD86, ICOSL, MHCII (HLA-DR), and the DC immature markers CD1a and DC-SIGN was assessed by flow cytometry. As shown in Fig 7A, the LPS positive control increased CD80 and CD86 in both allergic and nonallergic subjects but decreased ICOSL and DC-SIGN in nonallergic donors compared with medium. Interestingly, the levels of the expression of the costimulatory molecules CD80 and CD86 increased after FK565 stimulation and were significantly higher in allergic than in nonallergic donors. ICOSL expression was also significantly increased in response to FK565 but only in allergic donors. In contrast, DC-SIGN expression, a marker of immature DCs, was inhibited by FK565 only in nonallergic donors. FK565 stimulation did not affect the expression of CD40, HLA-DR and CD1a on DCs from allergic as well as from nonallergic donors (data not shown). Surprisingly, stimulation of human DCs from allergic subjects with Derp1 neither modified co-stimulatory cell surface expression, nor did it synergize with FK565 for any marker. Representative examples of DC surface marker staining are shown in Fig 7B. These results indicate that FK565 induces the maturation of DCs, as evidenced by the up-regulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86, with a predominant effect in allergic patients.

Next, we examined the secretion of cytokines and chemokines by DCs in response to the different stimuli. The Th1-inducing cytokine IL-12p70 as well as IL23p19 that promotes Th17 polarization were not detected in any culture supernatant tested from either allergic or nonallergic donors (data not shown). Production of IL-10, a regulatory cytokine, was induced by FK565 in nonallergic but not allergic donors, whereas TGF- β , another suppressive cytokine, was not modified by FK565, as compared with unstimulated DCs in both groups (Fig 8A). As previously shown in other studies (Tada et al., 2005); (Fritz et al., 2005), the proinflammatory cytokine IL-6 was strongly induced by FK565, however, no differences were observed between allergic and nonallergic donors. For Derp1 stimulation, as observed for DC surface markers, no variations were observed whatever the cytokine tested, whereas all cytokines were induced in response to LPS (Fig 8A). The production of chemokines involved in different immune responses was examined. CXCL8 proinflammatory chemokine was used as a positive control (Tada et al., 2005); (Fritz et al., 2005) and was strongly induced by FK565 in both groups of donors (Fig 8B). Interestingly, FK565-stimulated DCs from allergic and nonallergic donors, produced significantly higher amounts of the two pro Th2 chemokines CCL17 and CCL22 than unstimulated DCs, whereas there was no modification of the pro Th1 chemokine CXCL10. The level of CCL22 was significantly higher in allergic donors than in healthy donors (Fig 8B). As observed previously, there was no effect of Der p 1 used alone or in combination with FK565, whereas LPS stimulation strongly induced CXCL8 and CXCL10 but did not modify the pro Th2 chemokine production. TSLP and IL-33 were not detected in any DC supernatant (data not shown). Taken together, these observations suggest that responsiveness to NOD1 agonist FK565 is enhanced in DCs isolated in particular from allergic subjects, which leads to increased DC maturation and secretion of Th2-attracting chemokines.

FK565-primed DCs promote a Th2 profile in human naïve T cells

To evaluate whether FK565-stimulated DCs from allergic and nonallergic donors favored a particular T cell polarization profile, primed DCs were washed and co-cultured with allogenic naïve CD4⁺ T cells from nonallergic donors. After 5 days of culture, the T cell polarization was evaluated by measuring in the supernatants by ELISA the Th1 cytokine IFN- γ , the Th2 cytokine IL-13, the regulatory cytokines IL-10 and TGF- β and the Th17 cytokine IL-17A. Stimulation of naïve T cells with DCs primed with FK565 from both allergic and nonallergic donors, induced a strong production of IL-13 (Fig 9). In contrast, secretion of IFN- γ , IL-10, TGF- β and IL-17A was not modified as compared with T cells co-

cultured with unstimulated DC. At baseline, T cells co-cultured with DCs from allergic donors produced more IL-17A and IFN- γ than T cells co-cultured with DC from nonallergic donors. Altogether, these *in vitro* observations suggest that NOD1-primed human DCs, through the production of CCL17 and CCL22, promote the differentiation of naïve CD4⁺ T cell towards a single Th2 profile which supports the key physiological role of NOD1 on DC-mediated amplification of the allergic reaction in experimental asthma.

Discussion

In this study, we observed that administration of NOD1 as a systemic adjuvant exacerbated experimental OVA-induced asthma cardinal features including BAL eosinophilia, specific IgE levels mucus hypersecretion and AHR. This exacerbation was abolished in *Nod1*^{-/-} mice showing that it was not related to a contaminant of FK156 agonist. The presence of LPS was also not required for NOD1-mediated exacerbation of asthma, as shown with the clean OVA, but it increased the magnitude of the allergic response. These results are different from those obtained in a previous paper, where a synergistic effect of LPS was observed with NOD1 agonist and OVA sensitization on systemic splenic Th1 and Th17 but not Th2 responses (Fritz et al., 2007). This may be related to the differences between mucosal and systemic immunity. Alternatively this disparity may be explained by the dose of LPS present during the sensitization process, which was low (0.32 ng) in our model and high (25 μ g) in that paper. Another unexpected observation was the significant decrease of the absolute numbers of macrophages in BAL fluids from mice sensitized with OVA + FK156 versus OVA alone. Although NOD1 has been involved in autophagy (Travassos et al., 2009), there is no direct study showing that NOD1 induces cell death. A decrease in the number of macrophages that are prone to secrete the suppressive cytokine IL-10 might contribute to the increased allergic inflammatory reaction.

Beside the exacerbation of the cardinal features of asthma, i.p sensitization with NOD1 agonist plus OVA also upregulated lung Th2 cytokine production and mRNA expression without affecting the Th1 cytokine IFN- γ and the Th17 cytokine IL-17A (data not shown). IL-4 and IL-13 were not upregulated at the protein level after sensitization by OVA alone compared with PBS, which may be related to a consumption phenomenon, since IL-13 mRNA was upregulated at the mRNA level. In accordance with the exacerbation of lung Th2 cytokines, NOD1 plus OVA sensitization also increased lung production of the pro Th2 chemokines CCL17 and to a lesser extent CCL22. CCL5, a chemokine induced in murine macrophages by NOD1 stimulation (Werts et al., 2007), was not significantly modified. The

increase in the number of CCL17⁺ cells after OVA + FK156 sensitization could mainly be ascribed to CD4⁺ T cells, CD11c⁺MHC⁺ DCs and to F4/80⁺ macrophages, whereas for CCL22⁺ cells it was related to macrophages only. Interestingly, among each cell population only CD4⁺ T cells showed a significant increase in the percentage of CCL17 secreting cells after OVA + FK156 sensitization suggesting that in addition to increased cell recruitment, a specific priming of T cells had occurred by cells systemically activated by NOD1 agonist. Transfer of pulsed DCs, instead of sensitization, showed that DCs were the cells involved in NOD1-mediated exacerbation of asthma. Using BM chimera, it has been previously shown that stimulation of NOD1 in the stromal compartment was necessary to prime a systemic Th2 response (Fritz et al., 2007) and was dependent upon the production of TSLP (Magalhaes et al., 2011). In the latter paper, sensing by DCs of NOD1 ligand was not sufficient to induce splenic Th2 immunity but contributed to this response. Altogether with our results, these studies suggest that NOD1-mediated conditioning of DCs drives secondary lung but not splenic Th2 responses. The underlying mechanism explaining the increased mucosal Th2 polarization upon NOD1 activation was examined. As TSLP has been shown to be produced by DCs (Kashyap et al., 2011), and to play a major role in NOD1 adjuvant effect on spleen Th2 polarization (Magalhaes et al., 2011), we assessed its production at both the lung and DC levels. However, there was no upregulation of lung TSLP in mice sensitized with OVA/FK156 versus OVA alone, and no induction even at baseline in BM-DCs. In contrast, the upregulation of pro Th2 chemokines by DCs, and in particular CCL17 was required for this effect, as demonstrated by the absence of exacerbation of the allergic reaction following adoptive transfer of *ccl17*^{-/-} DCs. This study shows, for the first time to our knowledge, that the induction of CCL17, but not of TSLP, by DCs in response to NOD1 agonist, triggers Th2 polarization in the lung. The importance of CCL17 production by DCs in Th2 polarization has been stressed in previous studies by reconstitution and depletion experiments in allergic asthma (Medoff et al., 2009), as well as in a humanized SCID mouse model of asthma (Perros et al., 2009). CCL17 and CCL22 production by DCs during the sensitization process may lead to increased duration of interaction between CCR4- expressing CD4⁺ T cells and NOD1 stimulated DCs and thus reinforce cytokine production by the antigen-primed T cells. Such a mechanism has been already described for *listeria* stimulated DCs that, through their production of CCL17 and CCL1, were able to increase cytokine production by CD8⁺ cells (Henry et al., 2008). Moreover, it has been shown that DCs producing CCL17 are better stimulators of CD4⁺ T cell proliferation than *ccl17*^{-/-} DCs (Alferink et al., 2003). In the latter paper, it is of interest that DCs from the spleen expressed almost no CCL17, in contrast to

peripheral DCs, which may explain the difference of mechanisms observed between our study and Magalhaes study. We also found no production of CCL17 after in vitro OVA stimulation of spleens from OVA or OVA/FK156 sensitized mice (data not shown). In contrast, kinetics studies showed that CCL17 and CCL22 were produced after in vitro OVA restimulation at higher levels in mediastinal lymph nodes collected 24h than 96h after the last challenge in OVA/FK156 sensitized mice (data not shown). Altogether these results suggest that CCL17- and CCL22- producing cells may leave the LNs after OVA challenges and recirculate to the lungs. These results further support the idea that the mechanism of Th2 amplification by NOD1 agonist differs according to the target tissue. In this context it is of interest that although both NOD1 and NOD2 agonists given systemically are able to favour a splenic Th2 adaptive response (Fritz et al., 2007), only NOD2 but not NOD1 agonist was shown to favour Th2 allergic inflammation when given locally in the lung (Duan et al., 2010). To evaluate the relevance of these findings in humans, NOD1 adjuvant effect was analysed in human MD-DC obtained from both healthy and house dust mite allergic patients. In agreement with previous studies (Fritz et al., 2005), stimulation of MD-DC from healthy subjects by NOD1 agonist alone induced the production of IL-6 and CXCL8, and a small upregulation of the costimulatory molecules CD80 and CD86. The latter were significantly upregulated in allergic patients compared with healthy subjects suggesting that DCs from allergic patients are more reactive to NOD1 stimulation than DCs from healthy subjects. Interestingly, the production of CCL17 and CCL22 was significantly upregulated by NOD1 agonist stimulation in DCs from both groups of subjects with a higher level of CCL22 in allergic patients, and translated into a Th2 profile in T cell cocultures. These results show that nonallergic subjects develop a Th2 polarization profile in response to NOD1 activation, with allergic donors being more sensitive, which may be related to either NOD1 polymorphisms or the allergic genetic background. However, there was no effect of the LPS-free purified major allergen Der p 1, and no synergic effect with NOD1 agonist on DC costimulatory molecule and cytokine expression, and on the T cell polarization profile, whatever the group, suggesting that Der p 1 does not directly activate NOD1. It is of note that the addition of LPS to NOD1 agonist in human DCs did not modify the production of pro Th2 chemokines (data not shown). These results are in contrast with the data obtained in mice, where the effect of NOD1 agonist on the production of pro Th2 chemokines required the presence of the allergen. This difference might be species related, as NOD1 sensing has been shown to differ between mice and humans (Girardin et al., 2005). Altogether, these results identify a novel unrecognized target downstream of NOD1 in human DCs, which is likely to play a key role in orchestrating the

global Th2 response in particular in the development and/or exacerbation of allergic asthma. Extra care has therefore to be taken, when designing a vaccine including either a microbial or/and an adjuvant component containing NOD1 agonist. Altogether, these results stress the importance to address safety issues linked to the development of allergic diseases for vaccine formulations, which may contribute to increase the global burden of allergic asthma.

Materials and methods

Mice

Female C57BL/6 mice (6 weeks of age) were purchased from Charles River (Lyon, France) and housed under specific pathogen-free conditions. *nod1*^{-/-} mice were backcrossed on the C57BL/6 background (Institut Pasteur de Lille). The animals were housed in ventilated cages with absorbent bedding material and were maintained on a 12-hour daylight cycle. Animal experiments were approved by the regional ethical committee. Bone marrow from female C57BL6 *CCL17*^{-/-} mice were kindly provided by Dr Laura Layland at the Institute of Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, Technische Universität München, Munich, Germany.

Experimental model of allergic asthma

Mice (7-10 weeks of age) were sensitized on day 0 and 10 by intraperitoneal (ip) injection of 20 µg crude OVA (Grade V; Sigma-Aldrich) or clean OVA (Worthington) suspended in 200 µL of LPS-free PBS in the presence or the absence of 10 µg of NOD1 agonist FK156. LPS content of crude and clean OVA was 0.16 and 0.04 ng per injection respectively, as assessed by the limulus amoebocyte lysate assay (Lanza). From day 21 to 23 and 28 to 30, mice were intranasally challenged with 100 µg of OVA. Control mice were immunized with 200 µL of PBS alone or 200 µL of PBS containing 10 µg of FK156 and challenged with PBS only. AHR and inflammation were assessed 96h after the last challenge. BAL fluids were recovered and lungs were perfused through the pulmonary artery with 10 mL of PBS containing 0.5 mM EDTA. Lung samples were collected for protein analysis, RNA isolation, histology, and/or flow cytometry analysis.

Bronchoalveolar lavage fluid analysis

A total volume of 1mL of ice-cold PBS was used to gently wash the lungs. Cells from the lavage fluid were recovered by centrifugation at 1200 rpm for 5 min at 4°C. The supernatant was collected and stored at -20°C for cytokine measurement. Cells were then re-suspended in

PBS and a sample was taken for counting the cells. Samples of this re-suspended BAL were also spun onto slides (Shandon cytospin 4; Thermo Fisher) and stained with May Grünwald Giemsa (Diff-Quik®). Cells were identified as macrophages, eosinophils, neutrophils and lymphocytes by standard hematological procedures. For differential cell counts, a minimum of 300 cells was counted per BAL sample.

Measurement of serum antibodies

Blood was drawn from the abdominal vein. Serum was collected by centrifugation (3000 g for 5 min) and stored at -20°C until assay. Levels of total IgE, OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a were measured in collected sera by ELISA as previously described (Biet et al., 2005). For total IgE and OVA-specific IgE, 96-well plates (Corning Incorporated) were coated with purified rat anti-mouse IgE (2 µg/mL, clone R35-72; BD Pharmingen). After blocking and the addition of serum samples, a biotinylated anti-mouse IgE antibody (BD Pharmingen) or house-biotinylated ovalbumin (OVA Sigma, biotin-N-hydroxysuccinimide ester Calbiochem Sigma) was used as detecting reagent for total IgE and OVA-specific IgE respectively. The binding of specific antibodies was detected by addition of streptavidine-horse radish peroxidase (Zymed, Invitrogen,) followed by addition of TMB substrate solution (Sigma Aldrich). For OVA-specific IgG1 and IgG2a, microplates were coated with 100 µg/mL ovalbumin. After incubation with serum dilutions, binding of specific antibodies was detected by addition of Horse Radish Peroxidase-labeled goat anti-IgG1 and anti-IgG2a (Southern Biotechnology). Binding of biotinylated proteins was revealed by addition of TMB substrate solution (Sigma Aldrich). The OVA-specific antibody titers of the samples were related to pooled standards that were generated in the laboratory. Results were expressed as the inverse of the dilution corresponding to 50% of the maximal OD. The IgE concentration was expressed as µg/mL after comparison with murine IgE standard.

Pulmonary histology

For lung histology, the left lobe of the lung from each mouse was fixed in Immunohistofix and embedded in resin using the Immunohistowax processing method according to the manufacturer's indications (Gentaur). Lung sections of 0.5µm were stained with a standard hematoxylin-Eosin stain (HES) and periodic acid-Schiff staining kit (Sigma-Aldrich) to evaluate the peribronchic inflammation and mucopolysaccharide staining respectively.

Measurement of airway responsiveness

Airway responsiveness was assessed using Flexivent® (Scireq®, Montreal, Canada) as previously described (Ple et al., 2010). Briefly, mice were anesthetized, and immediately intubated with an 18-gauge catheter, followed by mechanical ventilation. Mice were exposed to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized methacholine (3-50 mg/mL in PBS) (Sigma-Aldrich) using an ultrasonic nebulizer (Aeroneb, Aerogen). Return to baseline resistance was ensured prior to the administration of the next doses of methacholine. The maximal resistance value measured was taken.

Lung protein extracts and cell preparations

Lung protein extracts were prepared after dispersion of one right lobe with a potter in 1 mL of lysis buffer (PBS with 0.5% nonidet P40 and protease inhibitor cocktail (Roche) at 4°C. After 10 min on ice, the lysates were centrifuged and supernatants were collected for further cytokine and chemokine measurements. Total protein concentrations of lung extracts were measured using a Bradford assay (Biorad). Lung cell preparation for flow cytometry analysis was performed after digestion of lung in an enzymatic solution, containing 2 mL of complete RPMI, type III collagenase (0.5 mg/mL; Serlabo) and DNase I (2IU/mL) (Roche Diagnostics), for 1h at 37°C. Cells were then dissociated in an 18G needle, washed with PBS-10mM EDTA and the erythrocytes were lysed by addition of lysis buffer (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ and 0.5mM EDTA). Cellular debris were eliminated using centrifugation (4000 rpm during 20 min) on Percoll density gradient (D=1,075 g/mL from Amersham Pharmacia Biotech). Cells were collected, filtered on a 100 µm-pore membrane, washed with PBS and re-suspended in PBS with 2% FCS and processed for flow cytometry.

Gene expression analysis

Extracted RNA from lung was reverse-transcribed with the High-Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA (equivalent to 5 ng of total RNA) was amplified using the SYBR Green real-time PCR kit and detected on a Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies). RT-PCR was performed with the forward and reverse primers that were designed using Primer express software, version 1.0 (Applied Biosystems). On completion of the PCR amplification, a DNA melting curve analysis was carried out in order to confirm the presence of a single amplicon. *Actb* was used as an internal reference gene in order to normalize the transcript levels. Relative mRNA levels

($2^{-\Delta\Delta Ct}$) were determined by comparing (a) the PCR cycle thresholds (Ct) for the gene of interest and *Actb* (ΔCt) and (b) ΔCt values for treated and control groups ($\Delta\Delta Ct$).

Adoptive Transfer of Antigen-Pulsed Bone Marrow-Derived DCs

BM-DCs were generated according to a previously published protocol (Ryman et al., 2002). BM cells were grown in culture medium (IMDM, 10% FCS, 50 μ M- β -mercaptoethanol, 2mM glutamine, 100 μ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin supplemented with 1% of supernatant from a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-expressing cell line (J558 GM-CSF). DC were cultured for 14 days at 37°C in 5% CO₂ and given fresh medium and cytokine on days 3, 7 and 10. On day 14, non-adherent cells were harvested, washed and then cells were pulsed overnight with either OVA (50 μ g/mL) (Grade V, Sigma), OVA combined with FK156 (10 μ g/mL), FK156 (10 μ g/mL) or PBS alone. On day 1, cells were washed, resuspended in PBS and transferred intraperitoneally at 1×10^6 cells/200 μ L to each mouse. From day 7 to 9 and 14 to 16 mice were challenged intranasally with 100 μ g of OVA. 96h after the last challenge, mice were sacrificed and analysed.

Patients

Allergic donors included in this study showed high total IgE levels (≥ 150 IU/mL) and specific IgE to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (≥ 3.5 IU/mL). None of the patients were treated with antihistamines, inhaled steroids or specific desensitization. Healthy donors were selected on the basis of no history of asthma, serum total IgE level <100 IU/mL and the absence of house dust mite specific antibodies (<0.35 IU/mL). All donors were included following informed written consent.

Generation of immature DCs and maturation

DCs were generated *in vitro*, from peripheral blood monocytes of volunteers, as previously described (Azzaoui et al., 2011). Briefly, human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll Hypaque density gradient centrifugation (Amersham Pharmacia Biotech). PBMC were incubated with magnetic beads conjugated to monoclonal mouse anti-human CD14 (Miltenyi Biotech) at +4°C for 30 min. After washing, the cells were applied onto a column placed in the magnetic field of a MACS separator (Miltenyi Biotech). CD14⁻ cells were eliminated, and CD14⁺ monocytes were eluted from the column outside the magnetic field. After washing, CD14⁺ cells (10^6 cells/mL) were cultured in complete medium (RPMI 1640 (Gibco), 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco), 2mM L-

glutamine) supplemented with recombinant GM-CSF (Promocell (25 ng/mL) and recombinant IL-4 (Promocell (10 ng/mL)) at 37°C. MD-DC were obtained after 6 days of culture. At this stage, they have the phenotypic and functional characteristics of immature DC, characterized by a high capacity for internalization and low capacity to stimulate T cells. At the end of the six days of culture, cells were harvested, washed, re-suspended in complete medium (10^6 cells/mL) and incubated with various stimuli: Der p 1 (Indoor biotechnologies) (1 µg/mL) and/or synthetic NOD1 agonist FK565 (10 µg/mL). DC stimulation with 1 µg/mL of LPS (InvivoGen) was used as a positive control of DC maturation. After 48h of culture, supernatants were recovered and frozen at -20°C until use. The cells were harvested, washed, and used for co-culture and flow cytometry analysis.

Preparation of purified T cells and DC/T cell cocultures

Allogenic CD4⁺CD45RA⁺ naive T cells were obtained from PBMC of healthy donors as previously described (Chang et al., 2010) by negative selection using naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotech). Stimulated DCs were co-cultured with purified naive T cells at ratio of 1:10. After 5 days of co-culture, supernatants were recovered and frozen at -20°C until use.

Quantification of chemokine and cytokine levels

Murine cytokines (IL4, IL5, IL13, IFN- γ , TSLP, IL-33) and chemokines (CCL17, CCL5, CCL11, CCL22 and IP10) levels in lung protein extracts were assessed using commercial ELISA according to instructions provided by the manufacturers (R&D Systems and e-Biosciences). Human IL-6, IL-8, CCL17, CCL22, IL-10, TGF- β , IL-13, IFN- γ , IL-17A, IL-12p70, and IP10 concentrations were measured by ELISA with DuoSet kit according to the manufacturer's instructions (R&D systems). Human IL-23p19 ELISA kit was from e-Biosciences.

Flow cytometry experiments

Murine cells (1×10^6) were incubated with FcR blocking antibody (anti-mouse CD16/CD32 antibody, clone 93, BD Biosciences) for 10 minutes on ice. For cell surface staining, specific antibodies or corresponding control isotopes were added to the cells and then incubated for 30 min on ice. The following antibodies were used: anti-CD4-PE and anti-CD3-PerCp/Cy5.5 from eBiosciences, anti-CD11c-PE, anti-IAd-FITC, anti-Siglec H-PerCp/Cy5.5 and anti-F4/80-FITC, all from Biolegend, and anti-Cytokeratin-PE from Abcam. For the intracellular

detection of chemokines, cells were fixed and permeabilized using the BD Cytotfix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions, and intracellularly stained with antibodies directed against chemokines (anti-mouse CCL17 and CCL22 antibodies from R&D systems) or goat IgG isotypic control (R&D systems). These antibodies were labeled using Alexa Fluor® 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Stained cells were then washed and fixed with PBS, 1% PFA. For T cells intracellular staining, lung cells were stimulated with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) (50 ng/mL, Sigma) and Ionomycin (1 μ M, Sigma) in the presence of protein secretion inhibitors (brefeldin A) (100 ng/mL) for 4h. Cells were then stained for surface markers and intracellular chemokines. Cell fluorescence was measured by flow cytometry (FACScalibur®, BD Biosciences) and analyzed using the Flow Jo software (BD Biosciences). The gating strategy to identify DC included successively forward and side scatter gating, exclusion of cells with high level of auto-fluorescence and selection of cells positive for CD11c and IAd. Human cells were re-suspended in ice-cold PBS supplemented with 2% FCS and then incubated with fluorescent-labeled conjugated monoclonal antibodies or corresponding isotypes for 30 min at 4°C protected from light. The following mouse anti-human antibodies were used for cytometry analysis: FITC-conjugated anti-CD40, FITC-conjugated anti-CD1a, FITC-conjugated anti-DC-SIGN, APC-conjugated anti-CD86, PE-conjugated anti-HLA-DR, PE-conjugated anti-CD80, all from BD Biosciences, and PE-conjugated anti-ICOS-L (e-Bioscience). Cells were washed and fixed in PBS 1% paraformaldehyde (PFA). Stained cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur®, BD Biosciences).

Statistical analysis:

Statistical analysis was performed using the software Graphpad prism (GraphPad Software). Values of all measurements were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The different groups of mice were compared using nonparametric Mann-Whitney U test. Differences in RL in response to methacholine between groups at individual doses were analyzed by 2-way ANOVA. When statistical significance was observed, differences were subsequently analyzed by using the Bonferroni test. Statistical analyses for cell surface phenotype and production of cytokines were performed using repeated measures analysis of variance (ANOVA) and, when significant, followed by the post Dunnett's Multiple Comparison Test. For the comparison between allergic and non-allergic donors, a student *t*-test was used to analyze the differences. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (fellowship to SAY), Inserm, Santelys and Société Française d'Allergologie.

References

- Alferink, J., I. Lieberam, W. Reindl, A. Behrens, S. Weiss, N. Huser, K. Gerauer, R. Ross, A.B. Reske-Kunz, P. Ahmad-Nejad, H. Wagner, and I. Forster. 2003. Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *J Exp Med.* 197:585-99.
- Azzaoui, I., S.A. Yahia, Y. Chang, H. Vorng, O. Morales, Y. Fan, N. Delhem, C. Ple, A.B. Tonnel, B. Wallaert, and A. Tsicopoulos. CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects. *Blood.* 118:3549-58.
- Biet, F., C. Duez, L. Kremer, P. Marquillies, L. Amniai, A.B. Tonnel, C. Loch, and J. Pestel. 2005. Recombinant Mycobacterium bovis BCG producing IL-18 reduces IL-5 production and bronchoalveolar eosinophilia induced by an allergic reaction. *Allergy.* 60:1065-72.
- Chamaillard, M., S.E. Girardin, J. Viala, and D.J. Philpott. 2003. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.* 5:581-92.
- Chang, Y., P. de Nadai, I. Azzaoui, O. Morales, N. Delhem, H. Vorng, S. Tomavo, S. Ait Yahia, G. Zhang, B. Wallaert, C. Chenivesse, and A. Tsicopoulos. The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB J.* 24:5063-72.
- Duan, W., A.K. Mehta, J.G. Magalhaes, S.F. Ziegler, C. Dong, D.J. Philpott, and M. Croft. Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 126:1284-93 e10.
- Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius. 2006. The asthma epidemic. *N Engl J Med.* 355:2226-35.
- Eisenbarth, S.C., D.A. Piggott, J.W. Huleatt, I. Visintin, C.A. Herrick, and K. Bottomly. 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 196:1645-51.
- Fritz, J.H., S.E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J.M. Cavaillon, D.J. Philpott, and M. Adib-Conquy. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol.* 35:2459-70.
- Fritz, J.H., L. Le Bourhis, G. Sellge, J.G. Magalhaes, H. Fsihi, T.A. Kufer, C. Collins, J. Viala, R.L. Ferrero, S.E. Girardin, and D.J. Philpott. 2007. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity.* 26:445-59.
- Girardin, S.E., I.G. Boneca, L.A. Carneiro, A. Antignac, M. Jehanno, J. Viala, K. Tedin, M.K. Taha, A. Labigne, U. Zahringer, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, J. Bertin, P.J. Sansonetti, and D.J. Philpott. 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 300:1584-7.
- Girardin, S.E., M. Jehanno, D. Mengin-Lecreulx, P.J. Sansonetti, P.M. Alzari, and D.J. Philpott. 2005. Identification of the critical residues involved in peptidoglycan detection by Nod1. *J Biol Chem.* 280:38648-56.
- Henry, C.J., D.A. Ornelles, L.M. Mitchell, K.L. Brzoza-Lewis, and E.M. Hiltbold. 2008. IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol.* 181:8576-84.
- Hirata, H., M. Arima, G. Cheng, K. Honda, F. Fukushima, N. Yoshida, F. Eda, and T. Fukuda. 2003. Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients. *J Clin Immunol.* 23:34-45.

- Hysi, P., M. Kabesch, M.F. Moffatt, M. Schedel, D. Carr, Y. Zhang, B. Boardman, E. von Mutius, S.K. Weiland, W. Leupold, C. Fritzsche, N. Klopp, A.W. Musk, A. James, G. Nunez, N. Inohara, and W.O. Cookson. 2005. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet.* 14:935-41.
- Inohara, N., and G. Nunez. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 3:371-82.
- Inohara, N., Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S.J. Foster, A.P. Moran, J.L. Fernandez-Luna, and G. Nunez. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 278:5509-12.
- Kashyap, M., Y. Rochman, R. Spolski, L. Samsel, and W.J. Leonard. Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol.* 187:1207-11.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad. The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet.* 376:835-43.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad. 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity.* 31:412-24.
- Lambrecht, B.N., R.A. Pauwels, and B. Fazekas De St Groth. 2000. Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol.* 164:2937-46.
- Levitz, S.M., and D.T. Golenbock. Beyond Empiricism: Informing Vaccine Development through Innate Immunity Research. *Cell.* 148:1284-92.
- Magalhaes, J.G., S.J. Rubino, L.H. Travassos, L. Le Bourhis, W. Duan, G. Sellge, K. Geddes, C. Reardon, M. Lechmann, L.A. Carneiro, T. Selvanantham, J.H. Fritz, B.C. Taylor, D. Artis, T.W. Mak, M.R. Comeau, M. Croft, S.E. Girardin, and D.J. Philpott. Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:14896-901.
- Matsubara, S., T. Koya, K. Takeda, A. Joetham, N. Miyahara, P. Pine, E.S. Masuda, C.H. Swasey, and E.W. Gelfand. 2006. Syk activation in dendritic cells is essential for airway hyperresponsiveness and inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 34:426-33.
- Medoff, B.D., E. Seung, S. Hong, S.Y. Thomas, B.P. Sandall, J.S. Duffield, D.A. Kuperman, D.J. Erle, and A.D. Luster. 2009. CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol.* 182:623-35.
- Nakayama, T., K. Hieshima, D. Nagakubo, E. Sato, M. Nakayama, K. Kawa, and O. Yoshie. 2004. Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol.* 78:1665-74.
- Ogura, Y., N. Inohara, A. Benito, F.F. Chen, S. Yamaoka, and G. Nunez. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 276:4812-8.
- Penna, G., M. Vulcano, A. Roncari, F. Facchetti, S. Sozzani, and L. Adorini. 2002. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 169:6673-6.
- Perros, F., H.C. Hoogsteden, A.J. Coyle, B.N. Lambrecht, and H. Hammad. 2009. Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy.* 64:995-1002.
- Piggott, D.A., S.C. Eisenbarth, L. Xu, S.L. Constant, J.W. Huleatt, C.A. Herrick, and K. Bottomly. 2005. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest.* 115:459-67.
- Ple, C., M. Barrier, L. Amniai, P. Marquillies, J. Bertout, A. Tsicopoulos, T. Walzer, P. Lassalle, and C. Duez. Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes

- and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma. *Scand J Immunol.* 72:118-27.
- Ryman, K.D., L.J. White, R.E. Johnston, and W.B. Klimstra. 2002. Effects of PKR/RNase L-dependent and alternative antiviral pathways on alphavirus replication and pathogenesis. *Viral Immunol.* 15:53-76.
- Sekiya, T., M. Miyamasu, M. Imanishi, H. Yamada, T. Nakajima, M. Yamaguchi, T. Fujisawa, R. Pawankar, Y. Sano, K. Ohta, A. Ishii, Y. Morita, K. Yamamoto, K. Matsushima, O. Yoshie, and K. Hirai. 2000. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 165:2205-13.
- Tada, H., S. Aiba, K. Shibata, T. Ohteki, and H. Takada. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun.* 73:7967-76.
- Travassos, L.H., L.A. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y.G. Kim, J.G. Magalhaes, L. Yuan, F. Soares, E. Chea, L. Le Bourhis, I.G. Boneca, A. Allaoui, N.L. Jones, G. Nunez, S.E. Girardin, and D.J. Philpott. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* 11:55-62.
- Weidinger, S., N. Klopp, L. Rummel, S. Wagenpfeil, N. Novak, H.J. Baurecht, W. Groer, U. Darsow, J. Heinrich, A. Gauger, T. Schafer, T. Jakob, H. Behrendt, H.E. Wichmann, J. Ring, and T. Illig. 2005. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol.* 116:177-84.
- Werts, C., L. le Bourhis, J. Liu, J.G. Magalhaes, L.A. Carneiro, J.H. Fritz, S. Stockinger, V. Balloy, M. Chignard, T. Decker, D.J. Philpott, X. Ma, and S.E. Girardin. 2007. Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol.* 37:2499-508.
- Yanagawa, Y., M. Matsumoto, and H. Togashi. Adrenoceptor-mediated enhancement of interleukin-33 production by dendritic cells. *Brain Behav Immun.* 25:1427-33.

Legends to Figures

Figure 1: Effects of FK156 administration during systemic sensitization on OVA induced cardinal features of experimental asthma. A) Experimental design: mice were sensitized at day 0 and 10 by ip injection of 20 µg OVA suspended in 200 µL of PBS in the presence or absence of 10 µg of NOD1 agonist FK156. Mice were intra nasally challenged with 100 µg of OVA from day 21 to 23 and 28 to 30 and sacrificed on day 34. Control mice were immunized with PBS alone or PBS containing 10 µg of FK156 and challenged with PBS only. B) BAL cell counts and humoral responses in mice sensitized/challenged as follows: PBS/PBS: □ , OVA/OVA: ■; FK156/PBS: □ OVA+FK156/OVA: ■. a) Cell counts in BAL fluids in the four groups of WT mice; b) Levels of total IgE antibody and OVA specific IgE (titer) and anti- OVA IgG1 antibodies (titer x10⁶) in WT mice; c) Cell counts in BAL fluids and total IgE antibodies in NOD1^{-/-} mice; d) BAL cell counts and total IgE response in WT mice where OVA-clean has been used. Data are expressed as mean ± SEM (n=12-16 per group for a and b, n=8 for c, and n=5-6 for d). Results are from 2-3 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 versus control mice treated with either PBS or FK156. #p<0.05, ##p<0.01 for OVA+FK156/OVA versus OVA/OVA treated mice. C) Representative microphotographs of periodic acid Schiff- (PAS) and hematoxylin and eosin- (HES) stained lung sections (magnification x312.5) in the different groups of WT mice. D) Lung function of WT mice, as determined by measurement of lung resistance (R) by invasive methods. Results are expressed as percentage of R increase above PBS and presented as mean ± SEM (n=5-10 from two independent experiments). *p<0.05, **p<0.01 versus PBS alone, # p<0.05 versus mice treated with OVA.

Figure 2: Effects of FK156 administration during systemic sensitization on lung cytokine production and mRNA expression in OVA- induced experimental asthma in WT mice sensitized/challenged as follows: PBS/PBS: □ , OVA/OVA: ■ , FK156/PBS: □ , OVA+FK156/OVA: ■ A) Cytokine levels in protein extracts of lung tissue were determined by ELISA. B) Cytokine mRNA fold relative gene expression was determined by quantitative RT-PCR. Data are expressed as mean ± SEM (n=8-10) in each group. Results are from 2 independent experiments. *p<0.05 versus control mice treated either with PBS or FK156. #p<0.05, ##p<0.01 for OVA+FK156/OVA versus OVA/OVA treated mice.

Figure 3: Effects of FK156 administration during systemic sensitization on lung chemokine production and mRNA expression in OVA- induced experimental asthma in WT mice sensitized/challenged as follows: PBS/PBS: □, OVA/OVA: ■, FK156/PBS: □, OVA+FK156/OVA: ■. A) Chemokine level in protein extracts of lung tissue was evaluated by ELISA. B) Chemokine mRNA fold relative gene expression was determined by quantitative RT-PCR. Data are expressed as mean ± SEM (n=8-10) in each group. Results are from 2 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01 versus control mice treated either with PBS or FK156. #p<0.05 for OVA+FK156/OVA versus OVA/OVA treated mice.

Figure 4: CCL17 and CCL22 production by lung cells from WT mice sensitized/challenged as follows: PBS/PBS: □, OVA/OVA: ■ ; FK156/PBS: □, OVA+FK156/OVA: ■. Four days after the last challenge, cells were purified from the lung and stained with antibodies to identify helper T cells (CD4⁺), DCs (CD11c⁺MHC⁺), macrophages (F4/80⁺) and epithelial cells (cytokeratin⁺) followed by intracellular staining with anti-chemokine or with control antibody, and analysed by flow cytometry. A) Numbers of double positive cells for CCL17 and CCL22 for each cell type in the four groups of mice (n=6 mice per group from two independent experiments). B) Representative flow cytometry staining of CD4⁺ T cells for CCL17 and CCL22 in the four groups of mice.

Figure 5: Transfer of FK156-pulsed DCs recapitulates exacerbation of OVA-induced asthma in WT mice. BM-DCs were pulsed in vitro with PBS alone: □, PBS + FK156 (10 µg/mL): □, OVA(50 µg/mL) : ■ or OVA in the presence of FK156 : ■ for 16h. DCs were then washed and transferred intraperitoneally on day 1 (1 x 10⁶ cells) into naïve WT mice. Mice were challenged with OVA from day 7 to 9 and 14 to 16. Four days after the last challenge, mice were killed and BAL and plasma were collected. A) BAL fluid cell counts. B) Levels of total IgE, OVA-specific IgE (titer) and IgG1 antibodies (titer x10⁶) were measured by ELISA. C) Protein and mRNA expression of chemokine and cytokines. Data are expressed as mean ± SEM (n=6 in each group). *p<0.05, **p<0.01 versus control mice treated either with PBS or FK156. #p<0.05, ##p<0.01 for OVA+FK156/OVA versus OVA/OVA treated mice.

Figure 6: Role of DC-derived CCL17 in NOD1-induced exacerbation of asthma in WT mice. BM-DCs from WT mice or *ccl17*^{-/-} mice were pulsed in vitro with PBS alone: □, OVA (50µg/mL) : ■ or OVA in the presence of FK156 : ■ for 16h. A) In vitro production of

CCL17 and CCL22 by pulsed BM-DC from WT mice. Cell supernatants were recovered and analysed by ELISA. Results are expressed as mean \pm SEM (n=6 in each group). *p<0.05 versus control BM-DC treated with PBS. #p<0.05 for OVA+FK156/OVA versus OVA/OVA BM-DC. B) DCs from *ccl17*^{-/-} mice were washed and transferred intraperitoneally on day 1 (1 x 10⁶ cells) into naïve WT mice. Mice were challenged with OVA from day 7 to 9 and 14 to 16. Four days after the last challenge, mice were killed and BAL and plasma were collected. A) BAL fluid cell counts. B) Levels of total IgE, OVA-specific IgE (titer) and IgG1 antibodies (titer x10⁶) were measured by ELISA. C) Protein and mRNA expression of chemokine and cytokines. Data are expressed as mean \pm SEM (n=4-5 in each group). *p<0.05, **p<0.01 versus control mice treated with PBS.

Figure 7: Phenotype of human MD-DCs matured with or without NOD1 agonist. Immature MD-DCs from allergic and nonallergic donors were cultured for 48h with medium, Der p 1 (1 μ g/mL), synthetic NOD1 agonist FK565 (10 μ g/mL) or FK565+Der p 1 or LPS (1 μ g/mL) as positive control. DC were stained with antibodies against CD80, CD86, ICOSL and DC-SIGN or with matched isotype antibodies and analyzed by flow cytometry. (A) Mean Fluorescence Intensity (MFI) of DC surface markers in allergic versus nonallergic subjects. Data are expressed as MFI \pm SEM for n=7-10 subjects. *p<0.05, **p<0.01 versus medium; #p<0.05, ##p<0.01 DCs from allergic versus non allergic subjects. (B) Representative histograms of surface marker staining on DC from one allergic and one nonallergic subjects are shown. Values in the quadrant indicate the mean fluorescence intensity after subtraction of the isotype control.

Figure 8: Effect of FK565 on the induction of cytokines and chemokines in mature differentiated DCs. DCs from allergic and nonallergic donors were cultured for 48h with medium, Der p 1, synthetic NOD1 agonist FK565 or FK565 combined to Der p 1, or LPS. (A) The amounts of cytokines IL-10, TGF- β 1, IL-6 and (B) chemokines CXCL8, CCL17, CCL22 and CXCL10 in the culture supernatants was quantified by ELISA. Data are expressed as mean \pm SEM for n=10-14 non allergic and n=8-12 allergic subjects. *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001 versus medium alone, #p<0.05 allergic versus non allergic subjects.

Figure 9: FK565-stimulated DCs from allergic and nonallergic subjects direct the Th cell response towards a Th2 profile. DCs activated with Der p 1, FK565, FK565 combined to Der p 1 or LPS were cultured with naïve CD4 T cells for five days. Production of IL-10, IFN- γ ,

IL-17A and IL-13 in DC/T cell co-culture supernatants was analysed by ELISA. Data are presented as ng/mL \pm SEM for n=8 non allergic and n=7 allergic subjects. *p<0.05, **p<0.01 versus medium alone, [#] p<0.05 allergic versus nonallergic subjects.

Figure 1

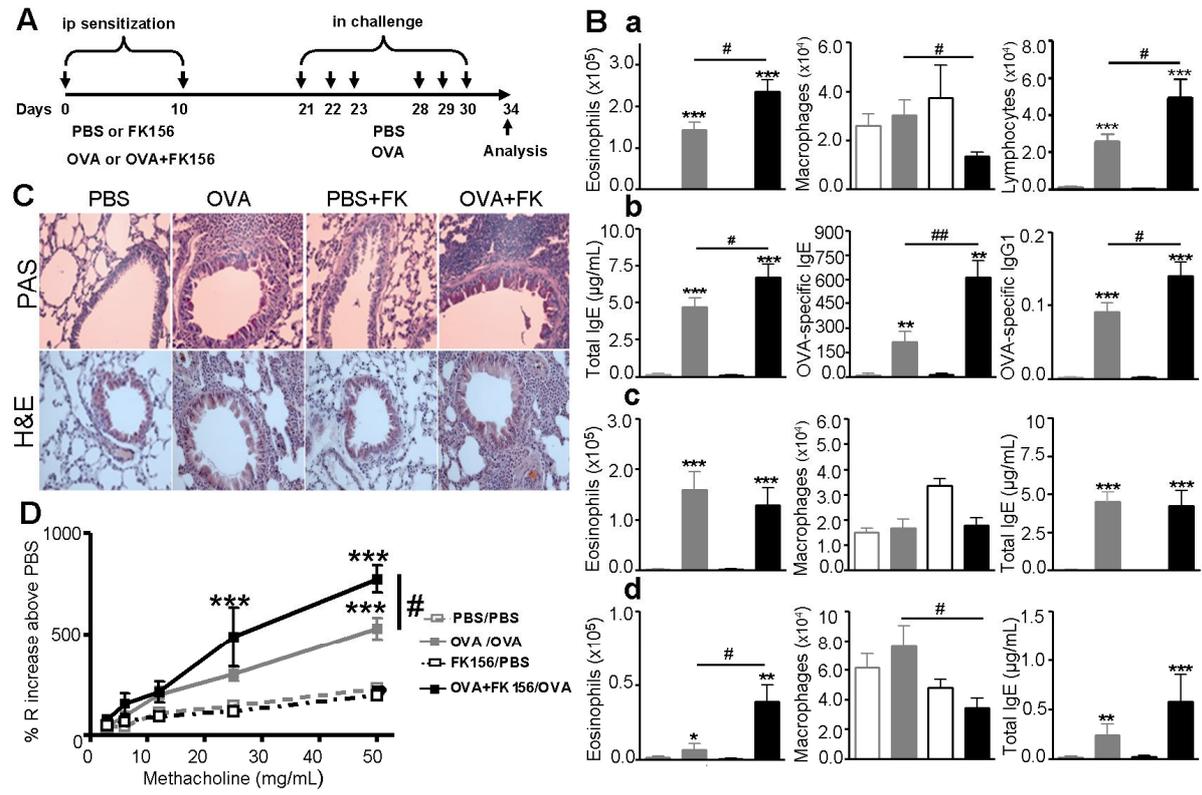


Figure 2

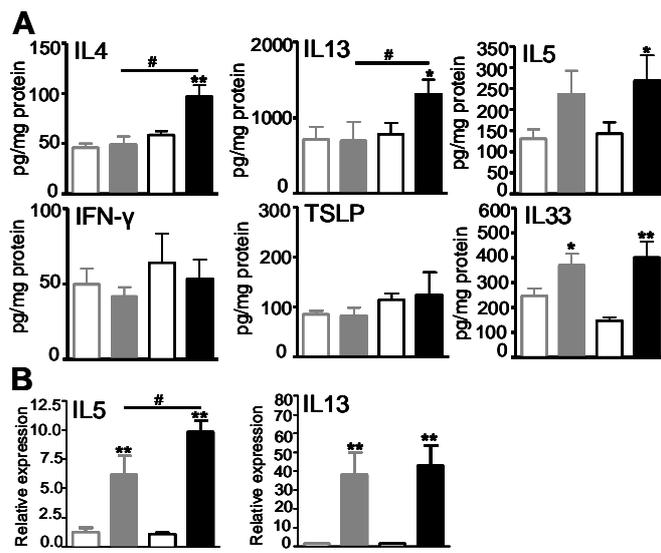


Figure 3

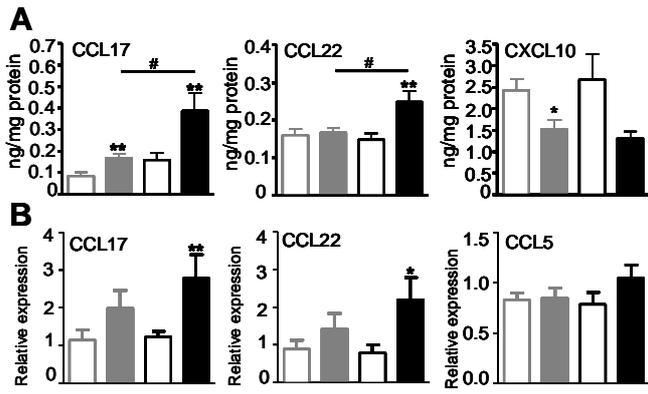


Figure 4

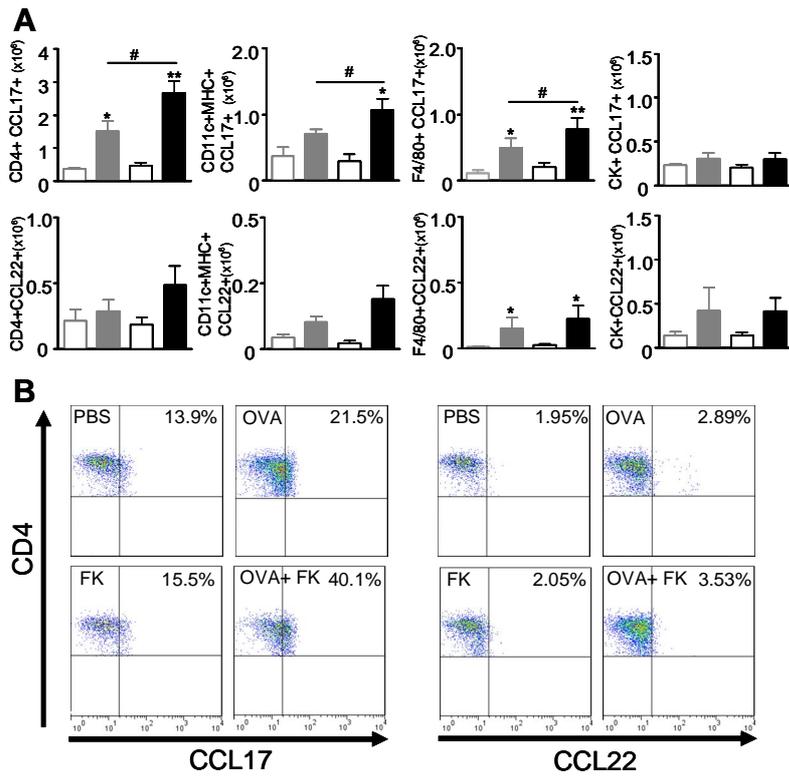


Figure 5

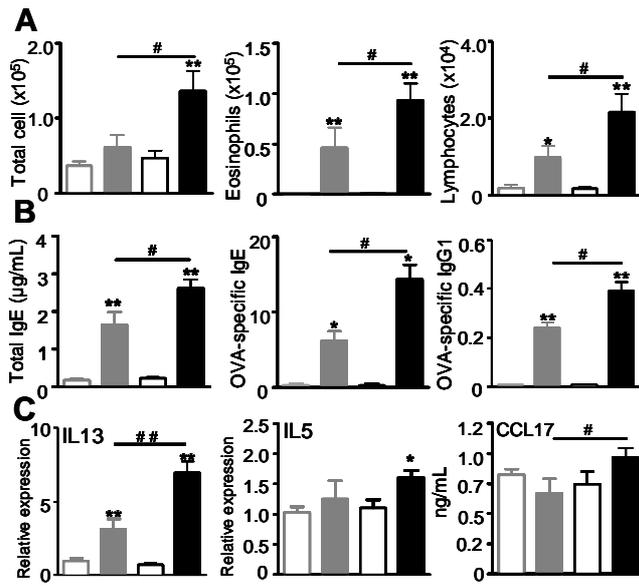


Figure 6

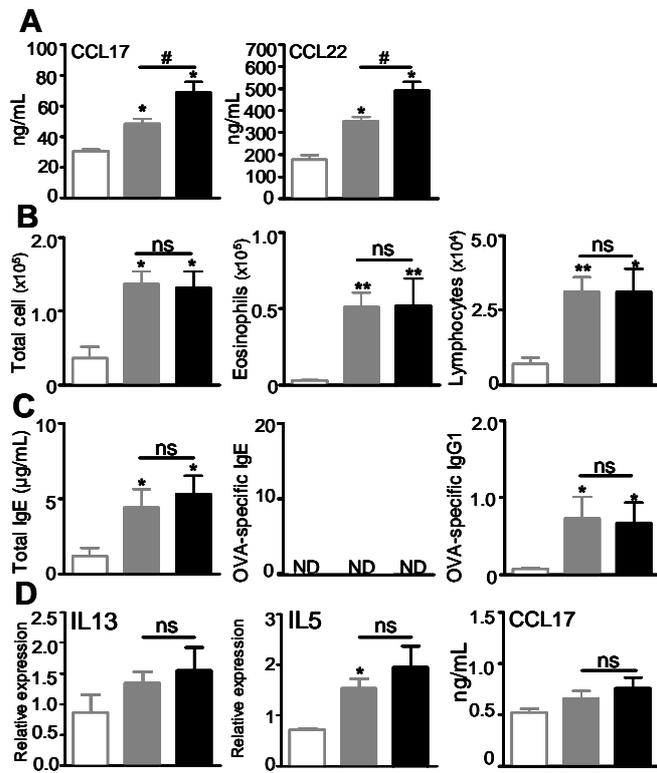


Figure 7

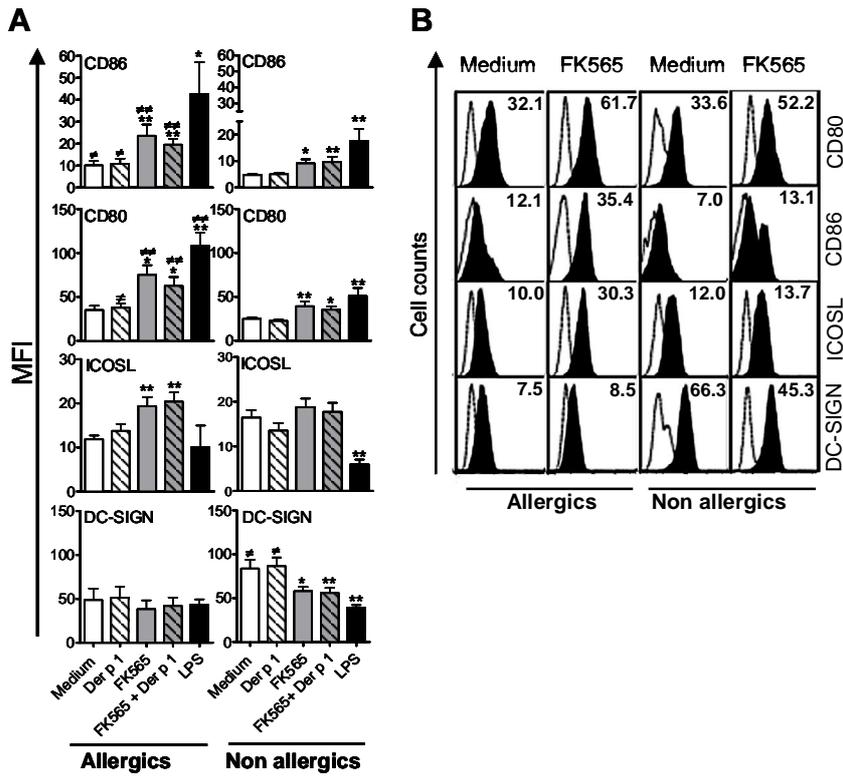


Figure 8

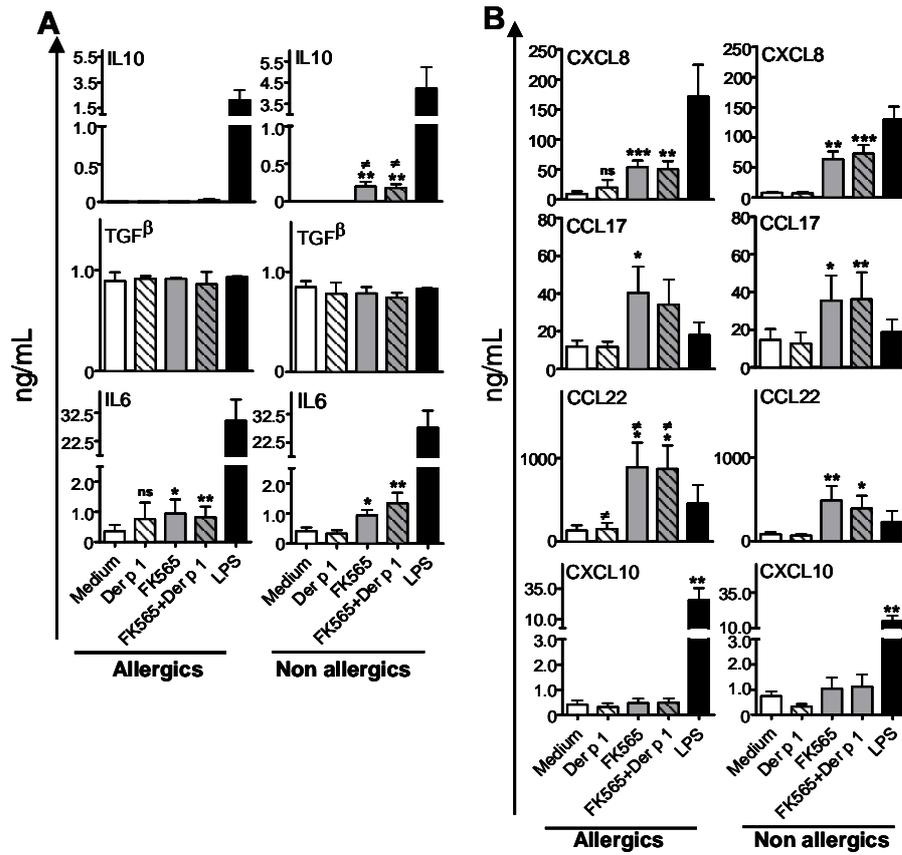
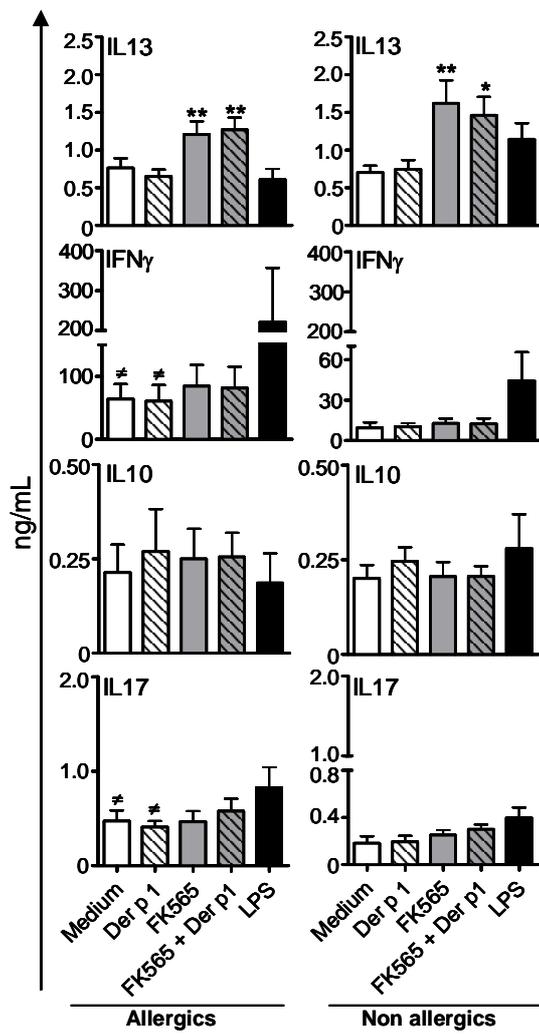


Figure 9



Article II

CCL18 différencie les cellules dendritiques en cellules régulatrices capables de promouvoir des cellules T régulatrices chez les sujets sains

Imane Azzaoui*, **Saliha Ait Yahia***, Ying Chang, Han Vorng, Olivier Morales, Ying Fan, Nadira Delhem, Coline Plé, André-Bernard Tonnel, Benoît Wallaert, and Anne Tsicopoulos.

Blood. 2011 Sep 29;118(13):3549-58. * contribution égale

Problématique et approche expérimentale

Outre leur fonction chimiotactique, les chimiokines sont impliqués dans différents phénomènes cellulaires et tissulaires comme l'apoptose, la prolifération, l'angiogénèse etc... Certaines chimiokines ont même été impliquées dans la polarisation de la réponse adaptative spécifique indirectement via les DC. CCL18 étant produit et attirant les DC, nous avons évalué son effet sur la fonctionnalité de ces cellules en fonction du statut allergique des donneurs.

Résultats de l'article

La différenciation de monocytes de sujets sains, en présence de GM-CSF et CCL18, conduit au développement de DC de phénotype semi-mature qui expriment le CCR7, produisent de l'IL-10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygénase et induisent le développement de Lc T régulateurs de type Tr1 produisant de l'IL-10 capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs, par un mécanisme dépendant de cytokine. Lorsque les monocytes proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu en liaison avec une diminution de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif.

Conclusion

Cette étude montre que le CCL18 induit, chez les sujets non allergiques, une réponse adaptative régulatrice par le biais des DCs. Ce qui suggère un rôle dans le maintien d'une tolérance vis-à-vis des allergènes inhalés au niveau pulmonaire où le CCL18 est constitutivement exprimé, rôle perdu chez les sujets allergiques ce qui pourrait aggraver l'inflammation pulmonaire chez ces patients.

Article III

La chimiokine CCL18 génère des lymphocytes T régulateurs adaptatifs à partir de lymphocytes T CD4⁺ mémoires de sujets sains mais pas chez les allergiques

Ying Chang, Patricia de Nadai, Imane Azzaoui, Olivier Morales, Nadira Delhem, Han Vorng, Stanislas Tomavo, **Saliha Ait Yahia**, Guizhen Zhang, Benoît Wallaert, Cécile Chenivresse, and Anne Tsicopoulos.

The FASEB Journal, 2010 Dec; 24(12):5063-72.

Problématique et approche expérimentale

Les chimiokines sont un élément essentiel du trafic cellulaire aussi bien homéostatique que dans des situations pathologiques. Outre cette fonction chimiotactique spécifique à ce type de molécules, on leur a récemment attribué une implication dans le profil de polarisation de la réponse adaptative spécifique, en agissant directement sur les lymphocytes T (Lc T). CCL18 est une chimiokine, exprimée préférentiellement au niveau pulmonaire et de façon moindre au niveau ganglionnaire, capable d'attirer les Lc T. Au laboratoire il a été montré une implication de CCL18 dans l'asthme allergique, et cette chimiokine a été associée à différentes pathologies à tropisme pulmonaire ou non avec un rôle pas toujours très clair. L'objectif de ce travail a été d'étudier l'effet immunitaire de CCL18 sur les LcT mémoires, en base et en situation allergique.

Résultats de l'article

L'effet direct du CCL18 a été évalué sur la polarisation de la réponse T. Le prétraitement de Lc T mémoires effecteurs CD4⁺CD25⁻ de sujets non allergiques avec le CCL18 conduit à leur transformation en Lc T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ produisant de l'IL-10 et du TGF-β capables d'inhiber la prolifération des Lc T effecteurs radiomarqués, à la fois par un mécanisme dépendant des cytokines et par contact cellulaire. Cependant, cet effet régulateur du CCL18 est perdu lorsque les cellules T proviennent de sujets allergiques en liaison avec une diminution de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif sur ces cellules.

Conclusions

Cette étude montre que le CCL18 est capable d'induire la transformation de Lc T mémoires en cellules régulatrices adaptatives et donc confirme la plasticité cellulaire du système immunitaire adaptatif. De plus, l'absence de cet effet chez les allergiques pourrait participer à la diminution de la tolérance observée dans les maladies allergiques.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Effets de l'activation du récepteur NOD1 sur l'asthme allergique

Certains virus ou bactéries sont considérés comme agents déclenchant ou exacerbateurs de l'asthme alors que d'autres pathogènes ont un effet protecteur [26], [624]. Il est très difficile d'examiner les réponses induites par un pathogène entier compte tenu de la variété des molécules exprimées et de la diversité des réponses immunitaires de l'hôte. Pour cela nous avons choisi d'utiliser des agonistes de NOD1 qui sont des molécules synthétiques mimant certaines des réponses de pathogènes. Nous avons évalué *in vivo* l'effet de l'administration de l'agoniste de NOD1 (FK156) comme adjuvant au moment de la sensibilisation, à moduler la réponse immunitaire dans un modèle expérimental d'asthme allergique (Article I). Nous avons utilisé un protocole dans lequel toutes les souris sont d'abord immunisées de façon systémique par l'antigène protéique (OVA) seul ou combiné avec l'agoniste de NOD1, puis challengé par voie aérienne avec l'antigène OVA. Ce protocole induit les principaux symptômes de l'asthme. Nous avons observé que l'administration de l'agoniste de NOD1 (FK156) comme adjuvant, effectuée simultanément à l'immunisation par l'OVA en i.p, accroît la sévérité de l'asthme allergique en augmentant l'inflammation pulmonaire de type Th2 et l'HRB. Cette inflammation est accompagnée d'une induction significative des cytokines pro Th2 et des chimiokines pro Th2 (CCL17 et CCL22) au niveau des poumons. Ces résultats montrent que l'agoniste de NOD1 se comporte comme un excellent adjuvant de la réponse Th2 pulmonaire *in vivo*. Comme les cellules Th2 dans le poumon et les voies aériennes ne prolifèrent pas de façon intensive en réponse à l'antigène [625], l'augmentation du nombre de lymphocytes, de même que celui des éosinophiles, dépendent plus du recrutement cellulaire. Dans notre modèle, l'amplification de l'inflammation allergique en réponse à l'agoniste de NOD1, pourrait être liée à la production des chimiokines CCL17 et CCL22 qui augmentent le recrutement des cellules Th2 vers les voies aériennes.

En parallèle au travail *in vivo*, nous avons analysé *in vitro*, la capacité de l'agoniste de NOD1 (FK565) à moduler la polarisation de la réponse immune dépendante des cellules dendritiques de sujets asthmatiques allergiques versus non allergiques. Les résultats ont montré que la stimulation des cellules dendritiques par l'agoniste de NOD1 induit leur maturation et la sécrétion des chimiokines pro Th-2 (CCL22 et CCL17) par ces cellules. Les DCs pulsées avec le FK565 favorisent la polarisation des cellules T vers un profil Th2 indépendamment d'une costimulation antigénique et du statut allergique. Dans l'ensemble, au

vu de ces résultats, nous pouvons conclure que l'activation du récepteur NOD1 induit une réponse Th2 chez l'homme et la souris. Cependant une différence de taille est constatée entre l'étude *in vivo* et celle *in vitro*. Chez la souris, l'effet de l'agoniste de NOD1 est dépendant d'une co-stimulation antigénique alors que chez l'homme l'effet observé est indépendant de toute autre co-stimulation. La co-stimulation des MD-DC par l'agoniste de NOD1 combiné avec Der p1 ou LPS n'a aucun effet additionnel sur la production des chimiokines pro Th2 CCL17 et CCL22 ni de conséquence sur la polarisation des lymphocytes T. La différence observée peut être expliquée par l'utilisation de deux agonistes structurellement différents, mais aussi par l'origine de la cellule cible qui n'est pas la même. Chez la souris nous avons démontré que l'effet amplificateur de l'inflammation pulmonaire de type Th2 n'était pas dépendant du LPS présent dans l'OVA, vu que la réponse est qualitativement similaire en présence ou en absence de LPS. Néanmoins, l'amplitude de la réponse est plus importante en présence de LPS. Nos résultats ne sont pas en accord avec les travaux de Fritz et al, montrant un effet de synergie entre les ligands de TLR et NOD1 pour l'induction des réponses immunes systémiques de type Th1 et Th17 mais pas de type Th2 [599]. Cette divergence peut être expliquée par la différence de quantité de LPS présent au moment de la sensibilisation et le protocole utilisé. Nos observations sont, par contre, en accord avec l'étude sur le TLR4 [626] montrant que la présence de LPS n'était pas nécessaire pour l'induction de la réaction allergique au niveau du poumon lors d'une sensibilisation par voie intrapéritonéale. Il ne peut être exclu que les NOD et les TLR coopèrent pour combattre les pathogènes en induisant la réponse immune adaptée. Cependant, l'influence exacte de chaque récepteur sur l'autre dans la réaction allergique reste inconnue.

L'implication des DCs dans l'amplification de la réponse Th2 induite par l'agoniste de NOD1 dans notre modèle d'asthme allergique

Au regard des résultats obtenus, *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez la souris, qui sont similaires en ce qui concerne l'induction des chimiokines pro Th2 (CCL17 et CCL22) par l'agoniste de NOD1, il était essentiel d'identifier les cellules productrices de CCL17 et de CCL22 chez la souris. Nous avons regardé au niveau du poumon quel type cellulaire est impliqué dans la libération de ces chimiokines. Les résultats ont montré que les sources de CCL17 sont multiples (les cellules dendritiques, les lymphocytes T et les macrophages) alors que CCL22 semble être produite essentiellement par les macrophages. Une augmentation importante en pourcentage des cellules CD4⁺ CCL17⁺ a été observée après la sensibilisation par OVA+FK156, suggérant qu'en plus du recrutement accru des cellules, une activation

spécifique des cellules T se soit produit par des cellules systémiquement activées par l'agoniste de NOD1. Compte tenu du rôle des cellules dendritiques nous avons postulé que ces cellules pourraient participer à la régulation et/ou au développement de la réponse Th2 induite par l'agoniste de NOD1.

Pour vérifier si l'amplification de la réponse Th2 induite par l'agoniste de NOD1 dans notre modèle d'asthme allergique passe bien par une action de l'agoniste de NOD1 au niveau des cellules dendritiques, nous avons effectué le transfert adoptif de DCs stimulées (OVA-DC ou OVA/FK156-DC) par voie intrapéritonéale pour immuniser des souris sauvages. Ce transfert a été suffisant pour restaurer l'inflammation éosinophilique, la production d'IgE spécifiques de l'OVA et la production de cytokines et de chimiokine pro Th2 particulièrement le CCL17. Cette inflammation est encore plus importante chez les souris sensibilisées avec des DCs stimulées avec de l'OVA plus FK156. Nos résultats montrent clairement que l'injection de DCs activées par voie intra péritonéale induit une inflammation pulmonaire de type Th2. Ainsi nos résultats soutiennent le concept décrivant les DCs comme essentielles pour l'induction de l'asthme allergique [627]. Toutefois, l'importance des DCs dans l'induction d'une réponse Th2, suite à l'activation de NOD1, est mise en doute par d'autres groupes [599], [601]. Une étude récente a démontré que la réponse Th2 systémique induite suite à l'activation de NOD1, est dépendante des cellules stromales qui produisent le TSLP. Dans cette étude il a été montré que la détection de ligand de NOD1 par la DC n'est pas suffisante pour induire une réponse Th2 au niveau de la rate, néanmoins, la DC contribue à cette réponse. Au regard des résultats de cette étude et de la nôtre, nous suggérons que l'activation des DCs, par l'agoniste de NOD1 plus OVA, par voie intrapéritonéale contribue majoritairement à l'induction de la réponse Th2 au niveau du poumon mais pas au niveau de la rate. D'ailleurs, la voie intrapéritonéale constitue la voie classique pour l'immunisation dans les modèles d'asthme ou d'inflammation des voies respiratoires pour induire une réponse Th2 robuste, malgré qu'elle ne reproduit pas fidèlement le profil rencontré chez l'humain, qui est plutôt sensibilisé à des allergènes inhalés.

On peut imaginer que l'agoniste de NOD1 utilisé comme adjuvant, empruntant la voie systémique, c'est-à-dire intrapéritonéale, suit le même chemin que l'Alum qui est l'adjuvant le plus utilisé dans les modèles d'asthme. Il a été proposé qu'à l'état de base, les antigènes de la cavité péritonéale atteignent passivement les ganglions médiastinaux rapidement (<2 heures) après leur injection en passant à travers les stomates du diaphragme, des canaux qui connectent la cavité péritonéale au réseau lymphatique. Une fois les antigènes dans les ganglions, la présentation antigénique se fait par les DCs immatures résidentes, de manière à

induire une réponse tolérogénique [628], [629]. En conditions inflammatoires, lorsque l'adjuvant Alum est combiné à l'antigène, des monocytes et DCs inflammatoires sont recrutés au site d'injection. De plus, les DCs résidentes du péritoine sont activées par un signal de danger interne déclenché par l'adjuvant. Les antigènes sont captés par ces cellules présentatrices d'antigènes, qui migrent vers les ganglions médiastinaux. Les monocytes inflammatoires se différencient en DCs matures capables de stimuler les cellules T de manière à générer des cellules T effectrices et mémoires. La voie intrapéritonéale induit, pour ainsi dire, spécifiquement une réponse au niveau des voies respiratoires [629].

Etant donné que nous avons montré que l'injection par voie systémique de l'agoniste de NOD1 ou de DC activée permet d'induire une réponse au niveau des poumons, ceci nous permet de spéculer quant aux événements pouvant déclencher l'initiation de l'asthme et des maladies inflammatoires pulmonaires. Ces données laissent à penser que d'une part, certaines infections (l'infection sanguine due à certains parasites et à leurs œufs) ou maladies, au cours desquelles des DCs sont activées ailleurs dans l'organisme, pourraient avoir des conséquences indésirables au niveau des poumons. D'autre part, on pourrait imaginer que lors d'une vaccination le récepteur NOD1 pourrait être activé par des composants bactériens présents dans le vaccin, et ainsi amplifier la réponse Th2. Certains vaccins comme *Bordetella pertussis* ont été soupçonnés de favoriser l'apparition de l'asthme [630], [631]. Il est important de noter que Magalhaes et al, ont montré que la toxine tracheale libérée par *Bordetella pertussis* peut activer le récepteur NOD1 [632].

Sachant que les DCs sont les principales cibles cellulaires des nouveaux vaccins, nos résultats identifient NOD1 comme une nouvelle cible au niveau des DCs, susceptible de jouer un rôle important dans la modulation de la réponse immune. Il serait donc primordial de tenir compte de la présence des ligands de NOD1 lors de la formulation des vaccins, afin d'éviter des réponses inattendues.

La chimiokine CCL17 acteur principal dans l'amplification de la réponse Th2 pulmonaire

Dans le but de déterminer les médiateurs nécessaires à l'induction de la réponse Th2 au niveau du poumon suite à l'activation de NOD1 et de préciser le rôle des DCs, nous avons effectué une étude *in vitro* pour évaluer l'effet de l'agoniste de NOD1 sur les DCs dérivées de la moelle osseuse de souris sauvages. Nous avons observé que l'agoniste de NOD1, combiné avec l'OVA, induit la production de CCL17 et de CCL22, mais aucune production de TSLP par les DCs. Il est important de signaler que le TSLP n'est pas augmenté au niveau des

poumons de souris sensibilisées avec de l'OVA+FK156. Le TSLP a été décrit comme jouant un rôle important dans la polarisation de la réponse Th2 au niveau de la rate, mais d'après nos résultats, il ne semble pas être impliqué dans l'induction de la réponse Th2 au niveau du poumon. Par contre, la chimiokine CCL17 est requise pour amplifier les composantes de l'asthme allergique expérimental induite par OVA+FK156, comme le démontre l'absence d'effet exacerbateur de l'asthme après le transfert adoptif des DC CCL17^{-/-}. Dans l'asthme allergique, l'importance de la production de CCL17 par la DC dans la polarisation Th2 a été précédemment soulignée par des expériences de reconstitution et de déplétion [633], mais aussi dans un modèle murin humanisé d'asthme [384]. La production de CCL17 et de CCL22 par les DCs, pendant le processus de sensibilisation, pourrait augmenter la durée d'interaction entre les lymphocytes T CD4⁺ exprimant le CCR4 et les DCs stimulées via NOD1, renforçant ainsi la production de cytokines par les cellules T activées. Un tel mécanisme a été déjà décrit pour les DCs stimulés par *Listeria* qui, par leur production de CCL17 et de CCL1, peuvent augmenter la production de cytokines par des cellules CD8⁺ [634]. D'ailleurs, il a été montré que les DCs produisant CCL17 sont de meilleurs stimulateurs de la prolifération des cellules T CD4⁺ que les DCs déficientes en CCL17 [635]. Alferinck et al, ont montré que les DCs de la rate n'expriment pas le CCL17, contrairement aux DCs périphériques, ce qui peut expliquer la différence des mécanismes observés entre notre étude et l'étude de Magalhaes.

En conclusion, nos résultats montrent que l'agoniste de NOD1 se comporte comme un excellent adjuvant de la réponse Th2 pulmonaire *in vivo*, qui passe essentiellement par le biais d'une production de CCL17 par la cellule dendritique.

Comme *in vivo* et *in vitro* l'acteur principal qui favorise le développement du profil Th2 est le CCL17 et pour compléter les manipulations *in vitro* chez l'homme, il serait intéressant de démontrer l'implication de CCL17 dans la polarisation de la réponse immune vers un profil Th2 chez l'homme. Ceci pourrait être réalisé en utilisant des anticorps neutralisant de CCL17, des inhibiteurs du récepteur CCR4 ou des siARN pour CCL17. Il est important de regarder si on pourrait réorienter le profil des lymphocytes Th2 vers un profil Th1, au moins *in vitro*, en activant d'autres PRR comme les TLR. D'ailleurs, de nombreux microorganismes, composés microbiens ou même des composés synthétiques capables d'interagir avec les récepteurs TLRs, induisent une réponse Th1 [468], [636].

Vu que certaines infections bactériennes peuvent aggraver l'asthme, il serait également intéressant d'évaluer l'implication du récepteur NOD1 dans un modèle d'infection par voie aérienne.

Quelle fonction attribuer au CCL18 dans l'orchestration de la réponse immune?

Il a été montré au laboratoire et par d'autres équipes une augmentation du CCL18 dans les maladies allergiques, notamment l'asthme et la dermatite atopique [448], [449], [637], ce qui suggère que le CCL18 puisse être un acteur majeur de la réaction allergique. Dans notre deuxième étude nous avons évalué l'effet indirect de CCL18 sur la polarisation de la réponse T via la DC (Article II). La différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-CSF et CCL18 conduit au développement de DC de phénotype semi-mature, exprimant le CCR7 et produisant la cytokine immunorégulatrice IL-10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygénase. Ces DCs, en coculture avec les Lc T naïfs allogéniques de sujets non allergiques, induisent le développement de Lc T régulateurs de type Tr1 capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs par un mécanisme dépendant des cytokines. Dans un autre travail (Article III), nous avons observé aussi que le traitement des LcT mémoires effecteurs CD4⁺CD25⁻ avec le CCL18 conduit à leur transformation en LcT régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Les cellules générées produisant de l'IL-10 et du TGF-β sont capables d'inhiber la prolifération des LcT effecteurs CD4⁺CD25⁻ par un mécanisme dépendant à la fois des cytokines et d'un contact cellulaire. Dans les deux études nous avons observé que lorsque les monocytes et LcT mémoire proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu probablement suite à la diminution observée de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif. Nous avons montré dans notre laboratoire qu'un traitement, avec de faibles concentrations (10⁻¹⁰M) et pendant un temps court (2h30), des Lc T mémoires avec du CCL18 était suffisant pour générer des Lc T régulateurs fonctionnels. Le CCL18 est exprimé fortement dans les poumons et de façon moindre dans les organes lymphoïdes secondaires [425], par conséquent, il est probable qu'*in vivo* un passage rapide dans les organes lymphoïdes et des doses minimales de CCL18 soient suffisantes. Par contre, la différenciation des DCs régulatrices a nécessité de grandes concentrations de CCL18 (10⁻⁷M) et un traitement long (5 jours). Ces concentrations élevées peuvent être atteintes dans les poumons [425], où CCL18 est exprimée de façon constitutive. Ainsi, il a été montré que les macrophages alvéolaires produisent des niveaux élevés de CCL18 [337]. Le monocyte est une cellule sanguine immature de la famille des leucocytes, qui provient de la moelle osseuse. Ces cellules se différencient dans les tissus où elles résident, et sont ainsi à l'origine des macrophages et des DCs. On peut imaginer que les monocytes recrutés dans le poumon baignent dans un environnement riche en GM-CSF produit par les cellules épithéliales bronchiques et en CCL18 secrété par les macrophages alvéolaires. Ainsi stimulés, ils se différencieraient en DCs semi matures, exprimant les molécules de costimulation et de CMH

de classe II à des niveaux intermédiaires. Ces DCs semi-matures qui expriment aussi le CCR7 sont potentiellement capables de passer des épithélia vers les organes lymphoïdes. La présence de ce genre de DCs dans les organes lymphoïdes en contact avec les Lc T naïfs conduirait à une réponse régulatrice. De plus, ces DCs produisent de l'IL-10 et expriment l'IDO. Cette enzyme est impliquée dans le catabolisme oxydatif du tryptophane et joue un rôle essentiel dans la régulation des Lc T. Les modifications biochimiques dues au catabolisme du tryptophane ont des effets profonds sur la prolifération, la différenciation, les fonctions effectrices et la viabilité des Lc T [638], [639].

Nos études sur le CCL18 montrent un effet immunobiologique régulateur d'une chimiokine, un concept très nouveau dans l'étude de ces molécules. Très récemment une autre chimiokine, XCL1, a été impliquée dans le développement de Lc T régulateurs par les DCs thymiques. Celles-ci expriment le récepteur XCR1, tandis que les cellules épithéliales thymiques médullaires expriment son ligand XCL1. Les souris déficientes en XCL1 présentent un défaut d'accumulation de DCs et de génération de cellules T régulatrices naturelles dans le thymus [640]. Un rôle régulateur de CCL18 pourrait même être envisagé dans ce contexte, au vu de sa forte expression au niveau thymique.

En conclusion nos études montrent pour la première fois que CCL18 est capable d'induire le développement d'une réponse tolérogénique. Cependant, cette fonction est absente chez les donneurs allergiques qui présentent un défaut de liaison du CCL18 à son récepteur, ce qui pourrait participer à la diminution de la tolérance observée dans les maladies allergiques. Ces données révèlent un potentiel thérapeutique de CCL18 et de son récepteur qui est à ce jour inconnu. Désormais les efforts devraient se concentrer sur l'identification de ce récepteur et sa régulation. Il pourrait s'agir du PITPNM3 très récemment montré comme étant un récepteur fonctionnel de CCL18 [447] présent sur les cellules cancéreuses mammaires, ce qui n'exclut pas la présence d'autres récepteurs GPCR simples ou en combinaisons plus complexes (dimère de la même famille de récepteurs de chimiokines, de familles différentes (Sohy, 2009) ou encore un récepteur de chimiokine avec une autre molécule membranaire).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Devereux, G., The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(11): p. 869-74.
2. Vercelli, D., Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 169-82.
3. Hviid, A. and M. Melbye, Measles-mumps-rubella vaccination and asthma-like disease in early childhood. *Am J Epidemiol*, 2008. **168**(11): p. 1277-83.
4. Balicer, R.D., et al., Is childhood vaccination associated with asthma? A meta-analysis of observational studies. *Pediatrics*, 2007. **120**(5): p. e1269-77.
5. Chetta, A., et al., Chest radiography cannot predict diaphragm function. *Respir Med*, 2005. **99**(1): p. 39-44.
6. Subbarao, P., P.J. Mandhane, and M.R. Sears, Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ*, 2009. **181**(9): p. E181-90.
7. Beuther, D.A., S.T. Weiss, and E.R. Sutherland, Obesity and asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(2): p. 112-9.
8. Haggerty, C.L., et al., The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2003. **90**(3): p. 284-91; quiz 291-3, 347.
9. Schatz, M., Interrelationships between asthma and pregnancy: a literature review. *J Allergy Clin Immunol*, 1999. **103**(2 Pt 2): p. S330-6.
10. Sporik, R., et al., Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med*, 1990. **323**(8): p. 502-7.
11. Sporik, R., et al., Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitisation, and asthma in children: a case-control study of three schools. *Thorax*, 1999. **54**(8): p. 675-80.
12. Wahn, U., et al., Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. *J Allergy Clin Immunol*, 1997. **99**(6 Pt 1): p. 763-9.
13. Simpson, A. and A. Custovic, Pets and the development of allergic sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2005. **5**(3): p. 212-20.
14. Polosa, R., et al., Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2008. **121**(6): p. 1428-34.
15. Baena-Cagnani, C.E., et al., Impact of environmental tobacco smoke and active tobacco smoking on the development and outcomes of asthma and rhinitis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2009. **9**(2): p. 136-40.
16. Holgate, S.T. and R. Polosa, The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet*, 2006. **368**(9537): p. 780-93.
17. James, A.L., et al., Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(2): p. 109-14.
18. McCreanor, J., et al., Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*, 2007. **357**(23): p. 2348-58.
19. Peden, D. and C.E. Reed, Environmental and occupational allergies. *J Allergy Clin Immunol*. **125**(2 Suppl 2): p. S150-60.
20. Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree, Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, 2002. **296**(5567): p. 490-4.
21. von Mutius, E. and K. Radon, Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am*, 2008. **28**(3): p. 631-47, ix-x.
22. Ma, Y., et al., Very low prevalence of asthma and allergies in schoolchildren from rural Beijing, China. *Pediatr Pulmonol*, 2009. **44**(8): p. 793-9.
23. Pelosi, U., et al., The inverse association of salmonellosis in infancy with allergic rhinoconjunctivitis and asthma at school-age: a longitudinal study. *Allergy*, 2005. **60**(5): p. 626-30.
24. Von Ehrenstein, O.S., et al., Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(2): p. 187-93.

25. Shirakawa, T., et al., The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*, 1997. **275**(5296): p. 77-9.
26. Herz, U., et al., The influence of infections on the development and severity of allergic disorders. *Curr Opin Immunol*, 2000. **12**(6): p. 632-40.
27. Aaby, P., et al., Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin Exp Allergy*, 2000. **30**(5): p. 644-50.
28. Hopfenspirger, M.T. and D.K. Agrawal, Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. *J Immunol*, 2002. **168**(5): p. 2516-22.
29. Rook, G.A., Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology*, 2009. **126**(1): p. 3-11.
30. Stene, L.C. and P. Nafstad, Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet*, 2001. **357**(9256): p. 607-8.
31. Hansen, G., et al., Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest*, 1999. **103**(2): p. 175-83.
32. Jackson, D.J. and S.L. Johnston, The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **125**(6): p. 1178-87; quiz 1188-9.
33. Leonardi-Bee, J., D. Pritchard, and J. Britton, Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(5): p. 514-23.
34. Yazdanbakhsh, M. and P.M. Matricardi, Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system? *Clin Rev Allergy Immunol*, 2004. **26**(1): p. 15-24.
35. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, The development of allergic inflammation. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
36. MacGlashan, D., Jr., IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(6): p. 717-23.
37. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 193-204.
38. Bimczok, D., et al., Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells. *Cell Tissue Res*, 2006. **325**(3): p. 461-8.
39. Jahnsen, F.L., et al., Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 5861-7.
40. Runswick, S., et al., Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions. *Respirology*, 2007. **12**(6): p. 834-42.
41. Fanger, N.A., et al., Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol*, 1996. **157**(2): p. 541-8.
42. Barrett, N.A., et al., Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 1119-28.
43. Platts-Mills, T.A. and J.A. Woodfolk, Allergens and their role in the allergic immune response. *Immunol Rev*. **242**(1): p. 51-68.
44. Trompette, A., et al., Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature*, 2009. **457**(7229): p. 585-8.
45. Shreffler, W.G., et al., The major glycoprotein allergen from *Arachis hypogaea*, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *J Immunol*, 2006. **177**(6): p. 3677-85.
46. Hammad, H. and B.N. Lambrecht, Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol*, 2007. **93**: p. 265-78.
47. Humrich, J.Y., et al., Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology*, 2006. **117**(2): p. 238-47.
48. Otero, K., et al., Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking. *Blood*. **116**(16): p. 2942-9.
49. Krummel, M.F., et al., Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science*, 2000. **289**(5483): p. 1349-52.

50. Kapsenberg, M.L., Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(12): p. 984-93.
51. Banchereau, J., et al., Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
52. Tanaka, H., et al., Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med*, 2000. **192**(3): p. 405-12.
53. Feili-Hariri, M., D.H. Falkner, and P.A. Morel, Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(3): p. 656-64.
54. Iwamoto, S., et al., Lipopolysaccharide stimulation converts vigorously washed dendritic cells (DCs) to nonexhausted DCs expressing CD70 and evoking long-lasting type 1 T cell responses. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(2): p. 383-92.
55. Chen, X.Q., et al., Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance. *Respiration*, 2006. **73**(1): p. 34-40.
56. Delespesse, G., et al., OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4+ T cells into high IL-4-producing effectors. *Int Arch Allergy Immunol*, 1999. **118**(2-4): p. 384-6.
57. Hammad, H., et al., Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood*, 2001. **98**(4): p. 1135-41.
58. Hammad, H., et al., Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. *Eur Cytokine Netw*, 2003. **14**(4): p. 219-28.
59. Charbonnier, A.S., et al., Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(1): p. 91-9.
60. Ito, T., et al., TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med*, 2005. **202**(9): p. 1213-23.
61. Tesciuba, A.G., et al., Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1996-2003.
62. Simpson, T.R., S.A. Quezada, and J.P. Allison, Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr Opin Immunol*. **22**(3): p. 326-32.
63. Steinman, R.M., The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)*, 2003. **51**(2): p. 59-60.
64. Akbari, O., et al., Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. **130**(2): p. 108-18.
65. Shortman, K. and S.H. Naik, Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(1): p. 19-30.
66. Siegal, F.P., et al., The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
67. Grouard, G., et al., The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
68. Sapozhnikov, A., et al., Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, 2007. **204**(8): p. 1923-33.
69. Soumelis, V. and Y.J. Liu, From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol*, 2006. **36**(9): p. 2286-92.
70. de Heer, H.J., et al., Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med*, 2004. **200**(1): p. 89-98.
71. Hayashi, T., et al., Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*, 2004. **114**(2): p. 270-9.
72. Tsuchida, T., et al., Effect of respiratory syncytial virus infection on plasmacytoid dendritic cell regulation of allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. **157**(1): p. 21-30.

73. van Rijt, L.S., et al., Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood*, 2002. **100**(10): p. 3663-71.
74. Ito, T., et al., Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol*, 2004. **172**(7): p. 4253-9.
75. Novak, N., et al., FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol*, 2004. **113**(5): p. 949-57.
76. Moller, G.M., et al., Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy*, 1996. **26**(5): p. 517-24.
77. Jahnsen, F.L., et al., Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*, 2001. **56**(11): p. 823-6.
78. Holmberg, E.B., et al., Comparisons among aerodynamic, electroglottographic, and acoustic spectral measures of female voice. *J Speech Hear Res*, 1995. **38**(6): p. 1212-23.
79. Jahnsen, F.L., et al., Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol*, 2000. **165**(7): p. 4062-8.
80. Reider, N., et al., Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **109**(1): p. 89-95.
81. Upham, J.W., J.A. Denburg, and P.M. O'Byrne, Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy*, 2002. **32**(6): p. 818-23.
82. Ostroukhova, M., et al., Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest*, 2004. **114**(1): p. 28-38.
83. Sporri, R. and C. Reis e Sousa, Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*, 2005. **6**(2): p. 163-70.
84. Stock, P., et al., Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol*, 2004. **5**(11): p. 1149-56.
85. Fallarino, F., et al., Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
86. Lambrecht, B.N., R.A. Pauwels, and B. Fazekas De St Groth, Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model. *J Immunol*, 2000. **164**(6): p. 2937-46.
87. Sung, S., C.E. Rose, and S.M. Fu, Intratracheal priming with ovalbumin- and ovalbumin 323-339 peptide-pulsed dendritic cells induces airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and inflammation. *J Immunol*, 2001. **166**(2): p. 1261-71.
88. Hammad, H., et al., Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J Immunol*, 2002. **169**(3): p. 1524-34.
89. Lambrecht, B.N., et al., Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol*, 1998. **160**(8): p. 4090-7.
90. Lambrecht, B.N., Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response. *Allergy*, 2005. **60**(3): p. 271-82.
91. Beaty, S.R., C.E. Rose, Jr., and S.S. Sung, Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1882-95.
92. van Rijt, L.S., et al., In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med*, 2005. **201**(6): p. 981-91.
93. Hoogsteden, H.C., et al., Airway inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease with special emphasis on the antigen-presenting dendritic cell: influence of treatment with fluticasone propionate. *Clin Exp Allergy*, 1999. **29 Suppl 2**: p. 116-24.
94. Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata, Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(2): p. 91-105.

95. Barnes, P.J., Role of GATA-3 in allergic diseases. *Curr Mol Med*, 2008. **8**(5): p. 330-4.
96. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*. **28**: p. 445-89.
97. Barnes, P.J., Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 183-92.
98. Teran, L.M., CCL chemokines and asthma. *Immunol Today*, 2000. **21**(5): p. 235-42.
99. Infante-Duarte, C., et al., Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*, 2000. **165**(11): p. 6107-15.
100. Harrington, L.E., et al., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
101. Wilson, N.J., et al., Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 950-7.
102. Cheung, P.F., C.K. Wong, and C.W. Lam, Molecular mechanisms of cytokine and chemokine release from eosinophils activated by IL-17A, IL-17F, and IL-23: implication for Th17 lymphocytes-mediated allergic inflammation. *J Immunol*, 2008. **180**(8): p. 5625-35.
103. Ivanov, I.I., et al., The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
104. Deo, D.D., et al., Differential effects of leptin on the invasive potential of androgen-dependent and -independent prostate carcinoma cells. *J Biomed Biotechnol*, 2008. **2008**: p. 163902.
105. Liu, Z., et al., IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(8): p. 1133-44.
106. Volpe, E., et al., A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*, 2008. **9**(6): p. 650-7.
107. Happel, K.I., et al., Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of *Mycobacterium tuberculosis* in the lungs. *Infect Immun*, 2005. **73**(9): p. 5782-8.
108. Hohl, T.M., A. Rivera, and E.G. Pamer, Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol*, 2006. **18**(4): p. 465-72.
109. van Beelen, A.J., et al., Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 660-9.
110. Wakashin, H., et al., IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **178**(10): p. 1023-32.
111. Choi, J.P., et al., A viral PAMP double-stranded RNA induces allergen-specific Th17 cell response in the airways which is dependent on VEGF and IL-6. *Allergy*. **65**(10): p. 1322-30.
112. Wong, C.K., et al., Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(2): p. 177-83.
113. Molet, S., et al., IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 2001. **108**(3): p. 430-8.
114. Hashimoto, K., et al., Respiratory syncytial virus infection in the absence of STAT 1 results in airway dysfunction, airway mucus, and augmented IL-17 levels. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(3): p. 550-7.
115. Bullens, D.M., et al., IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res*, 2006. **7**: p. 135.
116. Pene, J., et al., Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol*, 2008. **180**(11): p. 7423-30.
117. Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska, Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med*, 2003. **97**(6): p. 726-33.
118. Hirota, K., et al., Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 2803-12.
119. Chen, Y., et al., Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17036-43.

120. Schnyder-Candrian, S., et al., Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
121. Wilson, R.H., et al., Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **180**(8): p. 720-30.
122. Provoost, S., et al., Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma. *Allergy*, 2009. **64**(10): p. 1539-46.
123. Mamessier, E., et al., [T regulatory lymphocytes, atopy and asthma: a new concept in three dimensions]. *Rev Mal Respir*, 2005. **22**(2 Pt 1): p. 305-11.
124. Robinson, D.S., Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*, 2009. **39**(9): p. 1314-23.
125. Sakaguchi, S., et al., Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*, 2006. **212**: p. 8-27.
126. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
127. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
128. Jonuleit, H., et al., Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med*, 2002. **196**(2): p. 255-60.
129. Dieckmann, D., et al., Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*, 2002. **196**(2): p. 247-53.
130. Collison, L.W., et al., The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
131. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
132. Allavena, P., et al., IL-10 prevents the generation of dendritic cells from CD14⁺ blood monocytes, promotes the differentiation to mature macrophages and stimulates endocytosis of FITC-dextran. *Adv Exp Med Biol*, 1997. **417**: p. 323-7.
133. Arock, M., et al., Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(1): p. 166-70.
134. Takanashi, S., et al., Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med*, 1994. **180**(2): p. 711-5.
135. Akdis, C.A., et al., A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *FASEB J*, 2000. **14**(12): p. 1666-8.
136. Kearley, J., et al., Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med*, 2005. **202**(11): p. 1539-47.
137. Grunig, G., et al., Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med*, 1997. **185**(6): p. 1089-99.
138. Rubtsov, Y.P., et al., Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 546-58.
139. Presser, K., et al., Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7751-8.
140. Piccirillo, C.A., et al., CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*, 2002. **196**(2): p. 237-46.
141. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 629-44.
142. Grossman, W.J., et al., Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 2004. **104**(9): p. 2840-8.

143. Gondek, D.C., et al., Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
144. Zhao, D.M., et al., Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
145. Deaglio, S., et al., Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
146. Zarek, P.E., et al., A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 251-9.
147. Leech, M.D., et al., Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. *J Immunol*, 2007. **179**(10): p. 7050-8.
148. Carson, W.F.t., et al., Accumulation of regulatory T cells in local draining lymph nodes of the lung correlates with spontaneous resolution of chronic asthma in a murine model. *Int Arch Allergy Immunol*, 2008. **145**(3): p. 231-43.
149. Lewkowich, I.P., et al., CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med*, 2005. **202**(11): p. 1549-61.
150. Strickland, D.H., et al., Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2649-60.
151. Akdis, M., 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. *J Exp Med*, 2004. **199**(11): p. 1567-75.
152. Heaton, T., et al., An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*, 2005. **365**(9454): p. 142-9.
153. Ling, E.M., 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**(9409): p. 608-15.
154. Grindebacke, H., et al., Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(9): p. 1364-72.
155. Nguyen, K.D., C. Vanichsarn, and K.C. Nadeau, Impaired IL-10-dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4+CD25hiCD127lo/- natural regulatory T cells in human allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **180**(9): p. 823-33.
156. Duhon, T., et al., Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 857-63.
157. Trifari, S., et al., Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 2009. **10**(8): p. 864-71.
158. Nogales, K.E., et al., IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(6): p. 1244-52 e2.
159. Eyerich, S., et al., Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, 2009. **119**(12): p. 3573-85.
160. Fujita, H., et al., Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(51): p. 21795-800.
161. Zhao, Y., et al., Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. **151**(4): p. 297-307.
162. Wong, C.K., et al., Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma. *Immunol Invest*, 2009. **38**(7): p. 652-64.
163. Schnyder, B., C. Lima, and S. Schnyder-Candrian, Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine*. **50**(2): p. 220-7.
164. Besnard, A.G., et al., Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med*. **183**(9): p. 1153-63.
165. Spits, H. and T. Cupedo, Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annu Rev Immunol*. **30**: p. 647-75.

166. Price, A.E., et al., Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(25): p. 11489-94.
167. Monticelli, L.A., et al., Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat Immunol*. **12**(11): p. 1045-54.
168. Mjosberg, J.M., et al., Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol*. **12**(11): p. 1055-62.
169. Neill, D.R., et al., Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. **464**(7293): p. 1367-70.
170. Moro, K., et al., Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. **463**(7280): p. 540-4.
171. Saenz, S.A., et al., IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature*. **464**(7293): p. 1362-6.
172. Bartemes, K.R., et al., IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J Immunol*. **188**(3): p. 1503-13.
173. Barlow, J.L., et al., Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol*. **129**(1): p. 191-8 e1-4.
174. Halim, T.Y., et al., Lung natural helper cells are a critical source of th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*. **36**(3): p. 451-63.
175. Barrett, N.A. and K.F. Austen, Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 425-37.
176. Knight, D.A. and S.T. Holgate, The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, 2003. **8**(4): p. 432-46.
177. Holgate, S.T., The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma. *Allergol Int*, 2008. **57**(1): p. 1-10.
178. Holgate, S.T., The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis. *Immunol Rev*. **242**(1): p. 205-19.
179. Ying, S., et al., Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(6): p. 1386-8.
180. Chung, K.F., Intrinsic differences of the airway epithelium in childhood allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(10): p. 1066-7.
181. Davies, R.J., et al., Expression of granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-8 and RANTES in the bronchial epithelium of mild asthmatics is down-regulated by inhaled beclomethasone dipropionate. *Int Arch Allergy Immunol*, 1995. **107**(1-3): p. 428-9.
182. Nakamura, Y., et al., Upregulatory effects of interleukin-4 and interleukin-13 but not interleukin-10 on granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **15**(5): p. 680-7.
183. Prussin, C. and D.D. Metcalfe, 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S450-6.
184. Irani, A.M., et al., Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem*, 1989. **37**(10): p. 1509-15.
185. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev*, 1998. **50**(4): p. 515-96.
186. Klein, L.M., et al., Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. **86**(22): p. 8972-6.
187. Ikeda, K., et al., Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood*, 2003. **101**(9): p. 3594-6.
188. Marone, G., M. Triggiani, and A. de Paulis, Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol*, 2005. **26**(1): p. 25-31.
189. Amin, K., The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med*. **106**(1): p. 9-14.
190. Yu, M., et al., Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1633-41.
191. Amin, K., et al., The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy*, 2005. **60**(10): p. 1241-7.

192. Taube, C., et al., Mast cells, Fc epsilon RI, and IL-13 are required for development of airway hyperresponsiveness after aerosolized allergen exposure in the absence of adjuvant. *J Immunol*, 2004. **172**(10): p. 6398-406.
193. Sawaguchi, M., et al., Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J Immunol*. **188**(4): p. 1809-18.
194. Amin, K., et al., Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **162**(6): p. 2295-301.
195. Oh, C.K., Mast cell mediators in airway remodeling. *Chem Immunol Allergy*, 2005. **87**: p. 85-100.
196. Wenzel, S.E., et al., Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(6): p. 1345-52.
197. Sugimoto, K., et al., The alphavbeta6 integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells. *J Clin Invest*.
198. Kim, Y.S., et al., Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(4): p. 1107-15.
199. Nakae, S., et al., Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(1): p. 48-55.
200. Schroeder, J.T., Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol*, 2009. **101**: p. 123-61.
201. Schneider, E., et al., Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw*. **21**(3): p. 142-53.
202. Falcone, F.H., D. Zillikens, and B.F. Gibbs, The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(11): p. 855-64.
203. Wang, Y.H., et al., Maintenance and polarization of human TH2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity*, 2006. **24**(6): p. 827-38.
204. Min, B. and W.E. Paul, Basophils: in the spotlight at last. *Nat Immunol*, 2008. **9**(3): p. 223-5.
205. Schneider, E., et al., IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production. *J Immunol*, 2009. **183**(6): p. 3591-7.
206. Kondo, Y., et al., Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol*, 2008. **20**(6): p. 791-800.
207. Sokol, C.L., et al., Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 713-20.
208. Perrigoue, J.G., et al., MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 697-705.
209. Yoshimoto, T., et al., Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 706-12.
210. Wynn, T.A., Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 679-81.
211. Hammad, H., et al., Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med*. **207**(10): p. 2097-111.
212. Holgate, S.T. and R. Polosa, Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 218-30.
213. Sehmi, R., A.J. Baatjes, and J.A. Denburg, Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003. **2**(4): p. 271-8.

214. Woltmann, G., et al., Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood*, 2000. **95**(10): p. 3146-52.
215. Fujishima, H., et al., Prostaglandin D2 induces chemotaxis in eosinophils via its receptor CRTH2 and eosinophils may cause severe ocular inflammation in patients with allergic conjunctivitis. *Cornea*, 2005. **24**(8 Suppl): p. S66-S70.
216. Rosenberg, H.F., The eosinophil ribonucleases. *Cell Mol Life Sci*, 1998. **54**(8): p. 795-803.
217. Egesten, A., P.F. Weller, and I. Olsson, Arylsulfatase B is present in crystalloid-containing granules of human eosinophil granulocytes. *Int Arch Allergy Immunol*, 1994. **104**(2): p. 207-10.
218. Broide, D.H., M.M. Paine, and G.S. Firestein, Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J Clin Invest*, 1992. **90**(4): p. 1414-24.
219. Rothenberg, M.E., Eosinophilia. *N Engl J Med*, 1998. **338**(22): p. 1592-600.
220. Maddox, L. and D.A. Schwartz, The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 477-98.
221. Yang, D., et al., Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med*, 2008. **205**(1): p. 79-90.
222. Williams, T.J. and P.J. Jose, Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma. *Chem Immunol*, 2000. **78**: p. 166-77.
223. Lee, J.J., et al., Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*, 2004. **305**(5691): p. 1773-6.
224. Humbles, A.A., et al., A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*, 2004. **305**(5691): p. 1776-9.
225. Jacobsen, E.A., et al., Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med*, 2008. **205**(3): p. 699-710.
226. Walsh, E.R., et al., Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma. *J Exp Med*, 2008. **205**(6): p. 1285-92.
227. Jacobsen, E.A., et al., Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *J Immunol*. **187**(11): p. 6059-68.
228. Lamblin, C., et al., Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(2): p. 394-402.
229. Wenzel, S.E., et al., Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(3): p. 1001-8.
230. Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos, Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*, 2001. **119**(5): p. 1329-36.
231. Jonsson, F., et al., Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis. *J Clin Invest*. **121**(4): p. 1484-96.
232. Gould, H.J. and B.J. Sutton, IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(3): p. 205-17.
233. Bieber, T., et al., Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med*, 1992. **175**(5): p. 1285-90.
234. Gounni, A.S., et al., High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature*, 1994. **367**(6459): p. 183-6.
235. Reich, K., et al., Engagement of the Fc epsilon RI stimulates the production of IL-16 in Langerhans cell-like dendritic cells. *J Immunol*, 2001. **167**(11): p. 6321-9.
236. Kraft, S. and J.P. Kinet, New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(5): p. 365-78.
237. von Bubnoff, D., et al., FcepsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J Immunol*, 2002. **169**(4): p. 1810-6.
238. Carlsson, F., et al., IgE enhances specific antibody and T-cell responses in mice overexpressing CD23. *Scand J Immunol*, 2007. **66**(2-3): p. 261-70.

239. Babina, M., et al., Comparative cytokine profile of human skin mast cells from two compartments--strong resemblance with monocytes at baseline but induction of IL-5 by IL-4 priming. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 244-52.
240. Aoudjehane, L., et al., Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway. *Lab Invest*, 2008. **88**(9): p. 973-85.
241. Wallace, W.A. and S.E. Howie, Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease. *J Pathol*, 1999. **187**(4): p. 475-80.
242. Andrews, R.P., et al., Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling. *J Biol Chem*, 2002. **277**(39): p. 36563-9.
243. Nawijn, M.C., et al., Enforced expression of GATA-3 in transgenic mice inhibits Th1 differentiation and induces the formation of a T1/ST2-expressing Th2-committed T cell compartment in vivo. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 724-32.
244. Kaminuma, O., et al., GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Lett*, 2004. **570**(1-3): p. 63-8.
245. Kim, P.J., et al., GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 6650-9.
246. Vosshenrich, C.A., et al., A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol*, 2006. **7**(11): p. 1217-24.
247. Kouros-Mehr, H., et al., GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell*, 2006. **127**(5): p. 1041-55.
248. Eum, S.Y., et al., IL-13 may mediate allergen-induced hyperresponsiveness independently of IL-5 or eotaxin by effects on airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **288**(3): p. L576-84.
249. Walter, D.M., et al., Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol*, 2001. **167**(8): p. 4668-75.
250. Saito, H., et al., Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: a study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency. *J Immunol*, 2002. **168**(6): p. 3017-23.
251. Matsumoto, N., et al., Critical role of IL-5 in antigen-induced pulmonary eosinophilia, but not in lymphocyte activation. *Int Arch Allergy Immunol*, 2003. **130**(3): p. 209-15.
252. Kudlacz, E., et al., Functional effects of eotaxin are selectively upregulated on IL-5 transgenic mouse eosinophils. *Inflammation*, 2002. **26**(3): p. 111-9.
253. Sun, J., et al., Immunoreactivity profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with ragweed-induced allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 2007. **37**(6): p. 901-8.
254. Fujisawa, T., H. Katsumata, and Y. Kato, House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils. *Allergol Int*, 2008. **57**(2): p. 141-6.
255. Erpenbeck, V.J., et al., Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics. *Chest*, 2003. **123**(3 Suppl): p. 370S.
256. van den Brule, S., et al., Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **37**(2): p. 202-9.
257. Sitkauskienė, B., et al., Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9. *Respir Res*, 2005. **6**: p. 33.
258. Dardalhon, V., et al., IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1347-55.
259. Veldhoen, M., et al., Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
260. Moon, P.D. and H.M. Kim, Thymic stromal lymphopoietin is expressed and produced by caspase-1/NF-kappaB pathway in mast cells. *Cytokine*. **54**(3): p. 239-43.
261. Kashyap, M., et al., Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells. *J Immunol*. **187**(3): p. 1207-11.
262. Ying, S., et al., Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 8183-90.

263. Ying, S., et al., Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*, 2008. **181**(4): p. 2790-8.
264. Zhou, B., et al., Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p. 1047-53.
265. Liu, Y.J., Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(2): p. 238-44; quiz 245-6.
266. Wong, C.K., et al., Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and pro-survival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **43**(3): p. 305-15.
267. Omori, M. and S. Ziegler, Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol*, 2007. **178**(3): p. 1396-404.
268. Liu, Y.J., Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p. 269-73.
269. Kaur, D., et al., Mast cell-airway smooth muscle crosstalk: the role of thymic stromal lymphopoietin. *Chest*.
270. Al-Shami, A., et al., A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 829-39.
271. Zhang, F., et al., A soluble thymic stromal lymphopoietin (TSLP) antagonist, TSLPR-immunoglobulin, reduces the severity of allergic disease by regulating pulmonary dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. **164**(2): p. 256-64.
272. Lei, L., et al., Thymic stromal lymphopoietin interferes with airway tolerance by suppressing the generation of antigen-specific regulatory T cells. *J Immunol*. **186**(4): p. 2254-61.
273. Bleck, B., et al., Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol*, 2006. **176**(12): p. 7431-7.
274. Stampfli, M.R., et al., GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice. *J Clin Invest*, 1998. **102**(9): p. 1704-14.
275. Yamashita, N., et al., Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Cell Immunol*, 2002. **219**(2): p. 92-7.
276. Cates, E.C., et al., Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol*, 2004. **173**(10): p. 6384-92.
277. Angkasekwinai, P., et al., Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses. *J Exp Med*, 2007. **204**(7): p. 1509-17.
278. Fort, M.M., et al., IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*, 2001. **15**(6): p. 985-95.
279. Corrigan, C.J., et al., T-helper cell type 2 (Th2) memory T cell-potentiating cytokine IL-25 has the potential to promote angiogenesis in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(4): p. 1579-84.
280. Corrigan, C.J., et al., Allergen-induced expression of IL-25 and IL-25 receptor in atopic asthmatic airways and late-phase cutaneous responses. *J Allergy Clin Immunol*. **128**(1): p. 116-24.
281. Siegle, J.S., et al., Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma. *Clin Exp Immunol*. **165**(1): p. 19-28.
282. Wood, I.S., B. Wang, and P. Trayhurn, IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **384**(1): p. 105-9.
283. Moussion, C., N. Ortega, and J.P. Girard, The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3331.
284. Smithgall, M.D., et al., IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol*, 2008. **20**(8): p. 1019-30.

285. Lambrecht, B.N., et al., Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest*, 2000. **106**(4): p. 551-9.
286. Yasuda, K., et al., Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**(9): p. 3451-6.
287. Liu, X., et al., Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **386**(1): p. 181-5.
288. Prefontaine, D., et al., Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. **125**(3): p. 752-4.
289. Smith, D.E., IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy*. **40**(2): p. 200-8.
290. Jutel, M., K. Blaser, and C.A. Akdis, Histamine in allergic inflammation and immune modulation. *Int Arch Allergy Immunol*, 2005. **137**(1): p. 82-92.
291. Bryce, P.J., et al., The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses. *J Clin Invest*, 2006. **116**(6): p. 1624-32.
292. Dunford, P.J., et al., The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol*, 2006. **176**(11): p. 7062-70.
293. Cowden, J.M., et al., Histamine H4 receptor antagonism diminishes existing airway inflammation and dysfunction via modulation of Th2 cytokines. *Respir Res*. **11**: p. 86.
294. White, M.V., The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 1990. **86**(4 Pt 2): p. 599-605.
295. Ford-Hutchinson, A.W., et al., Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature*, 1980. **286**(5770): p. 264-5.
296. Goldstein, I.M., et al., Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 1978. **148**(3): p. 787-92.
297. Zlotnik, A. and O. Yoshie, Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-7.
298. Galzi, J.L., et al., Neutralizing endogenous chemokines with small molecules. Principles and potential therapeutic applications. *Pharmacol Ther*. **126**(1): p. 39-55.
299. Mantovani, A., R. Bonecchi, and M. Locati, Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(12): p. 907-18.
300. Townson, D.H. and A.R. Liptak, Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. **1**: p. 94.
301. Strieter, R.M., et al., The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27348-57.
302. Cole, K.E., et al., Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med*, 1998. **187**(12): p. 2009-21.
303. Sleeman, M.A., et al., B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol*, 2000. **12**(5): p. 677-89.
304. Gengrinovitch, S., et al., Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem*, 1995. **270**(25): p. 15059-65.
305. Luster, A.D. and M.E. Rothenberg, Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(5): p. 620-33.
306. Inngjerdigen, M., B. Damaj, and A.A. Maghazachi, Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 4048-54.
307. Forssmann, U., et al., Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes. *J Exp Med*, 1997. **185**(12): p. 2171-6.
308. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
309. Imai, T., et al., Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem*, 1996. **271**(35): p. 21514-21.

310. Vicari, A.P., et al., TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity*, 1997. **7**(2): p. 291-301.
311. Zavala-Flores, L.M., et al., Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol Lett*, 2009. **31**(2): p. 215-20.
312. Kelner, G.S., et al., Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 1994. **266**(5189): p. 1395-9.
313. Huang, H. and J. Xiang, Synergistic effect of lymphotactin and interferon gamma-inducible protein-10 transgene expression in T-cell localization and adoptive T-cell therapy of tumors. *Int J Cancer*, 2004. **109**(6): p. 817-25.
314. Nguyen, K.D., et al., XCL1 enhances regulatory activities of CD4+ CD25(high) CD127(low/-) T cells in human allergic asthma. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5386-95.
315. Bazan, J.F., et al., A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
316. Rimaniol, A.C., et al., The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(6): p. 1139-46.
317. Mionnet, C., et al., CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med*. **16**(11): p. 1305-12.
318. Hileman, R.E., et al., Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins. *Bioessays*, 1998. **20**(2): p. 156-67.
319. Proudfoot, A.E., et al., The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p. 10620-6.
320. Oravecz, T., et al., Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med*, 1997. **186**(11): p. 1865-72.
321. Allen, S.J., S.E. Crown, and T.M. Handel, Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 787-820.
322. McQuibban, G.A., et al., Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 2002. **100**(4): p. 1160-7.
323. Proudfoot, A.E., et al., Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(4): p. 1885-90.
324. Schutysse, E., et al., Selective induction of CCL18/PARC by staphylococcal enterotoxins in mononuclear cells and enhanced levels in septic and rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(12): p. 3755-62.
325. Sabatini, F., et al., Modulation of the constitutive or cytokine-induced bronchial epithelial cell functions in vitro by fluticasone propionate. *Immunol Lett*, 2003. **89**(2-3): p. 215-24.
326. Sauty, A., et al., The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3549-58.
327. Wang, J.H., et al., Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996. **14**(1): p. 27-35.
328. Komiya, A., et al., Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol*, 2003. **225**(2): p. 91-100.
329. Reibman, J., et al., Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **28**(6): p. 648-54.
330. Nonaka, M., et al., Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy*, 2004. **34**(5): p. 804-11.
331. Teran, L.M., et al., Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999. **20**(4): p. 777-86.
332. Slavina, J., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA is down-regulated in human dermal fibroblasts by dexamethasone: differential regulation by TGF-beta. *Growth Factors*, 1995. **12**(2): p. 151-7.
333. Berkman, N., et al., Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 1995. **269**(4 Pt 1): p. L443-52.

334. Stellato, C., et al., Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines. *J Clin Invest*, 1997. **99**(5): p. 926-36.
335. Stellato, C., et al., Differential regulation of epithelial-derived C-C chemokine expression by IL-4 and the glucocorticoid budesonide. *J Immunol*, 1999. **163**(10): p. 5624-32.
336. Eum, S.Y., et al., Involvement of the cysteinyl-leukotrienes in allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **28**(1): p. 25-32.
337. Kodelja, V., et al., Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*, 1998. **160**(3): p. 1411-8.
338. Pease, J.E. and T.J. Williams, Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **118**(2): p. 305-18; quiz 319-20.
339. Ballesteros, J.A., et al., Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6. *J Biol Chem*, 2001. **276**(31): p. 29171-7.
340. Woo, C.H. and J.H. Kim, Rac GTPase activity is essential for lipopolysaccharide signaling to extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase activation in rat-2 fibroblasts. *Mol Cells*, 2002. **13**(3): p. 470-5.
341. Adachi, T., et al., The functional role of rho and rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils. *J Immunol*, 2001. **167**(8): p. 4609-15.
342. Hirsch, E., et al., Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 2000. **287**(5455): p. 1049-53.
343. Soldevila, G., et al., Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3. *Immunology*, 2004. **112**(2): p. 191-200.
344. Shahrara, S., et al., Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003. **48**(12): p. 3568-83.
345. Hoogewerf, A.J., et al., Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry*, 1997. **36**(44): p. 13570-8.
346. Middleton, J., et al., Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 385-95.
347. Lau, E.K., et al., Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 22294-305.
348. Smith, C.A., et al., Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors. *Virology*, 1997. **236**(2): p. 316-27.
349. Guha, S., et al., Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2738-45.
350. Hesselgesser, J., et al., Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem*, 1998. **273**(25): p. 15687-92.
351. Boshoff, C., et al., Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*, 1997. **278**(5336): p. 290-4.
352. Stine, J.T., et al., KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood*, 2000. **95**(4): p. 1151-7.
353. Loetscher, P. and I. Clark-Lewis, Agonistic and antagonistic activities of chemokines. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(6): p. 881-4.
354. Loetscher, P., et al., The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 2986-91.
355. Ogilvie, P., et al., Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood*, 2001. **97**(7): p. 1920-4.
356. Proudfoot, A.E., et al., Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem*, 1996. **271**(5): p. 2599-603.

357. Struyf, S., et al., Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(4): p. 1262-71.
358. Van Coillie, E., et al., Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Biochemistry*, 1998. **37**(36): p. 12672-80.
359. Dong, C., et al., Glycosylated recombinant human XCL1/lymphotactin exhibits enhanced biologic activity. *J Immunol Methods*, 2005. **302**(1-2): p. 136-44.
360. Crisi, G.M., et al., Induction of inhibitory activity for B cell differentiation in human CD8 T cells with pokeweed mitogen, dimaprit, and cAMP upregulating agents: countersuppressive effect of platelet factor 4. *Cell Immunol*, 1996. **172**(2): p. 205-16.
361. Lukacs, N.W., et al., E- and P-selectins are essential for the development of cockroach allergen-induced airway responses. *J Immunol*, 2002. **169**(4): p. 2120-5.
362. Keane, M.P., et al., CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc Assoc Am Physicians*, 1998. **110**(4): p. 288-96.
363. Gunn, M.D., et al., A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 799-803.
364. Graham, G.J., et al., Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature*, 1990. **344**(6265): p. 442-4.
365. Stellato, C., et al., Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 1457-61.
366. Braun, M.C., E. Lahey, and B.L. Kelsall, Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *J Immunol*, 2000. **164**(6): p. 3009-17.
367. Marsland, B.J., et al., CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity*, 2005. **22**(4): p. 493-505.
368. Cappello, P., et al., CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 6143-51.
369. Pannellini, T., et al., The expression of LEC/CCL16, a powerful inflammatory chemokine, is upregulated in ulcerative colitis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2004. **17**(2): p. 171-80.
370. Chand, A.L., et al., Laser capture microdissection and cDNA array analysis of endometrium identify CCL16 and CCL21 as epithelial-derived inflammatory mediators associated with endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007. **5**: p. 18.
371. Karpus, W.J. and K.J. Kennedy, MIP-1 α and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J Leukoc Biol*, 1997. **62**(5): p. 681-7.
372. Gu, L., et al., Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*, 2000. **404**(6776): p. 407-11.
373. Sekiya, T., et al., Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 2000. **165**(4): p. 2205-13.
374. Sekiya, T., et al., Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics. *Allergy*, 2002. **57**(2): p. 173-7.
375. Lezcano-Meza, D., et al., Interleukin (IL)-4 and to a lesser extent either IL-13 or interferon-gamma regulate the production of eotaxin-2/CCL24 in nasal polyps. *Allergy*, 2003. **58**(10): p. 1011-7.
376. Humbles, A.A., et al., The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(3): p. 1479-84.
377. Senechal, S., et al., CCR3-blocking antibody inhibits allergen-induced eosinophil recruitment in human skin xenografts from allergic patients. *Lab Invest*, 2002. **82**(7): p. 929-39.
378. Kallinich, T., et al., Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*, 2005. **35**(1): p. 26-33.
379. Panina-Bordignon, P., et al., The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest*, 2001. **107**(11): p. 1357-64.

380. Vijayanand, P., et al., Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J Immunol*. **184**(8): p. 4568-74.
381. Chvatchko, Y., et al., A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med*, 2000. **191**(10): p. 1755-64.
382. Conroy, D.M., et al., CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *J Leukoc Biol*, 2003. **74**(4): p. 558-63.
383. Mikhak, Z., et al., Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **123**(1): p. 67-73 e3.
384. Perros, F., et al., Blockade of CCR4 in a humanized model of asthma reveals a critical role for DC-derived CCL17 and CCL22 in attracting Th2 cells and inducing airway inflammation. *Allergy*, 2009. **64**(7): p. 995-1002.
385. Chensue, S.W., et al., Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. *J Exp Med*, 2001. **193**(5): p. 573-84.
386. Chung, C.D., et al., CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 581-7.
387. Goya, I., et al., Absence of CCR8 does not impair the response to ovalbumin-induced allergic airway disease. *J Immunol*, 2003. **170**(4): p. 2138-46.
388. Bishop, B. and C.M. Lloyd, CC chemokine ligand 1 promotes recruitment of eosinophils but not Th2 cells during the development of allergic airways disease. *J Immunol*, 2003. **170**(9): p. 4810-7.
389. Campbell, J.J., et al., Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J Immunol*, 2001. **166**(4): p. 2842-8.
390. Suzaki, Y., et al., A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and inflammation. *Eur Respir J*, 2008. **31**(4): p. 783-9.
391. Bradding, P., A.F. Walls, and S.T. Holgate, The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(6): p. 1277-84.
392. Bochner, B.S., et al., Release of both CCR4-active and CXCR3-active chemokines during human allergic pulmonary late-phase reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **112**(5): p. 930-4.
393. Pilette, C., et al., CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur Respir J*, 2004. **23**(6): p. 876-84.
394. Medoff, B.D., et al., IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol*, 2002. **168**(10): p. 5278-86.
395. Thomas, M.S., S.L. Kunkel, and N.W. Lukacs, Differential role of IFN-gamma-inducible protein 10 kDa in a cockroach antigen-induced model of allergic airway hyperreactivity: systemic versus local effects. *J Immunol*, 2002. **169**(12): p. 7045-53.
396. Campbell, E.M., et al., Monocyte chemoattractant protein-1 mediates cockroach allergen-induced bronchial hyperreactivity in normal but not CCR2^{-/-} mice: the role of mast cells. *J Immunol*, 1999. **163**(4): p. 2160-7.
397. Hogaboam, C.M., et al., The therapeutic potential in targeting CCR5 and CXCR4 receptors in infectious and allergic pulmonary disease. *Pharmacol Ther*, 2005. **107**(3): p. 314-28.
398. Lukacs, N.W., et al., AMD3100, a CxCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am J Pathol*, 2002. **160**(4): p. 1353-60.
399. Iellem, A., et al., Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p. 847-53.
400. Bromley, S.K., T.R. Mempel, and A.D. Luster, Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol*, 2008. **9**(9): p. 970-80.
401. Sallusto, F., et al., Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(9): p. 2760-9.
402. Campbell, J.J., et al., The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, 1999. **400**(6746): p. 776-80.
403. Vestergaard, C., et al., Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J Clin Invest*, 1999. **104**(8): p. 1097-105.

404. Yu, B., et al., Differential regulation of thymus- and activation-regulated chemokine induced by IL-4, IL-13, TNF-alpha and IFN-gamma in human keratinocyte and fibroblast. *J Dermatol Sci*, 2002. **30**(1): p. 29-36.
405. Bernardini, G., et al., Identification of the CC chemokines TARC and macrophage inflammatory protein-1 beta as novel functional ligands for the CCR8 receptor. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(2): p. 582-8.
406. Garlisi, C.G., et al., The assignment of chemokine-chemokine receptor pairs: TARC and MIP-1 beta are not ligands for human CC-chemokine receptor 8. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(10): p. 3210-5.
407. Imai, T., et al., The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 15036-42.
408. Godiska, R., et al., Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*, 1997. **185**(9): p. 1595-604.
409. Chantry, D., et al., Profile of human macrophage transcripts: insights into macrophage biology and identification of novel chemokines. *J Leukoc Biol*, 1998. **64**(1): p. 49-54.
410. Imai, T., et al., Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem*, 1998. **273**(3): p. 1764-8.
411. Chang, M., et al., Molecular cloning and functional characterization of a novel CC chemokine, stimulated T cell chemotactic protein (STCP-1) that specifically acts on activated T lymphocytes. *J Biol Chem*, 1997. **272**(40): p. 25229-37.
412. Andrew, D.P., et al., STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol*, 1998. **161**(9): p. 5027-38.
413. Watanabe, M., et al., Overproduction of IgE induces macrophage-derived chemokine (CCL22) secretion from basophils. *J Immunol*, 2008. **181**(8): p. 5653-9.
414. Tang, H.L. and J.G. Cyster, Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 1999. **284**(5415): p. 819-22.
415. Struyf, S., et al., Enhanced anti-HIV-1 activity and altered chemotactic potency of NH2-terminally processed macrophage-derived chemokine (MDC) imply an additional MDC receptor. *J Immunol*, 1998. **161**(6): p. 2672-5.
416. Horikawa, T., et al., IFN-gamma-inducible expression of thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 and macrophage-derived chemokine/CCL22 in epidermal keratinocytes and their roles in atopic dermatitis. *Int Immunol*, 2002. **14**(7): p. 767-73.
417. Iellem, A., et al., Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol*, 2000. **30**(4): p. 1030-9.
418. Oliveira, S.H. and N.W. Lukacs, Stem cell factor and igE-stimulated murine mast cells produce chemokines (CCL2, CCL17, CCL22) and express chemokine receptors. *Inflamm Res*, 2001. **50**(3): p. 168-74.
419. Hirata, H., et al., Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients. *J Clin Immunol*, 2003. **23**(1): p. 34-45.
420. Lezcano-Meza, D., et al., The monocyte-derived chemokine is released in the bronchoalveolar lavage fluid of steady-state asthmatics. *Allergy*, 2003. **58**(11): p. 1125-30.
421. Leung, T.F., et al., Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2002. **110**(3): p. 404-9.
422. Hartl, D., et al., Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **115**(4): p. 728-36.
423. Gonzalo, J.A., et al., Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol*, 1999. **163**(1): p. 403-11.
424. Kawasaki, S., et al., Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*, 2001. **166**(3): p. 2055-62.

425. Hieshima, K., et al., A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *J Immunol*, 1997. **159**(3): p. 1140-9.
426. Adema, G.J., et al., A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 1997. **387**(6634): p. 713-7.
427. Kodelja, V., et al., Langerhans cells do not express alternative macrophage activation-associated CC chemokine (AMAC)-1. *Res Immunol*, 1998. **149**(7-8): p. 633-7.
428. Guan, P., et al., Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18. *Genomics*, 1999. **56**(3): p. 296-302.
429. Wells, T.N. and M.C. Peitsch, The chemokine information source: identification and characterization of novel chemokines using the WorldWideWeb and expressed sequence tag databases. *J Leukoc Biol*, 1997. **61**(5): p. 545-50.
430. Tasaki, Y., et al., Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes. *Genomics*, 1999. **55**(3): p. 353-7.
431. Struyf, S., et al., PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*, 2003. **163**(5): p. 2065-75.
432. Vulcano, M., et al., Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J Immunol*, 2003. **170**(7): p. 3843-9.
433. Vissers, J.L., et al., Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(5): p. 785-93.
434. van der Voort, R., et al., Novel monoclonal antibodies detect elevated levels of the chemokine CCL18/DC-CK1 in serum and body fluids in pathological conditions. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(5): p. 739-47.
435. Elia, A.R., et al., Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(6): p. 1472-82.
436. Zeidler, R., et al., Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *J Immunol*, 1999. **163**(3): p. 1246-52.
437. Wang, Y.D., et al., gp130-linked signal transduction promotes the differentiation and maturation of dendritic cells. *Int Immunol*, 2002. **14**(6): p. 599-603.
438. van Lieshout, A.W., et al., Inhibition of TNF alpha during maturation of dendritic cells results in the development of semi-mature cells: a potential mechanism for the beneficial effects of TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(3): p. 408-14.
439. Li, X., et al., Mature dendritic cells express functional thrombin receptors triggering chemotaxis and CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine induction. *J Immunol*, 2008. **181**(2): p. 1215-23.
440. Mantovani, A., et al., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 2004. **25**(12): p. 677-86.
441. Ferrara, G., et al., Mycobacterium tuberculosis induces CCL18 expression in human macrophages. *Scand J Immunol*, 2008. **68**(6): p. 668-74.
442. Kollert, F., et al., CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers. *Inflammation*, 2009. **32**(3): p. 163-8.
443. Atamas, S.P., et al., Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003. **29**(6): p. 743-9.
444. Lindhout, E., et al., The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes. *J Immunol*, 2001. **166**(5): p. 3284-9.
445. Nibbs, R.J., et al., C-C chemokine receptor 3 antagonism by the beta-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap. *J Immunol*, 2000. **164**(3): p. 1488-97.
446. Catusse, J., et al., Role of the atypical chemoattractant receptor CCR4 in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer*. **9**: p. 297.
447. Chen, J., et al., CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. **19**(4): p. 541-55.

448. Gunther, C., et al., CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1723-8.
449. de Nadai, P., et al., Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol*, 2006. **176**(10): p. 6286-93.
450. Schraufstatter, I., et al., Eosinophils and monocytes produce pulmonary and activation-regulated chemokine, which activates cultured monocytes/macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **286**(3): p. L494-501.
451. Broxmeyer, H.E., et al., Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. **872**: p. 142-62; discussion 163.
452. Kim, H.B., et al., Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum. *Chest*, 2009. **135**(2): p. 295-302.
453. Medzhitov, R., Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
454. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
455. Geijtenbeek, T.B., et al., Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 2004. **22**: p. 33-54.
456. Zhou, T., et al., DC-SIGN and immunoregulation. *Cell Mol Immunol*, 2006. **3**(4): p. 279-83.
457. Gazi, U. and L. Martinez-Pomares, Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology*, 2009. **214**(7): p. 554-61.
458. Brown, G.D., et al., Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*, 2003. **197**(9): p. 1119-24.
459. Sancho, D. and E.S.C. Reis, Signaling by Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Homeostasis. *Annu Rev Immunol*.
460. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2001. **2**(8): p. 675-80.
461. Rock, F.L., et al., A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(2): p. 588-93.
462. Lin, S.C., Y.C. Lo, and H. Wu, Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. **465**(7300): p. 885-90.
463. Takeda, K. and S. Akira, TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 2004. **16**(1): p. 3-9.
464. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. **30**(1): p. 16-34.
465. Eisenbarth, S.C., et al., Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*, 2002. **196**(12): p. 1645-51.
466. Redecke, V., et al., Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2739-43.
467. Patel, M., et al., TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J Immunol*, 2005. **174**(12): p. 7558-63.
468. Revets, H., et al., Lipoprotein I, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol*, 2005. **174**(2): p. 1097-103.
469. Velasco, G., et al., Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005. **32**(3): p. 218-24.
470. Kline, J.N., et al., Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*, 1998. **160**(6): p. 2555-9.
471. Page, K., et al., TLR2-mediated activation of neutrophils in response to German cockroach frass. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6317-24.
472. Phipps, S., et al., Toll/IL-1 signaling is critical for house dust mite-specific helper T cell type 2 and type 17 [corrected] responses. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(10): p. 883-93.
473. Kheradmand, F., et al., A protease-activated pathway underlying Th cell type 2 activation and allergic lung disease. *J Immunol*, 2002. **169**(10): p. 5904-11.
474. Nagai, Y., et al., Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 667-72.

475. Yoneyama, M., et al., Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
476. Satoh, T., et al., LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(4): p. 1512-7.
477. Ireton, R.C. and M. Gale, Jr., RIG-I like receptors in antiviral immunity and therapeutic applications. *Viruses*. **3**(6): p. 906-19.
478. Netea, M.G. and J.W. van der Meer, Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*. **364**(1): p. 60-70.
479. Franchi, L., et al., Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 2009. **227**(1): p. 106-28.
480. Hisamatsu, T., et al., CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 2003. **124**(4): p. 993-1000.
481. Ogura, Y., et al., Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 4812-8.
482. Sugawara, Y., et al., Toll-like receptors, NOD1, and NOD2 in oral epithelial cells. *J Dent Res*, 2006. **85**(6): p. 524-9.
483. Uehara, A., et al., Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol*, 2007. **44**(12): p. 3100-11.
484. Tada, H., et al., Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*, 2005. **73**(12): p. 7967-76.
485. Inohara, et al., NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem*, 2005. **74**: p. 355-83.
486. Ting, J.P. and B.K. Davis, CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 387-414.
487. Martinon, F. and J. Tschopp, NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol*, 2005. **26**(8): p. 447-54.
488. Leipe, D.D., E.V. Koonin, and L. Aravind, STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer. *J Mol Biol*, 2004. **343**(1): p. 1-28.
489. Koonin, E.V. and L. Aravind, The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(5): p. 223-4.
490. Kadota, Y., K. Shirasu, and R. Guerois, NLR sensors meet at the SGT1-HSP90 crossroad. *Trends Biochem Sci*. **35**(4): p. 199-207.
491. Inohara, N. and G. Nunez, NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(5): p. 371-82.
492. Tattoli, I., et al., NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep*, 2008. **9**(3): p. 293-300.
493. Moore, C.B., et al., NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature*, 2008. **451**(7178): p. 573-7.
494. Ting, J.P., et al., The NLR gene family: a standard nomenclature. *Immunity*, 2008. **28**(3): p. 285-7.
495. Bertin, J., et al., Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 12955-8.
496. Inohara, N., et al., Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14560-7.
497. Chamailard, M., et al., Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol*, 2003. **5**(9): p. 581-92.
498. Kvarnhammar, A.M., T. Petterson, and L.O. Cardell, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in human eosinophils: activation by NOD1 and NOD2 agonists. *Immunology*. **134**(3): p. 314-25.

499. Petterson, T., et al., Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* **89**(2): p. 177-87.
500. Chamailard, M., et al., An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol*, 2003. **4**(7): p. 702-7.
501. Girardin, S.E., et al., Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 2003. **300**(5625): p. 1584-7.
502. Laroui, H., et al., L-Ala-gamma-D-Glu-meso-diaminopimelic acid (DAP) interacts directly with leucine-rich region domain of nucleotide-binding oligomerization domain 1, increasing phosphorylation activity of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2 and its interaction with nucleotide-binding oligomerization domain 1. *J Biol Chem.* **286**(35): p. 31003-13.
503. Gutierrez, O., et al., Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*, 2002. **277**(44): p. 41701-5.
504. Ogura, Y., et al., Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 2003. **52**(11): p. 1591-7.
505. Girardin, S.E., et al., Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 2003. **278**(11): p. 8869-72.
506. Inohara, N., et al., Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 2003. **278**(8): p. 5509-12.
507. Coulombe, F., et al., Increased NOD2-mediated recognition of N-glycolyl muramyl dipeptide. *J Exp Med*, 2009. **206**(8): p. 1709-16.
508. Sabbah, A., et al., Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol*, 2009. **10**(10): p. 1073-80.
509. Silva, G.K., et al., Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* **184**(3): p. 1148-52.
510. Shaw, M.H., et al., T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1267-74.
511. Tanabe, T., et al., Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J*, 2004. **23**(7): p. 1587-97.
512. Inohara, N., et al., An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 27823-31.
513. Kimura, Y., et al., A CaMK cascade activates CRE-mediated transcription in neurons of *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(10): p. 962-6.
514. Chin, A.I., et al., Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature*, 2002. **416**(6877): p. 190-4.
515. da Silva Correia, J., et al., SGT1 is essential for Nod1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(16): p. 6764-9.
516. Schorey, J.S. and A.M. Cooper, Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol*, 2003. **5**(3): p. 133-42.
517. Welter-Stahl, L., et al., Stimulation of the cytosolic receptor for peptidoglycan, Nod1, by infection with *Chlamydia trachomatis* or *Chlamydia muridarum*. *Cell Microbiol*, 2006. **8**(6): p. 1047-57.
518. Masumoto, J., et al., Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med*, 2006. **203**(1): p. 203-13.
519. Voss, E., et al., NOD2/CARD15 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin-2. *J Biol Chem*, 2006. **281**(4): p. 2005-11.
520. Boughan, P.K., et al., Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem*, 2006. **281**(17): p. 11637-48.
521. Zilbauer, M., et al., A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(10): p. 2404-16.
522. Kanneganti, T.D., M. Lamkanfi, and G. Nunez, Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 549-59.

523. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.
524. Martinon, F. and J. Tschopp, Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell*, 2004. **117**(5): p. 561-74.
525. Kersse, K., et al., NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev*. **22**(5-6): p. 257-76.
526. Franchi, L., et al., Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(1): p. 1-8.
527. Riteau, N., et al., Extracellular ATP is a danger signal activating P2X7 receptor in lung inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. **182**(6): p. 774-83.
528. Mariathasan, S., et al., Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 228-32.
529. Gasse, P., et al., Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(10): p. 903-13.
530. Martinon, F. and L.H. Glimcher, Gout: new insights into an old disease. *J Clin Invest*, 2006. **116**(8): p. 2073-5.
531. Kanneganti, T.D., et al., Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 233-6.
532. Muruve, D.A., et al., The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*, 2008. **452**(7183): p. 103-7.
533. Eisenbarth, S.C., et al., Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1122-6.
534. Allam, R., et al., Cutting edge: cyclic polypeptide and aminoglycoside antibiotics trigger IL-1beta secretion by activating the NLRP3 inflammasome. *J Immunol*. **186**(5): p. 2714-8.
535. Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting, The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol*. **29**: p. 707-35.
536. Schroder, K. and J. Tschopp, The inflammasomes. *Cell*. **140**(6): p. 821-32.
537. Petrilli, V., et al., Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(9): p. 1583-9.
538. Franchi, L., et al., Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J Biol Chem*, 2007. **282**(26): p. 18810-8.
539. Cassel, S.L., et al., The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(26): p. 9035-40.
540. Dostert, C., et al., Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, 2008. **320**(5876): p. 674-7.
541. Hornung, V., et al., Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*, 2008. **9**(8): p. 847-56.
542. Halle, A., et al., The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*, 2008. **9**(8): p. 857-65.
543. Chu, S.C., et al., Cathepsin B and cystatin C play an inflammatory role in gouty arthritis of the knee. *Clin Chim Acta*. **411**(21-22): p. 1788-92.
544. Pan, Q., et al., MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol*, 2007. **82**(1): p. 177-83.
545. Hsu, L.C., et al., A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(22): p. 7803-8.
546. Shaw, P.J., M.F. McDermott, and T.D. Kanneganti, Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*. **17**(2): p. 57-64.
547. McIntire, C.R., G. Yeretssian, and M. Saleh, Inflammasomes in infection and inflammation. *Apoptosis*, 2009. **14**(4): p. 522-35.
548. Ferwerda, G., et al., NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*, 2005. **1**(3): p. 279-85.

549. Girardin, S.E., et al., CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(8): p. 736-42.
550. Shimada, K., et al., The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomyphila pneumoniae* lung infection. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(4): p. e1000379.
551. Deshmukh, H.S., et al., Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, 2009. **77**(4): p. 1376-82.
552. Opitz, B., et al., Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(35): p. 36426-32.
553. Zola, T.A., E.S. Lysenko, and J.N. Weiser, Mucosal clearance of capsule-expressing bacteria requires both TLR and nucleotide-binding oligomerization domain 1 signaling. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7909-16.
554. Le Bourhis, L., S. Benko, and S.E. Girardin, Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. *Biochem Soc Trans*, 2007. **35**(Pt 6): p. 1479-84.
555. Sorbara, M.T. and D.J. Philpott, Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev*. **243**(1): p. 40-60.
556. Cloud-Hansen, K.A., et al., Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat Rev Microbiol*, 2006. **4**(9): p. 710-6.
557. Nigro, G., et al., Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(3): p. 682-95.
558. Herskovits, A.A., V. Auerbuch, and D.A. Portnoy, Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(3): p. e51.
559. Vavricka, S.R., et al., hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*, 2004. **127**(5): p. 1401-9.
560. Swaan, P.W., et al., Bacterial peptide recognition and immune activation facilitated by human peptide transporter PEPT2. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. **39**(5): p. 536-42.
561. Charrier, L., et al., hPepT1 mediates bacterial tripeptide fMLP uptake in human monocytes. *Lab Invest*, 2006. **86**(5): p. 490-503.
562. Aroian, R. and F.G. van der Goot, Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol*, 2007. **10**(1): p. 57-61.
563. Kao, C.Y., et al., Global functional analyses of cellular responses to pore-forming toxins. *PLoS Pathog*. **7**(3): p. e1001314.
564. Allison, C.C., et al., *Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism. *J Immunol*, 2009. **183**(12): p. 8099-109.
565. Lee, J., et al., pH-dependent internalization of muramyl peptides from early endosomes enables Nod1 and Nod2 signaling. *J Biol Chem*, 2009. **284**(35): p. 23818-29.
566. Marina-Garcia, N., et al., Clathrin- and dynamin-dependent endocytic pathway regulates muramyl dipeptide internalization and NOD2 activation. *J Immunol*, 2009. **182**(7): p. 4321-7.
567. Barnich, N., et al., Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol*, 2005. **170**(1): p. 21-6.
568. Eitel, J., et al., Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol*, 2008. **181**(4): p. 2664-71.
569. Kufer, T.A., et al., The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(2): p. 477-86.
570. Lecine, P., et al., The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *J Biol Chem*, 2007. **282**(20): p. 15197-207.
571. Travassos, L.H., et al., Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. **11**(1): p. 55-62.
572. Kufer, T.A., D.J. Banks, and D.J. Philpott, Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. **1072**: p. 19-27.
573. Clarke, T.B. and J.N. Weiser, Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol Rev*. **243**(1): p. 9-25.

574. Kim, J.G., S.J. Lee, and M.F. Kagnoff, Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect Immun*, 2004. **72**(3): p. 1487-95.
575. Travassos, L.H., et al., Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(44): p. 36714-8.
576. Opitz, B., et al., *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol*, 2006. **176**(1): p. 484-90.
577. Berrington, W.R., et al., NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur J Immunol*.
578. Viala, J., et al., Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*, 2004. **5**(11): p. 1166-74.
579. Mosa, A., et al., Nonhematopoietic cells control the outcome of infection with *Listeria monocytogenes* in a nucleotide oligomerization domain 1-dependent manner. *Infect Immun*, 2009. **77**(7): p. 2908-18.
580. Geddes, K., et al., Nod1 and Nod2 regulation of inflammation in the *Salmonella colitis* model. *Infect Immun*. **78**(12): p. 5107-15.
581. Le Bourhis, L., et al., Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during *Salmonella* pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun*, 2009. **77**(10): p. 4480-6.
582. Uehara, A., et al., Meso-diaminopimelic acid and meso-lanthionine, amino acids specific to bacterial peptidoglycans, activate human epithelial cells through NOD1. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 1796-804.
583. Grubman, A., et al., The innate immune molecule, NOD1, regulates direct killing of *Helicobacter pylori* by antimicrobial peptides. *Cell Microbiol*. **12**(5): p. 626-39.
584. Park, J.H., et al., Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J Immunol*, 2007. **179**(1): p. 514-21.
585. Deretic, V., Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev*. **240**(1): p. 92-104.
586. Ramjeet, M., et al., 'Nodophagy': New crossroads in Crohn disease pathogenesis. *Gut Microbes*. **1**(5): p. 307-315.
587. Fritz, J.H., et al., Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1250-7.
588. Berube, J., et al., Distinct intracellular signaling pathways control the synthesis of IL-8 and RANTES in TLR1/TLR2, TLR3 or NOD1 activated human airway epithelial cells. *Cell Signal*, 2009. **21**(3): p. 448-56.
589. Werts, C., et al., Nod1 and Nod2 induce CCL5/RANTES through the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(9): p. 2499-508.
590. Wolfert, M.A., et al., The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39179-86.
591. Yang, S., et al., Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun*, 2001. **69**(4): p. 2045-53.
592. Traub, S., et al., Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 8694-700.
593. van Heel, D.A., et al., Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(8): p. 2471-6.
594. Fritz, J.H., et al., Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(8): p. 2459-70.
595. Ghorpade, D.S., et al., Cooperative regulation of NOTCH1 protein-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling by NOD1, NOD2, and TLR2 receptors renders enhanced refractoriness to transforming growth factor-beta (TGF-beta)- or cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)-mediated impairment of human dendritic cell maturation. *J Biol Chem*. **286**(36): p. 31347-60.

596. Uehara, A., et al., Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol*, 2005. **7**(1): p. 53-61.
597. Strominger, J.L., Bacterial cell walls, innate immunity and immunoadjuvants. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1269-71.
598. Kobayashi, K.S., et al., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005. **307**(5710): p. 731-4.
599. Fritz, J.H., et al., Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 445-59.
600. Magalhaes, J.G., et al., Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity. *J Immunol*, 2008. **181**(11): p. 7925-35.
601. Magalhaes, J.G., et al., Nucleotide oligomerization domain-containing proteins instruct T cell helper type 2 immunity through stromal activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **108**(36): p. 14896-901.
602. Magalhaes, J.G., et al., Essential role of Rip2 in the modulation of innate and adaptive immunity triggered by Nod1 and Nod2 ligands. *Eur J Immunol*. **41**(5): p. 1445-55.
603. Duan, W., et al., Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. **126**(6): p. 1284-93 e10.
604. Hugot, J.P., et al., Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
605. McGovern, D.P., et al., Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(10): p. 1245-50.
606. McGovern, D.P., et al., NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut*, 2001. **49**(6): p. 752-4.
607. Miceli-Richard, C., et al., CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat Genet*, 2001. **29**(1): p. 19-20.
608. Ogura, Y., et al., A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001. **411**(6837): p. 603-6.
609. Kanazawa, N., et al., Early-onset sarcoidosis and CARD15 mutations with constitutive nuclear factor-kappaB activation: common genetic etiology with Blau syndrome. *Blood*, 2005. **105**(3): p. 1195-7.
610. Cho, J.H., The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(6): p. 458-66.
611. Villani, A.C., et al., Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet*, 2009. **41**(1): p. 71-6.
612. Masters, S.L., et al., Horror aut inflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease (*). *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 621-68.
613. Martinon, F., et al., Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*, 2006. **440**(7081): p. 237-41.
614. Kingsbury, S.R., P.G. Conaghan, and M.F. McDermott, The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res*. **4**: p. 39-49.
615. Petrilli, V. and F. Martinon, The inflammasome, autoinflammatory diseases, and gout. *Joint Bone Spine*, 2007. **74**(6): p. 571-6.
616. Weidinger, S., et al., Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*, 2005. **116**(1): p. 177-84.
617. Hysi, P., et al., NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet*, 2005. **14**(7): p. 935-41.
618. Kabesch, M., et al., Association between polymorphisms in caspase recruitment domain containing protein 15 and allergy in two German populations. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(4): p. 813-7.
619. Kinoshita, D., et al., A NOD2 gene polymorphism is associated with the prevalence and severity of chronic obstructive pulmonary disease in a Japanese population. *Respirology*. **17**(1): p. 164-71.

620. Barton, J.L., et al., The pattern recognition receptor Nod1 activates CCAAT/enhancer binding protein beta signalling in lung epithelial cells. *Eur Respir J*, 2007. **30**(2): p. 214-22.
621. Mansson, A., et al., NOD-like receptors in the human upper airways: a potential role in nasal polyposis. *Allergy*. **66**(5): p. 621-8.
622. Bogefors, J., et al., Nod1, Nod2 and Nalp3 receptors, new potential targets in treatment of allergic rhinitis? *Allergy*. **65**(10): p. 1222-6.
623. Kufer, T.A. and P.J. Sansonetti, NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol*. **12**(2): p. 121-8.
624. Tregoning, J.S. and J. Schwarze, Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clin Microbiol Rev*. **23**(1): p. 74-98.
625. Harris, N.L., et al., Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *J Exp Med*, 2002. **195**(3): p. 317-26.
626. Piggott, D.A., et al., MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 459-67.
627. Lambrecht, B.N. and H. Hammad, Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity*, 2009. **31**(3): p. 412-24.
628. Itano, A.A., et al., Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 47-57.
629. Kool, M., et al., Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*, 2008. **205**(4): p. 869-82.
630. Hurwitz, E.L. and H. Morgenstern, Effects of diphtheria-tetanus-pertussis or tetanus vaccination on allergies and allergy-related respiratory symptoms among children and adolescents in the United States. *J Manipulative Physiol Ther*, 2000. **23**(2): p. 81-90.
631. Odent, M. and E. Culpin, Effect of immunisation status on asthma prevalence. *Lancet*, 2003. **361**(9355): p. 434.
632. Magalhaes, J.G., et al., Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO Rep*, 2005. **6**(12): p. 1201-7.
633. Medoff, B.D., et al., CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol*, 2009. **182**(1): p. 623-35.
634. Henry, C.J., et al., IL-12 produced by dendritic cells augments CD8+ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *J Immunol*, 2008. **181**(12): p. 8576-84.
635. Alferink, J., et al., Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *J Exp Med*, 2003. **197**(5): p. 585-99.
636. Sudowe, S., et al., Prophylactic and therapeutic intervention in IgE responses by biolistic DNA vaccination primarily targeting dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(1): p. 196-203.
637. Hon, K.L., et al., Exploring CCL18, eczema severity and atopy. *Pediatr Allergy Immunol*. **22**(7): p. 704-7.
638. Chung, D.J., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*, 2009. **114**(3): p. 555-63.
639. Puccetti, P. and U. Grohmann, IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(10): p. 817-23.
640. Lei, Y., et al., Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med*. **208**(2): p. 383-94.
- Sohy, D., H. Yano, et al. (2009). "Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists." *J Biol Chem* **284**(45): 31270-9.

DeFranco (2009). *Immunité* de boeck Edition

WHO/NHLBI workshop report (2009). Global strategy for asthma management and prevention.

Available from URL: <http://www.ginasthma.com>.

