



HAL
open science

Les cellules Natural Killer (NK) dans l'allergie : effet de la chimiokine CCL18 sur les cellules NK humaines et rôle des cellules NK sur les éosinophiles

Ali Awad

► **To cite this version:**

Ali Awad. Les cellules Natural Killer (NK) dans l'allergie : effet de la chimiokine CCL18 sur les cellules NK humaines et rôle des cellules NK sur les éosinophiles. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S002 . tel-01144420

HAL Id: tel-01144420

<https://theses.hal.science/tel-01144420>

Submitted on 21 Apr 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

**Les cellules Natural Killer (NK) dans l'allergie :
Effet de la chimiokine CCL18 sur les cellules NK
humaines et rôle des cellules NK sur les éosinophiles**

Présentée et soutenue publiquement le 06 Mars 2014

Par

ALI AWAD

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Arnaud SCHERPEREEL
Service de Pneumologie et d'Oncologie thoracique, Pôle des
Maladies Respiratoires-Hôpital Albert Calmette CHRU de Lille

Président

Madame le Professeur Hamida HAMMAD
Laboratory of Immunoregulation and Mucosal Immunology,
University Hospital Ghent, Belgium

Rapporteur

Madame le Docteur Elena TOMASELLO
Centre d'Immunologie INSERM-CNRS de Marseille-Luminy

Rapporteur

Madame le Docteur Catherine DUEZ
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, U1019, Equipe 11, 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.**

Ce doctorat a été réalisé au sein de l'unité U774 à l'Institut Pasteur de Lille
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 mon travail de thèse :

Monsieur le professeur **Arnaud SCHERPEREEL** pour avoir accepté de présider ce jury.

Madame le professeur **Hamida HAMMAD** et madame le docteur **Elena TOMASELLO** pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteur.

Madame le docteur **Catherine DUEZ** pour avoir accepté d'être mon directeur officiel de thèse, une dédicace personnelle vous sera attribuée ultérieurement.

Un grand merci à tous les membres de l'unité U1019 :

A Anne TSICOPOULOS :

Je tiens tout d'abord à te remercier pour ton regard critique et tes conseils sur mes travaux de thèse, ainsi que ta disponibilité malgré le gros travail que tu assumes pour l'ensemble de l'équipe 11 de l'unité U1019. Je te remercie également pour tes motivations et tes encouragements qui m'ont permis d'avancer.

A Catherine DUEZ

Ces quatre années passées avec toi au laboratoire, m'ont permis d'évoluer sur le plan professionnel et personnel. Avec toutes les surprises de la recherche, nous avons pu franchir les obstacles pour que je puisse soutenir ma thèse malgré tous les problèmes. Merci pour ton encadrement et ta sympathie.

A Han VORNG et Philippe HAUW

Je vous remercie tous les deux pour les bons moments passés ensemble à partir de 7h. Quand j'arrivais au labo, le café était prêt pour le vampire. Oui, c'est moi le vampire du laboratoire. Le soir, avec la poche de sang, vous me souhaitiez une bonne journée à partir de 17h au lieu d'une bonne soirée. Des moments inoubliables. Han, merci pour ta gentillesse et ton intervention dans les gros prélèvements pour que la cinétique soit réalisée dans les bons temps. Monsieur Hauw, je n'ai pas encore gagné l'euro millions, du coup j'ai du mal à te payer pour revenir au laboratoire et passer les longues journées avec ton sourire et tes blagues.

A Jean PASTRE

A l'ancien Co-master 2, à mon ami. Nous avons passé de beaux moments mon petit médecin. C'était une année magnifique, avec beaucoup de stress mais de réussite aussi. Malgré les distances on gardera les contacts et on ne s'oubliera jamais.

Aux membres de l'unité U774 et l'unité U1019

A l'ancien directeur de l'unité U744, Philippe LASSALLE, merci de m'avoir accueilli pendant mon master 2 au sein de votre laboratoire.

A Philippe GOSSET, je tiens à te remercier pour tes conseils pendant mon master 2 et ton soutien même pendant ma thèse. Un grand merci à Muriel PICHAVANT aussi.

A Patricia merci beaucoup pour tes conseils ton aide et ta sympathie.

A Laetitia, Saliha, Aurélie, Benjamin, Joanne, Nathalie, Fan, Julie, Jean-Edward, Julien, Omar, Geneviève, merci pour la bonne ambiance et pour vos sourires.

Je tiens à remercier le ministère de l'Enseignement et de la Recherche de l'Université de Lille 2 de m'avoir financé pendant ma thèse.

A Ali SALMAN, Hassan SWAIDAN et leurs familles merci pour votre soutien moral.

Un merci exceptionnel à Manale d'avoir peaufiné ma thèse en présence de Dany et malgré le programme surchargé de Zaher.

Enfin, je tiens à remercier ma tante, Marwan et sa famille ainsi que mes frères et mes parents pour leur soutien quotidien malgré les distances. Mon père, ma mère, sans vous je n'aurais pas pu venir en France pour continuer mes études supérieures et arriver à ce stade. Je n'oublierai jamais vos larmes, vos sourires, vos conseils, vos motivations et vos prières. Oui me voilà finalement docteur comme vous l'avez toujours souhaité. Je tiens à remercier mon épouse Hanane pour le soutien qu'elle m'a toujours accordé surtout aux moments les plus difficiles de la thèse.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
RESUME	4
ABSTRACT	6
PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. CHAPITRE 1: L'ASTHME ALLERGIQUE	
1.1. Définition	8
1.2. Epidémiologie de l'asthme et conséquences socioéconomiques	9
1.3. Facteurs impliqués dans le développement et l'expression de la maladie	10
1.3.1. Facteurs liés à l'hôte	
1.3.2. Facteurs environnementaux	
1.4. La réaction inflammatoire de l'asthme allergique	12
1.5. Les différents acteurs cellulaires impliqués dans la réaction allergique	16
1.5.1. Les cellules dendritiques	16
a. <u>Capture de l'antigène</u>	
b. <u>Maturation et migration</u>	
c. <u>Présentation de l'antigène au lymphocyte T</u>	
d. <u>La Dc et la polarisation de la réponse T</u>	
1.5.2. Les lymphocytes T	20
a. <u>Les lymphocytes Th2</u>	
b. <u>Les lymphocytes Th17</u>	
c. <u>Les lymphocytes T régulateurs (Treg)</u>	
d. <u>Les lymphocytes Th9</u>	
1.5.3. Les lymphocytes B	27
1.5.4. Les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2)	27
1.5.5. Les cellules épithéliales des voies respiratoires	28
1.5.6. Les granulocytes tissulaires	29
a. <u>Les Mastocytes (MC)</u>	
b. <u>Les basophiles</u>	
c. <u>Les éosinophiles</u>	
d. <u>Les neutrophiles</u>	

1.6. Les principaux médiateurs de la réaction allergique	33
a. <u>Les IgE</u>	
b. <u>Les cytokines</u>	
c. <u>L'histamine</u>	
d. <u>Les médiateurs lipidiques</u>	
e. <u>Les chimiokines</u>	
2. CHAPITRE 2: LES EOSINOPHILES	
2.1. Morphologie et caractéristiques générales	47
2.2. Ontogénie et localisation	48
2.3. L'éosinophilie : un lien entre la réponse innée et la réponse adaptative	49
2.3.1. Les récepteurs exprimés par les éosinophiles	
2.3.2. Les cytokines secrétées par les éosinophiles	
2.4. La migration des éosinophiles vers les tissus enflammés	53
2.5. Les différents modes de dégranulation des éosinophiles	55
2.6. Les stimuli permettant la libération des médiateurs éosinophiliques	55
2.7. Les modifications phénotypiques des éosinophiles activés	56
2.8. Les médiateurs libérés et les fonctions effectrices des éosinophiles	57
a. <u>Les granules préformés</u>	
b. <u>Le LTC₄, médiateur lipidique</u>	
c. <u>Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)</u>	
d. <u>Les cytokines et les chimiokines</u>	
e. <u>L'éosinophile, cellule présentatrice d'antigène accessoire</u>	
f. <u>L'importance des éosinophiles dans l'asthme allergique</u>	
2.9. Apoptose et signaux de survie des éosinophiles	62
3. CHAPITRE 3: LES CELLULES NATURAL KILLER	
3.1. Introduction	64
3.2. Développement, maturation et diversité des cellules NK chez l'homme	64
3.2.1. Développement et maturation des cellules NK humaines	
a. <u>Stade 1 : les pro-NK</u>	
b. <u>Stade 2 : les pré-NK</u>	
c. <u>Stade 3 : les cellules NK immatures</u>	
d. <u>Stade 4 : les NK CD56^{bright}</u>	
e. <u>Stade 5 : les étapes de maturation des cellules NK</u>	

3.2.2. Diversité des cellules NK	
<i>i. Récepteur de cytokines</i>	
<i>ii. Récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion</i>	
<i>iii. Récepteurs des cellules NK (NKR) et CD16</i>	
3.3. Activation et inhibition des cellules NK/ intégration des différents signaux	72
3.3.1. La reconnaissance par la cellule NK	
3.3.2. Les récepteurs des cellules NK	
3.3.2.1. La superfamille des lectines de type C	
<i>i. Les hétérodimères CD94/NKG2</i>	
<i>ii. Le NKG2D</i>	
3.3.2.2. les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines	
<i>i. Les récepteurs KIR</i>	
<i>ii. Les récepteurs ILT/LIR</i>	
3.3.2.3. les NCR (Natural Cytotoxicity Receptor)	
3.3.2.4. Les récepteurs de Fc des immunoglobulines	
3.3.2.5. Les récepteurs Toll	
3.3.2.6. Les récepteurs de la famille SLAM	
3.3.2.7. Le récepteur DNAM-1	
3.3.2.8. Le récepteur CD2	
3.3.3. Situations pathologiques reconnues par les cellules NK	
3.4. Homéostasie des cellules NK	85
3.4.1. Distribution des cellules NK	
3.4.2. Circulation des cellules NK	
3.4.3. Durée de vie et facteurs de survie des cellules NK	
3.5. Fonctions effectrices des cellules NK	88
3.5.1. Mécanismes de cytotoxicité	
3.5.1.1. Formation de la synapse immunologique	
3.5.1.2. Granules lytiques et modes d'action	
3.5.2. Production de cytokines	
3.6. Rôles des cellules NK dans l'immunité	92
3.6.1. Cellules NK et défense anti-tumorale	
3.6.2. Cellules NK et défense anti-virale	

3.6.3. Coopération entre les cellules NK et les cellules de l'immunité

3.6.3.1. Interactions entre les cellules NK et cellules dendritiques

3.6.3.2. Interactions entre les cellules NK et macrophages

3.6.3.3. Interactions entre les cellules NK et lymphocytes

3.6.3.4. Interactions entre les cellules NK et neutrophiles

3.6.3.5. Interactions entre les cellules NK et éosinophiles

DEUXIEME PARTIE: ARTICLES

- 1. Natural killer cells from allergic donors are defective in their response to CCL18 chemokine** **101**
- 2. Natural Killer cells induce eosinophils activation and apoptosis** **125**

TROISIEME PARTIE: DISCUSSION ET PERSPECTIVES **149**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **156**

ABREVIATIONS

AICL: Activation –Induced C-type Lectin
aNKIS: Activating NK cell Immunological Synapse
ASGM1: Asialo GM-1
CLA: Cutaneous Lymphocyte Antigen
CMN: Cellule Mononuclée
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène
cSMAC: central Supramolecular Activation Cluster
DC: Dendritic cell
Df: *Dermatophagoides farinae*
DNAM-1: DNAX Accessory molecule-1
EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
ECP: Eosinophil Cationic Protein
EDN: Eosinophil Derived Neurotoxin
EPO: Eosinophil Peroxydase
GM-CSF: Granulocyte - monocyte- Colony - Stimulating Factor
HBR: Hyperréactivité Bronchique
HEV: High Endothelium Venules
HSC: Hematopoietic Stem Cells
IL: Interleukine
ILT: Immunoglobulin Like Transcripts
ICAM-1: Intercellular adhesion molecule -1
ILC: Cellule Lymphoïde innée
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
LBA: Lavage Bronchoalvéolaire
LFA-1: Leukocyte Function-Associated Antigen-1
LIF: Leukaemia Inhibitory Factor
LIR: Leucocytes Ig Like Receptors
LTC: Leucotriène C

LTi: Lymphoid Tissue inducer cells
MBP: Major Basic Protein
MCMV: Murin Cytomegalovirus
MD-DC: monocyte derived-dendritic cells
mDC: myeloid Dendritic Cell
MGG: May Grunwald Giemsa
MIF: Macrophage migration Inhibitory Factor
MTOC: Microtubule-Organizing Center
NK: Natural Killer
NKR: Natural Killer Cell Receptors
OVA: Ovalbumine
PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAF: Platelet-Activating Factor
pDC: plasmacytoid dendritic cell
PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PRR: Pattern-Recognition Receptors
pSMAC: Peripheral Supra-molecular Activation Cluster
RAG-1: Recombinase Activating Gene-1
RAG-2: Recombinase Activating Gene-2
ROS: Reactive oxygen Species
SI: Synapse Immunologique
S1P: Sphingosine-1 Phosphate
SCF: Stem Cell Factor
Stat: Signal Transducers and activators transcription
TGF: Transforming Growth Factor
TLR: Toll-Like Receptors
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg: Lymphocyte T régulateur
TSLP: Thymic stromal lymphopoietine

ULBP: UL16 Binding Protein

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VHC: Virus de l'Hépatite C

RESUME

Les maladies allergiques sont en constante augmentation tant en prévalence qu'en gravité. Les mécanismes physiopathologiques connus impliquent l'induction d'une réponse Th2 par les cellules dendritiques, conduisant à une production d'IgE et une inflammation, notamment liée à un recrutement d'éosinophiles. Les éosinophiles sont fortement impliqués dans les dommages et les dysfonctionnements tissulaires et participent à l'entretien de l'inflammation. Différentes cellules de l'immunité innée sont impliquées dans le contrôle de la réaction allergique. Parmi elles, les cellules Natural Killer (NK), connues essentiellement pour leurs fonctions anti-tumorales et anti-microbiennes, pourraient réguler différents aspects de la réaction allergique comme le suggèrent quelques études effectuées chez l'homme ou la souris. Dans le sang périphérique de patients asthmatiques, les cellules NK présentent des capacités cytotoxiques accrues, ainsi qu'une prédominance de cellules NK2 (productrices d'IL-5 et d'IL-13) comparativement à la prédominance de cellules NK1 (productrices d'IFN- γ) chez les sujets non allergiques. Chez des patients atteints de dermatite atopique, le nombre et la cytotoxicité des cellules NK périphériques sont diminués, ainsi que leur capacité à produire de l'IFN- γ . De plus, le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques est moins efficace chez le sujet asthmatique, menant ainsi à une capacité réduite de production d'IFN- γ par les cellules NK. Dans des modèles murins d'inflammation pulmonaire, la déplétion en cellules NK par l'anti-NK1.1 ou l'anti-ASGM1 avant l'immunisation inhibe l'éosinophilie pulmonaire, l'infiltrat des lymphocytes T CD3⁺ et l'augmentation des taux d'IL-4, IL-5 et IL-12 dans le lavage bronchoalvéolaire. Néanmoins, la déplétion avec l'anti-ASGM1 après l'établissement de l'inflammation éosinophilique retarde sa résolution, suggérant un rôle double des cellules NK dans l'inflammation allergique.

Nous avons abordé le recrutement et la fonction des cellules NK humaines dans l'allergie premièrement par le biais de l'analyse *in vitro* du rôle de CCL18 sur les cellules NK. Cette chimiokine est préférentiellement produite au niveau du poumon et possède une double fonction dans la pathologie allergique puisqu'elle recrute les lymphocytes Th2, mais également les lymphocytes T régulateurs et génère des cellules dendritiques tolérogènes capables d'induire des lymphocytes T régulateurs, uniquement chez des donneurs non allergiques. Nous avons évalué la réponse des cellules NK de sujets allergiques vis-à-vis de CCL18 et l'avons comparée à celle de cellules NK provenant de donneurs non allergiques. Nos travaux ont montré que CCL18 attire *in vitro* les cellules NK de sujets non allergiques et induit leur

cytotoxicité, de façon dépendante des protéines G. Par contre, les cellules NK de sujets allergiques ne répondent pas au CCL18. Cette chimiokine n'a aucun effet sur la prolifération des cellules NK, mais pourrait réguler négativement la production d'IFN- γ .

La deuxième partie du travail de thèse s'est basée sur l'hypothèse d'un dialogue entre les cellules NK et les éosinophiles lequel modifierait leurs fonctions respectives. Des cellules NK et des éosinophiles autologues ont été cocultivés pendant 3 et 12h, à différents ratios. Nous avons montré que les cellules NK activent directement les éosinophiles comme en témoignent l'augmentation de la libération de l'eosinophil cationic protein (ECP), l'eosinophil derived neurotoxin (EDN), et de l'expression du CD63 (marqueur de dégranulation), du CD69 et la diminution de l'expression du CD62L sur les éosinophiles vivants lors de la coculture. De plus, la coculture avec les cellules NK induit l'apoptose et la mortalité des éosinophiles dès la première heure de coculture. Cependant l'apoptose et la mortalité des cellules NK ne sont pas modifiées. La fixation des cellules NK empêche presque totalement l'activation et l'apoptose des éosinophiles, suggérant l'implication à la fois de molécules de surface et de facteurs solubles. Les interactions entre molécules de surface restent encore à déterminer, et l'IFN- γ et le TGF- β ne sont pas impliqués. Cependant, les voies de signalisation p38MAPkinase (mitogen-activated protein kinases), ERK (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinases) et PI₃kinase (Phosphatidylinositide 3-kinases) interviennent dans l'activation des éosinophiles. Concernant l'apoptose des éosinophiles induite par les cellules NK, la voie mitochondriale est davantage impliquée que la voie des caspases.

En résumé, ces travaux ont permis de montrer que les cellules NK de sujets allergiques présentent un dysfonctionnement dans la réponse vis-à-vis de CCL18 comparativement aux sujets non-allergiques. De plus, nos résultats suggèrent que les cellules NK pourraient réguler l'inflammation à éosinophiles en induisant leur activation et/ou leur apoptose.

ABSTRACT

Allergic diseases are steadily increasing both in prevalence and severity. Known physiopathological mechanisms involve the induction of a Th2 response by dendritic cells, leading to IgE production and inflammation, in particular linked to the recruitment of eosinophils. Eosinophils are heavily involved in injury and tissue dysfunction and contribute to the maintenance of inflammation. Different cells of innate immunity were shown to be involved in the control of allergic reaction. Among them, natural killer (NK) cells, primarily known for their anti-tumor and anti-microbial functions, may regulate different aspects of allergic reaction as suggested by studies in humans or mice. In the peripheral blood of patients with asthma, NK cells exhibit increased cytotoxic capacity, and a predominance of NK2 cells (producing IL-5 and IL-13) compared to the prevalence of NK1 cells (producers of IFN- γ) in non-allergic subjects. In patients with atopic dermatitis, the number and cytotoxicity of peripheral NK cells are reduced, as well as their ability to produce IFN- γ . Moreover, the dialogue between NK cells and dendritic cells is less effective in asthmatic patients, leading to a reduced capacity of IFN- γ production by NK cells. In murine models of pulmonary inflammation, depletion of NK cells by anti-NK1.1 or anti-ASGM1 before immunization inhibits pulmonary eosinophilia, the infiltration of CD3⁺ T cells and increased levels of IL-4, IL-5 and IL-12 in the bronchoalveolar lavage. However, depletion with anti-ASGM1 after the establishment of eosinophilic inflammation delays its resolution, suggesting a dual role of NK cells in allergic inflammation.

We studied the recruitment and function of human NK cells in allergy through in vitro analysis of the role of CCL18 on NK cells. This chemokine is preferentially produced in the lungs and has a dual role in allergic diseases since it recruits Th2 cells but also regulatory T cells and generates tolerogenic dendritic cells capable of inducing regulatory T cells only from non-allergic donors. We evaluated the response of NK cells in allergic subjects towards CCL18 and compared it to that of NK cells from non-allergic donors. We showed that CCL18 attracts NK cells from non-allergic subjects and induces their cytotoxicity in a G protein dependent pathway. However, NK cells from allergic subjects did not respond to CCL18. This chemokine has no effect on the proliferation of NK cells, but may negatively regulate IFN- γ production.

The second part of the thesis is based on the hypothesis of a dialogue between NK cells and eosinophils which would modify their respective functions. NK cells and autologous eosinophils were cocultured during 3 and 12 hours, at different ratios. We showed that NK cells directly activate eosinophils as evidenced by the increased release of eosinophil cationic

protein (ECP), eosinophil derived neurotoxin (EDN), and the expression of CD63 (degranulation marker), CD69, and reduced expression of CD62L on living eosinophils. In addition, coculture with NK cells induced apoptosis and mortality of eosinophils in the first hours of coculture. However, apoptosis and death of NK cells were not changed. Fixation of NK cells prevented almost completely the activation and apoptosis of eosinophils, suggesting the involvement of both surface molecules and soluble factors. These interactions require cell contact, but the molecules involved remain to be determined. Concerning soluble factors, IFN- γ and TGF- β are not involved in these mechanisms. However, the signaling pathways p38MAPkinase (mitogen-activated protein kinase), ERK (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) and PI₃-kinase (phosphatidylinositide 3-kinase) are involved in eosinophils activation. Concerning eosinophil apoptosis induced by NK cells, the mitochondrial pathway is more involved than the caspase pathway.

In summary, our studies show that NK cells from allergic patients exhibit a defect in their response towards CCL18 compared to non-allergic subjects. In addition, these results suggest that NK cells may regulate eosinophilic inflammation by inducing their activation and / or apoptosis.

CHAPITRE 1 : L'ASTHME ALLERGIQUE

1.1. 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"*. 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 épaissement de la sous-muqueuse. Des stimuli normalement inoffensifs entraînent 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.

1.2. Epidémiologie de l'asthme et conséquences socioéconomiques

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 (Martin-Fontecha et al.), estiment le nombre de sujets asthmatiques à 300 millions à travers le monde. Cette pathologie cause 250000 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. Quant aux coûts indirects, ils 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.

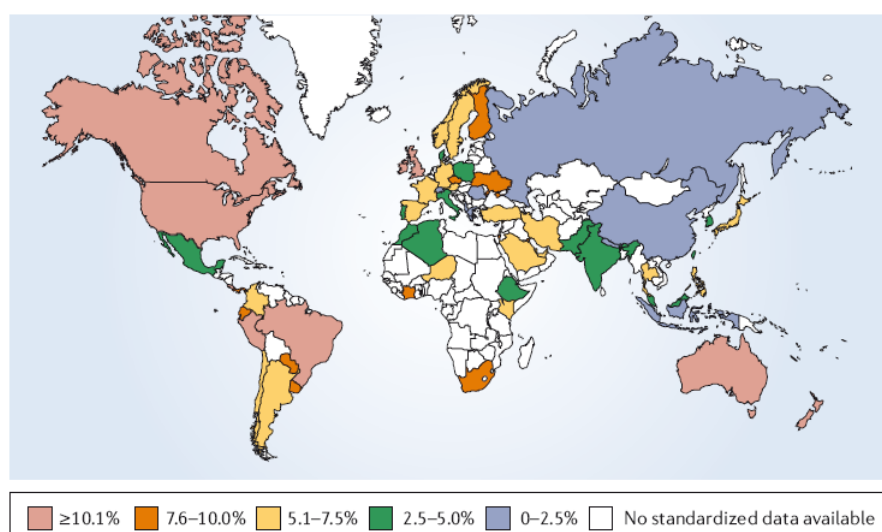


Figure 1: La prévalence de l'asthme dans le monde. D'après Devereux, 2006.

1.3. 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...).

1.3.1. 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 (Vercelli 2008) (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 mucoale 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) (Hviid et al. 2008), (Balicer et al. 2007), (Chetta et al. 2005), (Subbarao et al. 2009), (Beuther et al. 2006) sont rattachés à l'asthme. Notons aussi que des facteurs endocriniens semblent être impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme (Schatz 1999; Haggerty et al. 2003).

1.3.2. 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.

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 (Sporik et al. 1990; Wahn et al. 1997; Sporik et al. 1999), (Simpson et al. 2005). 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 (Polosa et al. 2008), (Baena-Cagnani et al. 2009), (James et al. 2005; Holgate et al. 2006; McCreanor et al. 2007). L'ozone, les moisissures et l'humidité semblent aussi être des facteurs aggravants (Peden et al. 2010). 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, a 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 (Yazdanbakhsh et al. 2002). Par ailleurs, des études ont montré une relation inverse entre l'asthme et l'exposition directe à l'environnement rural riche en endotoxine (von Mutius et al. 2008), (Pelosi et al. 2005; Ma et al. 2009), (Von Ehrenstein et al. 2000), (Shirakawa et al. 1997), (Herz et al. 2000), (Aaby et al. 2000), (Hopfenspirger et al. 2002). 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 (Rook 2009). De plus il existe une corrélation entre le diabète de type 1 et l'asthme (Stene et al. 2001). Ces observations a 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 suscitées. 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 (Hansen et al. 1999), (Jackson et al. 2010), (Yazdanbakhsh et al. 2004; Leonardi-Bee et al. 2006). Dans l'ensemble les études semblent montrer que les infections entretiennent une relation ambiguë avec l'asthme, étant tantôt capables 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 entraînera une réponse immunitaire protectrice (tolérance) contre la maladie.

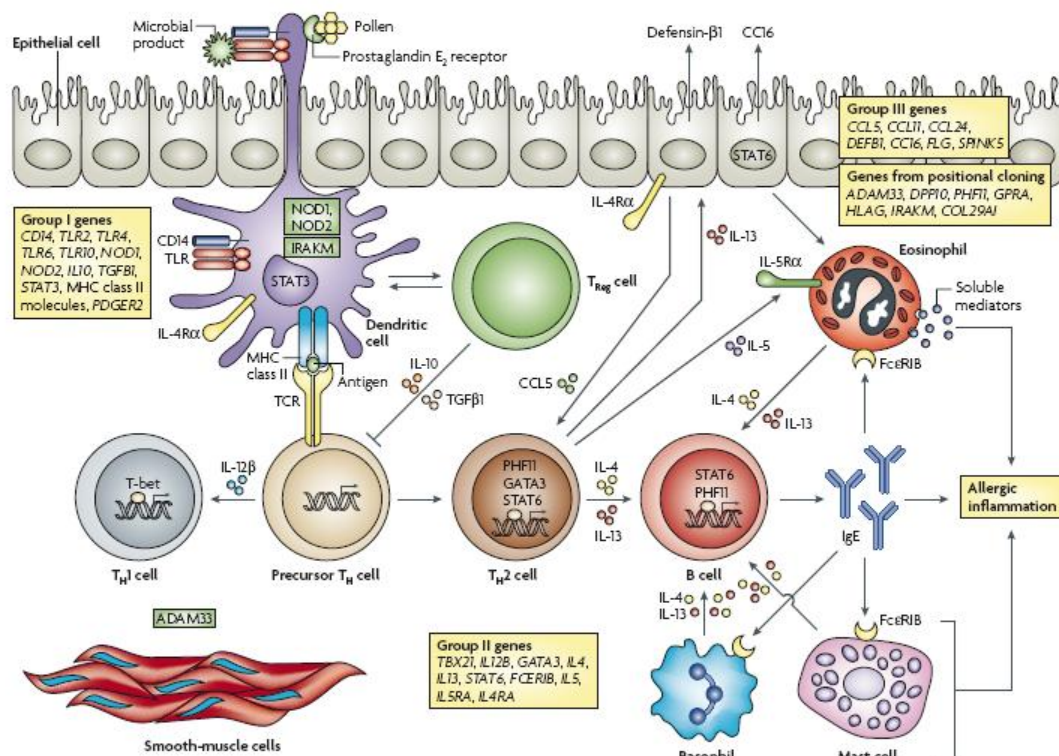


Figure 2: Gènes de susceptibilité de l'asthme. D'après Vercelli D, 2008.

1.4. 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 (Galli et al. 2008) (Figure 3).

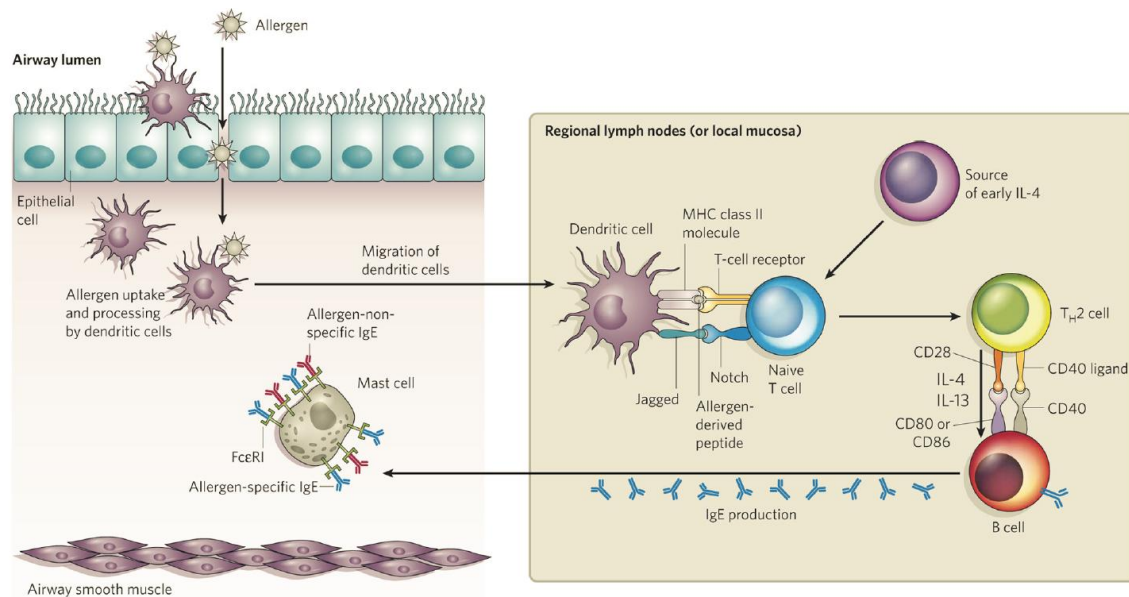


Figure 3 : phase de sensibilisation aux allergènes. L'allergène peut soit être capté puis apprêté par les DC intraépithéliales qui pénètrent alors dans le tissu pulmonaire, soit pénétrer directement dans la sous-muqueuse où il est capté par les DC présentes. Cette pénétration directe ne peut être réalisée que par les allergènes possédant une activité protéase. Cette dernière permet le clivage des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Les DC activées mûrissent et migrent vers les ganglions drainants où elles présentent le complexe CMII/peptide antigénique aux lymphocytes T naïfs. En présence d'IL-4, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th2 produisant entre autre de l'IL-4 et de l'IL-13. La production de ces deux cytokines par les lymphocytes Th2 et la liaison des molécules de costimulation, conduit à la production d'IgE par les lymphocytes B. Ces IgE se diffusent localement puis de façon systémique où ils se fixent sur les mastocytes résidant dans les tissus via le FcεRI (récepteur de forte pour les IgE). Les Th2 vont aussi migrer vers les voies aériennes où ils vont s'amplifier et devenir des lymphocytes Th2 effecteurs mémoire. D'après Galli SJ, 2008.

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 leucotriènes, l'histamine, les prostanoïdes) ou cytokiniques et chimiotactiques (MacGlashan 2008). Ces derniers induisent une vasodilatation et une bronchoconstriction et augmentent la production de mucus par les cellules caliciformes et la perméabilité vasculaire (Figure 4).

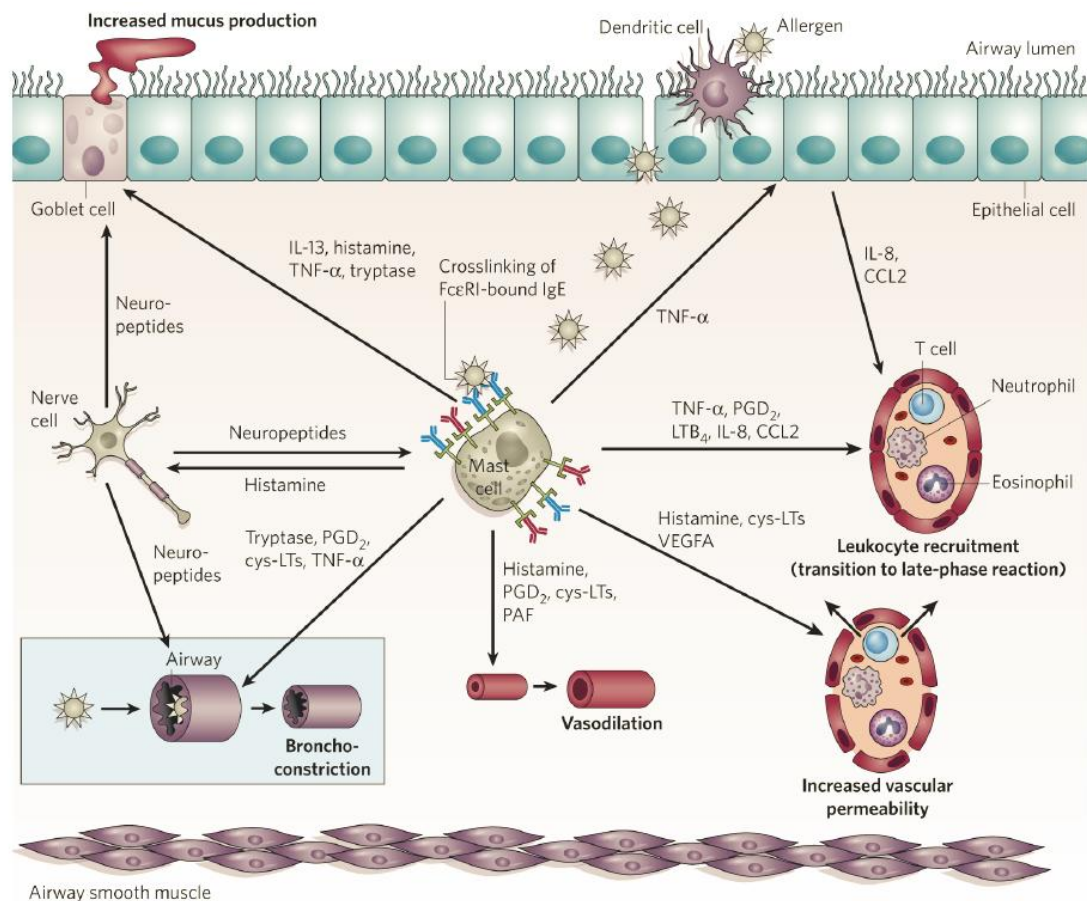


Figure 4 : La réaction immédiate de la phase effectrice. Lors d'un contact ultérieur avec un allergène, ceux-ci se fixent sur les complexes IgE/FcεRI présents à la surface des mastocytes. Cette fixation induit la dimérisation des récepteurs aux IgE, aboutissant à la libération de médiateurs préformés et néoformés et à l'augmentation de la synthèse de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Les médiateurs rapidement libérés sont responsables de la bronchoconstriction, de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production de mucus. Les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement des cellules inflammatoires. D'après Galli SJ, 2008.

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 (Figure 5). 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 MBP, ECP, EPO, EDN, 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 épaissement de la membrane basale et une hyperplasie des cellules musculaires lisses.

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

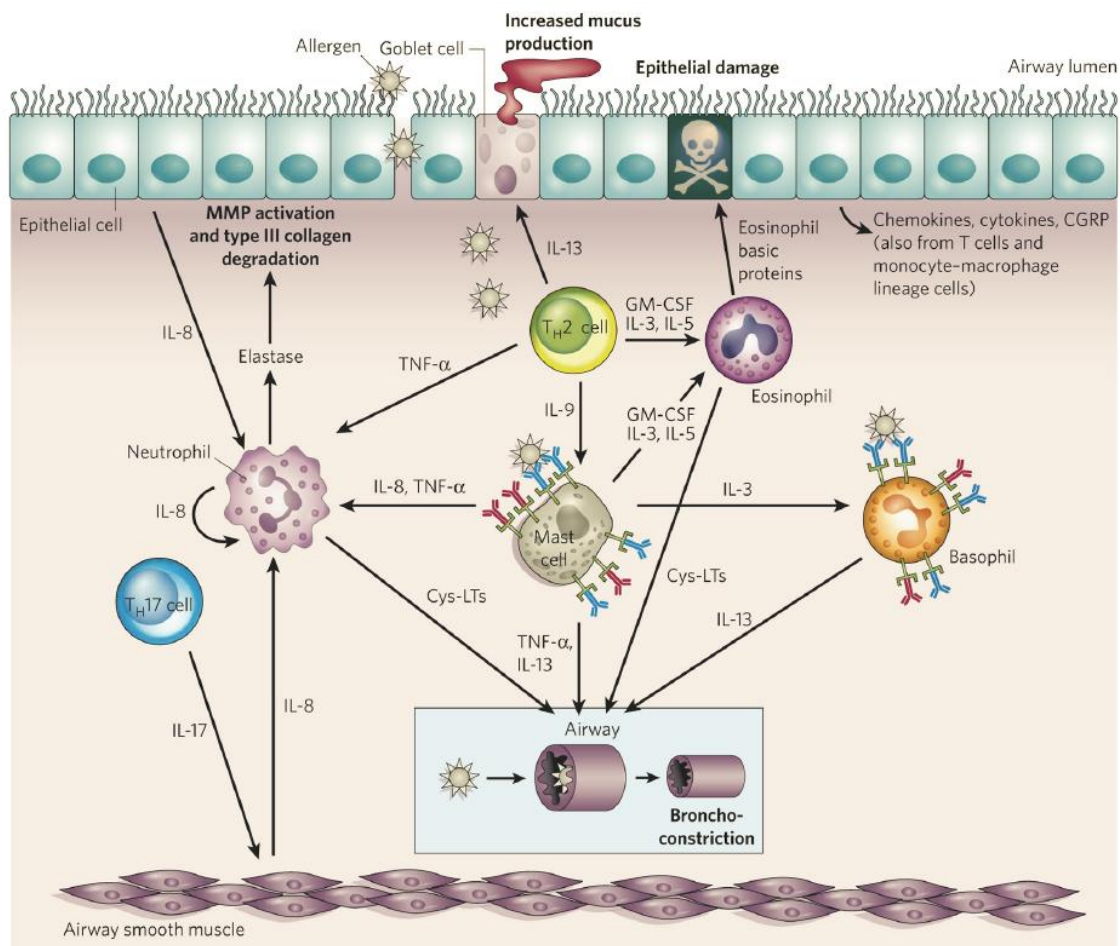


Figure 5 : La réaction retardée de la phase effectrice. Cette phase apparaît 6 à 12heures après l'exposition à l'allergène et est caractérisée par une inflammation de la muqueuse et des lésions de l'épithélium induites par un afflux de cellules inflammatoires produisant des substances pro-inflammatoires et des cytokines Th2. D'après Galli SJ, 2008.

1.5. Les différents acteurs cellulaires impliqués dans la réaction allergique

1.5.1. Les cellules dendritiques

a. 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 (Hammad et al. 2008), (Bimczok et al. 2006), (Jahnsen et al. 2006). La figure 6 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, augmentant ainsi la perméabilité de l'épithélium et l'accessibilité aux cellules dendritiques (Runswick et al. 2007). 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 endocyter (Figure 7) (les récepteurs type lectine-C et les récepteurs de type Fc) (Fanger et al. 1996), (Barrett et al. 2009b).

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. 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 les allergènes d'acariens retrouvés dans les poussières de maison sont de puissants activateurs de TLR (Trompette et al. 2009). 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 (Trompette et al. 2009), (Shreffler et al. 2006). De plus, l'allergène HDM peut se fixer sur le récepteur TLR4 des cellules dendritiques de la muqueuse

des voies respiratoires en induisant ainsi une inflammation allergique de type Th2 (Hammad et al. 2009).

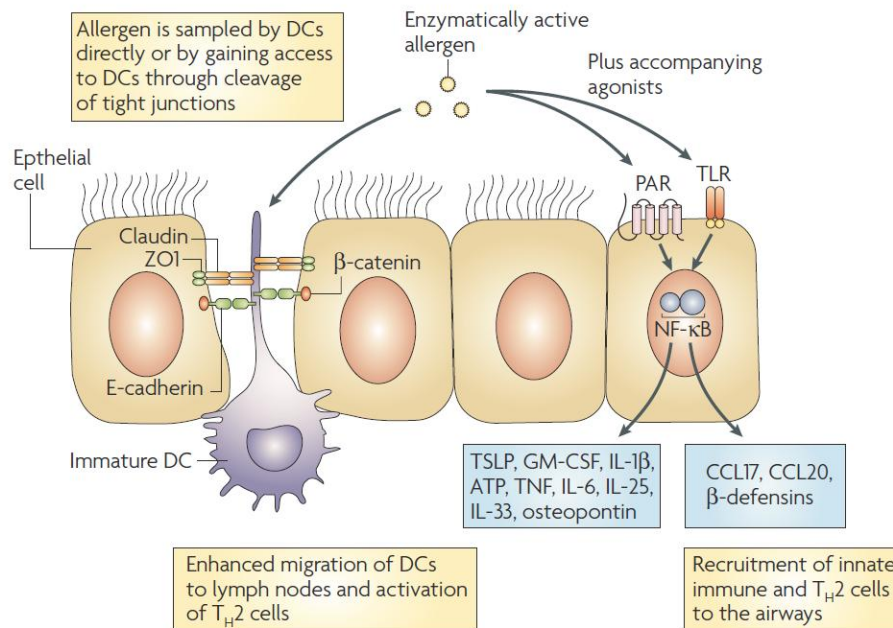


Figure 6 : Interaction entre les cellules épithéliales, les DCs et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique. D'après Hammad H, 2008.

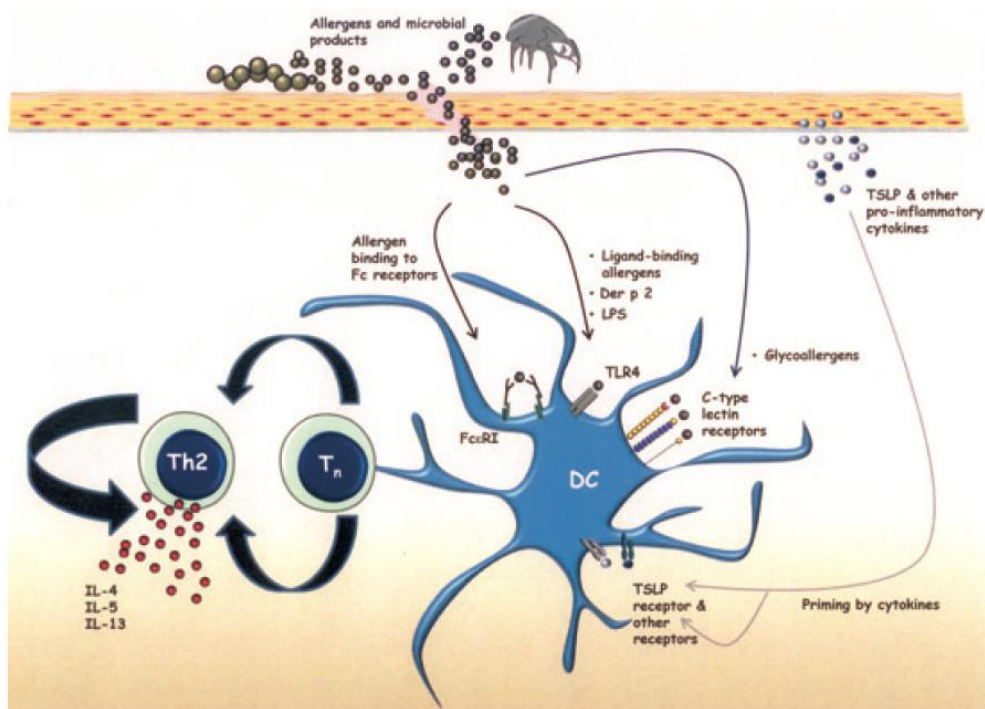


Figure 7 : Activation des cellules dendritiques via les récepteurs membranaires par les allergènes provenant de sources diverses. D'après Platts-Mills, T.A, 2011.

b. 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) (Humrich et al. 2006; Hammad et al. 2007). Récemment, le récepteur CCR2 a été impliqué également dans le contrôle de la migration des DCs pulmonaires (Otero et al.). 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.

c. 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 (Krummel et al. 2000).

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 (figure 8).

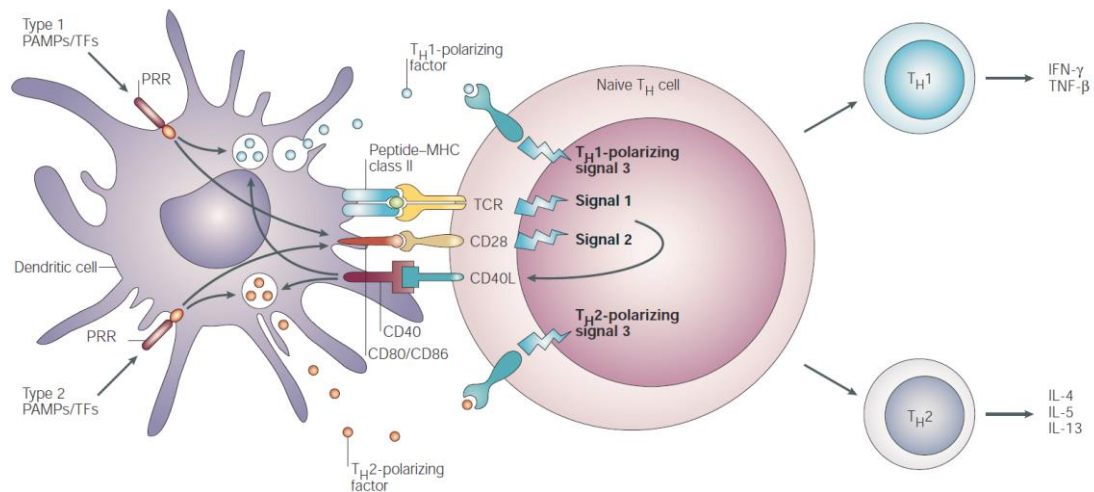


Figure 8 : Interaction entre les cellules dendritiques et le lymphocyte T. le schéma reprend les trois types d'interaction nécessaires à une polarisation T efficace. Le premier signal est apporté à la présentation antigénique vis le CMHII au TCR. Le second signal provient des molécules de co-stimulation 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 (IL-12, IFN- γ ou ICAM-I pour les Th1 et IL-4, IL-13, ou OX40L pour les Th2) apportés essentiellement par la DC activée par les PRR. D'après Kapsenberg, M.L, 2003.

d. 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 (Banchereau et al. 2000), 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 (Tanaka et al. 2000).

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 (Feili-Hariri et al. 2005). 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 (Iwamoto et al. 2005), 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 (Chen et al. 2006), (Delespesse et al. 1999). 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 (Hammad et al. 2001), (Hammad et al. 2003), (Charbonnier et al. 2003). D'autres molécules de surface comme OX40L et ICOSL (inducible costimulator ligand) ont été impliquées dans le développement d'une réponse Th2 (Simpson et al.; Tesciuba et al. 2001; Ito et al. 2005; Simpson et al. 2010). En effet, selon les signaux de danger rencontrés et leur état de maturation, les DCs sont responsables de la réponse immune ou de la tolérance. En condition d'homéostasie, les DCs maintiennent un état de tolérance face aux antigènes inoffensifs (Steinman 2003). 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 (Akbari et al. 2003a). Les cellules Treg ainsi produites contrôlent l'inflammation en produisant des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- β .

1.5.2. 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.

a. Les 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 (Barnes 2008b),(Zhu et al. 2010). 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) (Barnes 2008a). Les cellules Th2 différenciées sont recrutées dans le site inflammatoire par la production des chimiokines CCL1, CCL2, CCL11, CCL22 et CCL17 (Teran 2000). 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 (Barnes 2008a). Les voies Th1 et Th2 sont antagonistes.

b. Les 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 (Infante-Duarte et al. 2000). Ces cellules ont été nommées Th17 (Harrington et al. 2005). Elles produisent en effet IL-17A et IL-17F mais aussi de IL-22, IL-21 et IL-26 (Wilson et al. 2007; Cheung et al. 2008). Elles expriment spécifiquement les facteurs de transcription ROR γ t et ROR α (Ivanov et al. 2006), (Deo et al. 2008), (Liu et al. 2009b) 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 (Ivanov et al. 2006) 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 (Wilson et al. 2007); 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 (Volpe et al. 2008). L'axe IL17/IL23 a été initialement décrit comme permettant la mise en place d'une défense antibactérienne et antifongique (Happel et al. 2005; Hohl et al. 2006). Par ailleurs, certains motifs bactériens semblent favoriser la

différenciation Th17 par une activation spécifique des cellules dendritiques (van Beelen et al. 2007).

Des études ont trouvé une association entre les lymphocytes Th17 et l'asthme (Wakashin et al. 2008),(Choi et al. 2010). L'IL17 est retrouvé dans les expectorations, les lavages broncho-alvéolaires, le sérum et les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques (Wong et al. 2001), (Molet et al. 2001), (Hashimoto et al. 2005; Bullens et al. 2006), (Pene et al. 2008). De plus, le niveau d'expression d'IL-17 est étroitement corrélé au degré de sévérité de l'hypersensibilité bronchique chez les patients asthmatiques (Barczyk et al. 2003). 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 (Molet et al. 2001). 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 (Hirota et al. 2007). Les lymphocytes Th17 peuvent également stimuler la production des mucines, MUC5AC et MUC5B, par les cellules épithéliales bronchiques humaines *in vitro* (Chen et al. 2003b). 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 (Schnyder-Candrian et al. 2006). 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'HRB (Wilson et al. 2009). Ces résultats suggèrent que les lymphocytes Th17 participent à la physiopathologie de l'asthme.

c. Les 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 (Provoost et al. 2009), (Mamessier et al. 2005; Robinson 2009).

Il existe deux classes de lymphocytes T régulateurs: Les T régulateurs naturels et les T régulateurs adaptatifs. Les lymphocytes T régulateurs naturels, caractérisés par un phénotype CD4⁺CD25⁺, sont présents spontanément sans induction. Cette population est d'origine thymique et représente environ 5% des lymphocytes T circulants (Sakaguchi et al. 2006). Différents marqueurs ont été proposés pour identifier spécifiquement ces Treg. Parmi ceux-ci, nous citons le CD25, le GITR, le CTLA-4, CD103 et FoxP3 (Forkhead box3). Ce dernier marqueur est essentiel à leur développement et leurs fonctions (Fontenot et al. 2003; Hori et al. 2003). Globalement, les mécanismes de suppression de ces populations régulatrices sont plutôt indépendants de la production de cytokine exogène, mais dépendants d'un contact cellulaire. Les Treg naturels semblent par ailleurs capables d'induire *in vitro* des Treg adaptatifs à partir de T helper conventionnels (Jonuleit et al. 2002), (Dieckmann et al. 2002). La seconde grande catégorie de Lc Treg est constituée de 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 celui d'IL-10 par la DC, associés cette fois-ci à une faible stimulation par des molécules CD80-86/CD28 sont nécessaires à leurs différenciations. 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 (Ostroukhova et al. 2004). 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 (Collison et al. 2007). 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 (Fiorentino et al. 1989) 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 (Allavena et al. 1997), la production de cytokines par les mastocytes (Arock et al. 1996) ainsi que la survie et la fonction des éosinophiles (Takanaski et al. 1994). 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 (Akdis et al. 2000) 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 (Kearley et al. 2005). 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 (Grunig et al. 1997), (Rubtsov et al. 2008). 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 l'HRB (Presser et al. 2008). 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 (Piccirillo et al. 2002). Toutefois, plusieurs travaux ont évoqué son rôle dans la suppression *in vitro* (Nakamura et al. 2001) mais également *in vivo* dans un modèle d'asthme (Ostroukhova et al. 2004).

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. (Grossman et al. 2004), (Gondek et al. 2005), (Zhao et al. 2006). 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 (Deaglio et al. 2007), et d'autre part, maintient une anergie et facilite la génération de Treg adaptatifs en favorisant la production de TGF- β (Zarek et al. 2008) par les cellules cibles.

De nombreuses données suggèrent l'implication des Treg, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ dans la résolution de l'asthme allergique (Leech et al. 2007), (Carson et al. 2008), 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 (Lewkowich et al. 2005). Chez le rat, le développement *in vivo* de Treg adaptatifs spécifiques de l'allergène des CD25⁺FoxP3⁺CTLA⁺, après challenge allergénique, a été démontré (Strickland et al. 2006). 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 (Akdis et al. 2004). 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 (Heaton et al. 2005). 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 (Ling et al. 2004). 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 (Grindebacke et al. 2004), 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 (Nguyen et al. 2009). 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 (Nguyen et al. 2009).

d. Les 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 chimiokiniques CCR6 et CCR10 (Duhon et al. 2009), (Trifari et al. 2009). 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 (Nogralles et al. 2009). Une production dépendante des cellules de Langerhans et une action sur les cellules épithéliales induisent un remodelage (Eyerich et al. 2009), (Fujita et al. 2009). L'IL-22 est augmentée dans les sérums et dans les surnageants de CMN (cellules mononucléées) de sujets allergiques asthmatiques (Zhao et al., 2010), (Wong et al. 2009). 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 (Schnyder et al., 2010). 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 (Besnard et al., 2011).

e. Les lymphocytes Th9

L'IL-9 a été largement décrite comme l'une de plusieurs cytokines Th2, mais cela est maintenant devenu moins clair. Des rapports récents ont décrit un nouveau sous-ensemble de la population de lymphocytes T auxiliaires séparé de Th2 qui produit IL-9 en grandes quantités et contribue de manière unique à des réponses immunitaires (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). Il s'agit de la population lymphocytaire Th9. Suite à une activation avec les CPA en présence du TGF- β et d'IL-4, les lymphocytes T CD4⁺ naïves se différencient en cellules Th9 caractérisées par la production élevée d'IL-10 et d'IL-9. Cependant, après leur activation, les cellules Th9 n'expriment pas les cytokines IL-4, IL-5, IL-13 (Th2), IL-17a (Th17) ou IFN- γ (Th1) (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008; Chang et al. 2010a; Staudt et al. 2010). Jusqu'à présent, les propriétés régulatrices des cellules Th9 n'ont pas été décrites malgré leur production d'IL-10 (Dardalhon et al. 2008). L'IL-9 produit par les cellules Th9, peut améliorer la capacité de prolifération des lignées de cellules T en culture à long terme et de prolonger leur durée de survie (Schmitt et al. 1989; Van Snick et al. 1989; Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). En outre, les cellules Th9 semblent contribuer à l'expression de CCL17 et CCL22 dans les maladies allergiques (Chang et al. 2010a). En utilisant des analyses FACS ou la technique de PCR quantitative pour déterminer les cytokines produites par les cellules

Th9, Dardalhon et al. et Veldhoen et al., ont confirmé que les cellules Th9 sont un sous-ensemble discret de Th cellulaire distincte de Th1, Th2, Th17, et les cellules T régulatrices (Treg) (Dardalhon et al. 2008; Veldhoen et al. 2008). Par conséquent, les cellules Th9 n'expriment pas de facteurs de transcription tels que T-bet (Th1), GATA-3 (Th2), ROR γ T (Th17), ou FoxP3 (Treg) à des niveaux comparables à ceux des sous-ensembles de cellules T respectifs, ce qui indique que les cellules Th9 sont un sous-ensemble autonome des cellules T helper. Le rôle d'IL-9 dans la pathologie de l'asthme sera décrit ultérieurement.

1.5.3. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B jouent un rôle fondamental dans les maladies allergiques, y compris l'asthme allergique. Ils synthétisent 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 Fc ϵ RI 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 Fc ϵ RI 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.

1.5.4. 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 (Spits et al., 2012). Les cellules lymphoïdes innées de type 2 (ILC2), sont un membre de la famille des ILCs laquelle est récemment identifiée 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 (Price et al., 2010), (Monticelli et al., 2011). Les ILC2 produisent de grandes quantités de cytokines Th2 (IL-13 et IL-5) en réponse à l'IL-33 et l'IL-25 (Mjosberg et al., 2011), (Neill et al., 2010), (Moro et al., 2010), (Saenz et al., 2010). Chez l'homme, comme chez la souris, l'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 murins d'asthme 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 (Barlow et al. 2012; Bartemes et al. 2012; Halim et al. 2012). Par conséquent, ces cellules peuvent constituer une nouvelle cible dans le développement des thérapies des maladies des voies aériennes telles que l'asthme.

1.5.5. Les 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. Grâce à leur aptitude à produire des cytokines, elles sont activement impliquées dans le développement des manifestations d'asthme d'une manière directe (Barrett et al. 2009a). 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 (Knight et al. 2003),(Holgate 2008, 2011). 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 (Holgate 2011). Cette perte de fonction de barrière peut refléter une anomalie génétique (Ying et al. 2006).

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 (Chung 2006), (Davies et al. 1995), (Nakamura et al. 1996) 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 (Hammad et al. 2008), (Barrett et al. 2009a). Non seulement ces cytokines clés activent et programment les DCs à induire une réponse Th2 en régulant positivement l'OX40 ligand (OX40L), mais interagissent aussi directement avec les mastocytes en stimulant la production de cytokines Th2 (Galli et al. 2008). Le rôle des cytokines produites par les cellules épithéliales sera présenté en détail dans la partie réservée aux médiateurs.

1.5.6. Les granulocytes Tissulaires

a. Les 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 (Prussin et al. 2006). Ils sont impliqués 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 (Irani et al. 1989).

Lors d'une deuxième exposition à l'allergène, celui-ci est reconnu par des IgE spécifiques, liés aux Fc ϵ RI 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 (Barnes et al. 1998), (Prussin et al. 2006). Les mastocytes activés sont une source importante de cytokines qui maintiennent la réaction inflammatoire et causent 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 (Klein et al. 1989), (Prussin et al. 2006). Les mastocytes produisent également d'autres cytokines telles l'IL-1 β , l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, ainsi que des facteurs de croissance (GM-CSF, le SCF) (Ikeda et al. 2003), (Marone et al. 2005). Ces médiateurs sont de puissants agents bronchoconstricteurs et augmentent la perméabilité microvasculaire (Amin 2012).

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 (Yu et al. 2006), (Amin et al. 2005), (Taube et al. 2004), (Sawaguchi et al., 2012). 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, (Amin et al. 2000), (Wenzel et al. 2003; Oh 2005), (Sugimoto et al., 2012). D'autres études préconisent que le développement de la phase tardive de l'asthme puisse être dépendante du TNF- α produit par les mastocytes (Kim et al. 2007; Nakae et al. 2007).

b. 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 résidentes 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 (Prussin et al. 2006), (Schroeder 2009). Les basophiles activés libèrent des médiateurs inflammatoires dont les principaux sont l'histamine, le LTC₄, l'IL-4 et l'IL-13 (Schneider et al., 2010). 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 (Falcone et al. 2006). Les basophiles jouent un rôle critique, pendant la phase effectrice et dans l'exacerbation des réponses Th2, grâce à leur capacité à produire un grand nombre de cytokines pro Th2 (IL-4, IL-13, TSLP, IL-25) (Schneider et al., 2010), (Wang et al. 2006), (Min et al. 2008). 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 (Schneider et al. 2009), (Kondo et al. 2008). 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 (Sokol et al. 2009), (Perrigoue et al. 2009; Wynn 2009; Yoshimoto et al. 2009). 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 (Hammad et al., 2010). Il reste à déterminer si les basophiles sont impliqués dans l'inflammation allergique chronique du poumon.

c. 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 (Holgate et al. 2008). Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, 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) (Sehmi et al. 2003a; Holgate et al. 2008). 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 (Woltmann et al. 2000). 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 (Fujishima et al. 2005). 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 (Rosenberg 1998), l'ECP (Egesten et al. 1994), l'EDN (Broide et al. 1992) et l'EPO. 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 (Rothenberg 1998). Les éosinophiles libèrent des superoxydes qui potentiellement induisent des lésions tissulaires et également des cytokines et des chimiokines (Maddox et al. 2002). Il a été récemment démontré que l'EDN des éosinophiles modulait les DCs pour amplifier la réponse Th₂ en stimulant le TLR₂ (Yang et al. 2008). 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 (Williams et al. 2000). 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 de cytokines telles que l'IL-3, l'IL-5, le 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 (Humbles et al. 2004; Lee et al. 2004). 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 (Jacobsen et al.; Jacobsen et al. 2008; Walsh et al. 2008; Jacobsen et al. 2011). 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 (Jacobsen et al., 2011). Ces cellules seront détaillées dans le deuxième chapitre de la thèse.

d. 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 (Lamblin et al. 1998; Wenzel et al. 1999). 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 (Gibson et al. 2001). Récemment, Jönsson et al, ont démontré que l'activation des neutrophiles par les IgG, est une condition 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 (Jonsson et al., 2011). Ces résultats révèlent un rôle des neutrophiles dans l'anaphylaxie chez la souris.

1.6. 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.

a. 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 alors que celles légères en ont un seul constant et un 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 (Gould et al. 2008).

L'IgE est reconnue par les récepteurs FcεRI (récepteur de haute affinité) et FcεRII (CD23) (récepteur de faible affinité). Le récepteur FcεRI 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 FcεRI : 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 (Bieber et al. 1992), (Gould et al. 2008), (Gounni et al. 1994). La liaison de l'IgE au récepteur FcεRI est une condition nécessaire au déclenchement de la phase d'hypersensibilité immédiate dont sont responsables les mastocytes et basophiles. L'expression du récepteur FcεRI 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 FcεRI porté par la cellule dendritique augmente leur potentiel de capture antigénique et leur production en cytokines et chimiokines qui favorisent la réponse Th2 (Reich et al. 2001), (Galli et al. 2008), (Kraft et al. 2007). Par ailleurs, Il a été mis en évidence que le FcεRI induit l'expression de l'enzymeIDO (von Bubnoff et al. 2002), dont les propriétés immunorégulatrices ont déjà été évoquées. Il semble que le FcεRI 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 FcεRII (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 FcεRI 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 (Carlsson

et al. 2007). 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.

b. Les cytokines

L'IL-4 est impliquée 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'elle 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 (Babina et al. 2004). Certains travaux suggèrent enfin que l'IL-4 a une action profibrotique, car elle active la production de collagène sur des fibroblastes hépatiques (Aoudjehane et al. 2008) et dans certaines formes de fibroses pulmonaires (Wallace et al. 1999). Le récepteur de l'IL-4 active par phosphorylation les protéines adaptatrices STAT6 (Andrews et al. 2002), 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 (Nawijn et al. 2001). 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 (Kaminuma et al. 2004). L'expression de GATA-3 n'est toutefois pas limitée aux T CD4⁺, on la retrouve également dans les cellules NKT (Kim et al. 2006), les NK (Vosshenrich et al. 2006) et certains épithélia (Kouros-Mehr et al. 2006). 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).

L'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 caliciformes et en potentialisant l'hyperréactivité bronchique par une action sur les cellules

musculaires lisses péribronchiques (Eum et al. 2005). Chez la souris, des études ont établi que la présence d'IL-13 est nécessaire et suffisante pour induire l'HRB (Walter et al. 2001).

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 (Saito et al. 2002) 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 impliquée dans l'accumulation des éosinophiles vers le site inflammatoire après stimulation allergénique (Matsumoto et al. 2003). Elle facilite ce recrutement en modulant l'expression de protéines d'adhésion et de récepteurs chimiokines à la surface des éosinophiles (Kudlacz et al. 2002).

L'IL-9 est induite par des pneumallergènes sur les cellules mononucléées (Sun et al. 2007) et les éosinophiles (Fujisawa et al. 2008) de patients allergiques, ce qui explique les taux élevés de cette cytokine dans les LBA après challenge allergénique (Erpenbeck et al. 2003). 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 (van den Brule et al. 2007), et ce indépendamment d'un recrutement éosinophilique. Par ailleurs, l'utilisation de modèles d'asthme expérimental chez la souris montre 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 (Sitkauskienė et al. 2005). 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 (Dardalhon et al. 2008), (Veldhoen et al. 2008). Ces cellules sont impliquées dans différents processus immunitaires, en particulier l'asthme.

TSLP (Thymic stromal lymphopoietine) 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 (Kashyap et al.; Moon et al.; Kashyap et al.

2011; Moon et al. 2011). Chez l'homme, des niveaux élevés de TSLP ont été trouvés dans les cellules épithéliales des voies aériennes des patients asthmatiques (Ying et al. 2005; Ying et al. 2008), (Hammad et al. 2008). 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 (Zhou et al. 2005). 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 mûrissent et sécrètent des chimiokines telles que TARC et MDC qui attirent les lymphocytes Th2 ainsi que l'eotaxine-2 qui attire à son tour les éosinophiles (Wong et al.; Liu 2007; Wong et al. 2010). 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 (Omori et al. 2007). 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 (Liu 2006), (Holgate et al. 2008), (Kaur et al. 2012). De plus, des souris déficientes pour le récepteur de TSLP ont un asthme allergique atténué. À l'inverse, 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 (Al-Shami et al. 2005; Zhou et al. 2005). 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* (Zhang et al. 2011). 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 (Lei et al. 2011) 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 (Bleck et al. 2006). 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) (Holgate et al. 2008). 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 (Stampfli et al. 1998). D'autres

auteurs, ont montré que la neutralisation de GM-CSF réduit la réponse Th2 dans un modèle d'asthme induit par HDM (Yamashita et al. 2002; Cates et al. 2004).

L'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 (Fort et al. 2001; Angkasekwinai et al. 2007). L'expression d'IL-25 et de son récepteur IL-25R sont augmentées dans les biopsies des patients asthmatiques (Corrigan et al. 2011a; Corrigan et al. 2011b). Chez la souris, la surexpression d'IL-25 dans les cellules épithéliales de poumon induit une réaction inflammatoire allergique (Angkasekwinai et al. 2007), alors que, la neutralisation de l'IL-25 réduit l'inflammation des voies aériennes et le remodelage bronchique (Siegle et al.; Angkasekwinai et al. 2007; Siegle et al. 2011).

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. (Moussion et al. 2008; Wood et al. 2009). 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 (Smithgall et al. 2008), (Kondo et al. 2008), (Lambrecht et al. 2000), (Yasuda et al.). L'IL33 augmente l'expression des marqueurs de maturation, tels que CD40, CD80 et OX40L au niveau des DCs qui deviennent très efficaces à induire les réponses Th2 (Sapoznikov et al. 2007), (Soumelis et al. 2006). 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 (Kondo et al. 2008). 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 (Liu et al. 2009a). 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 de plus en plus importante dans les asthmes sévères (Prefontaine et al.). Des polymorphismes génétiques affectant IL-33 et ST2 sont associés à l'asthme (Smith).

c. L'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) (Jutel et al. 2005). 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 (Bryce et al. 2006). En outre, le récepteur H4 semble également jouer un rôle important dans les maladies allergiques (Dunford et al. 2006), (Cowden et al.).

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 (White 1990), (Cowden et al.).

d. Les 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 retrouvé 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 (Goldstein et al. 1978; Ford-Hutchinson et al. 1980). Ils sont synthétisés par de nombreux types cellulaires. Ces médiateurs jouent un rôle important dans la pathophysiologie de nombreuses pathologies dont on cite l'asthme sévère. Les principales fonctions biologiques de ces médiateurs ont été déjà décrites avec les cellules qui les produisent.

e. Les chimiokines

i. Généralité

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire (entre 8 et 14 kDa). Elles sont impliquées dans le trafic cellulaire, d'où leur nom (CHEM)otactic cytoKINES), et l'activation cellulaire, aussi bien en condition physiologique que pathologique (inflammation, organogenèse, angiogenèse, 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 non seulement aux mécanismes

homéostatiques mais aussi aux réponses inflammatoires. 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. En effet une chimiokine peut activer plusieurs récepteurs 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 9).

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 10). Sur cette base, est née, en l'an 2000, la nouvelle classification des chimiokines (Zlotnik et al. 2000). 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 10).

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 retrouvent dans un cluster sur le chromosome 4, à l'exception de CXCL12, CXCL14 et CXCL16 codées par le chromosome 10.

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 (Strieter et al. 1995).

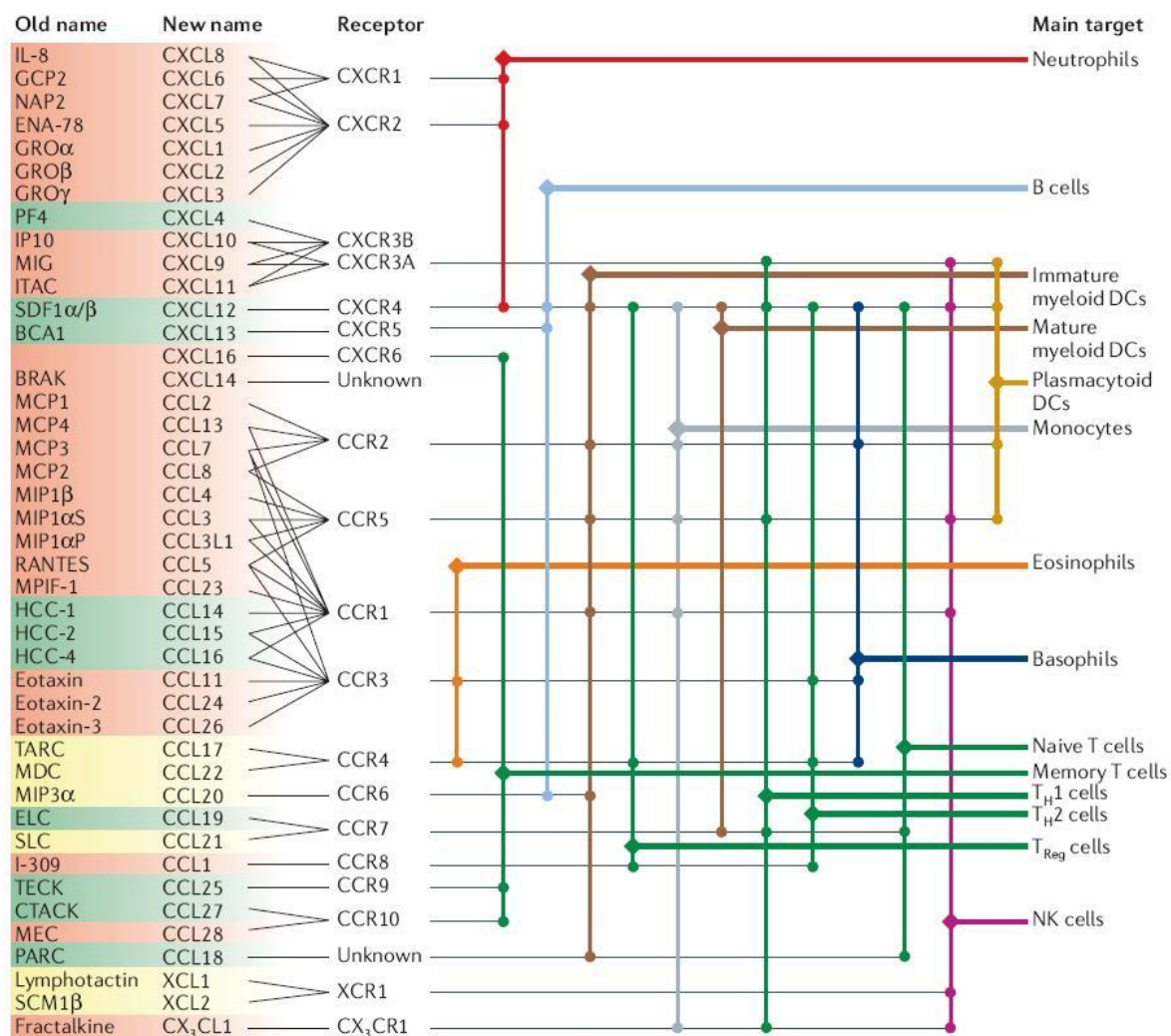


Figure 9 : Chimiokines et récepteurs associés. Le diagramme représente la redondance fonctionnelle des chimiokines, ainsi que leur expression à la surface des leucocytes (Mantovani et al. 2006).

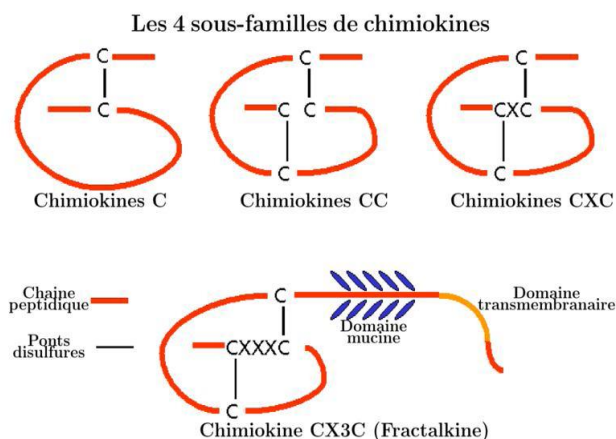


Figure 10 : Les quatre sous familles de chimiokines classées selon leur structure (Townson et al. 2003)

Les CXC chimiokines ELR-

Ce sous-groupe est composé de CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16. Ces chimiokines attirent préférentiellement les Lymphocytes et les monocytes avec une faible action sur les neutrophiles (Cole et al. 1998), (Sleeman et al. 2000) et contrairement aux ELR+, elles ont des propriétés anti-angiogéniques (Gengrinovitch et al. 1995).

Les CC chimiokines ou CCL

Ce groupe comporte 28 membres. Le locus de la plupart de ces 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. Un grand nombre de ces CC chimiokines est impliqué dans l'allergie notamment les CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL17, CCL22, CCL24 et CCL26 (Luster et al. 1997; Inngjerdingen et al. 2000), (Forssmann et al. 1997). Trois de ces chimiokines (CCL19, CCL20 et CCL21) sont impliquées dans l'homéostasie et le Homing des cellules immunes. Ces trois chimiokines dirigent les lymphocytes T et les cellules dendritiques vers les sites spécifiques au travers le tissu lymphoïde (von Andrian et al. 2003). Les CC chimiokines impliquées dans le développement sont CCL17 et CCL25 (Imai et al. 1996), (Vicari et al. 1997).

Les C chimiokines ou XCL

Cette famille comprend 2 membres, XCL1 et XCL2. XCL1 est capable d'induire la chimiotaxie de Lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que des cellules NK (Zavala-Flores et al. 2009). Elle ne présente pas de propriétés chimiotactiques vis-à-vis des monocytes ou des neutrophiles (Kelner et al. 1994). Outre sa fonction chimiotactique sur ces populations, XCL1 peut induire un effet suppressif et cytotoxique contre des tumeurs ou des cellules T effectrices (Huang et al. 2004). 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 pouvant rétablie par l'administration de XCL1 (Nguyen et al. 2008).

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, favorise l'adhésion ferme de ces leucocytes (Bazan et al. 1997). 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 (Rimaniol et al. 2003), 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 souris CX3CR1 déficientes reconstituées avec des cellules Th2 de souris sauvages (Mionnet et al.).

ii. La chimiokine d'intérêt 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) (Hieshima et al. 1997), DC-CK1 (Dendritic Cell ChemoKine 1) (Adema et al. 1997), AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-associated CC chemokine-1) (Kodelja et al. 1998a) et MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4) (Guan et al. 1999), (Wells et al. 1997). Cette chimiokine est issue d'une duplication de deux gènes de CCL3 avec une délétion et une utilisation sélective de certains exons (Tasaki et al. 1999). 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 (Struyf et al. 2003), (Schutyser et al. 2001). 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 (Adema et al. 1997), (Vulcano et al. 2003), (Vissers et al. 2001). 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 (Vulcano et al. 2003), (Kodelja et al. 1998a). En revanche, les cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 l'augmentent fortement (Vulcano et al. 2003), (van der Voort et al. 2005), (Kodelja et al. 1998b). 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 (Elia et al. 2008), qu'elle soit constitutive ou induite par l'IL-4 (adjoint de GM-CSF). D'autres stimuli d'origine exogène, comme un anticorps chimérique (Combinaison de IgG2a souris et de IgG2b rat) (Zeidler et al. 1999) ou PGE2 (Vulcano et al. 2003), 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 (Wang et al. 2002). 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 (Vulcano et al. 2003), alors que d'autres observent une augmentation de l'expression (Vissers et al. 2001), (van Lieshout et al. 2005). Il a été également constaté que le LPS n'avait pas d'incidence sur la sécrétion de CCL18 (van der Voort et al. 2005). 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 (Li et al. 2008b), via l'activation de PARs (protease-activated receptors). Une stimulation avec le CD40L (Vissers et al. 2001), des pathogènes (*Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC), *C.albicans* et le virus de l'influenza) (Vulcano et al. 2003) ou un mélange de facteurs de maturation (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et PGE2) (van der Voort et al. 2005) 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 de contexte cytokinique. Les autres types de DC, les cellules de Langherans, les pDC et les mDC ne produisent pas CCL18 de façon constitutive (Vissers et al. 2001), (Kodelja et al. 1998a). Par ailleurs, l'IL-10 induit la production de CCL18 par les mDC et non pas par les pDC (Vulcano et al. 2003). 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 (Mantovani et al. 2004). *In vitro*, les macrophages M1 n'expriment pas CCL18, alors que les M2 produisent d'importantes quantités de CCL18 (Ferrara et al. 2008), (Kodelja et al. 1998b). *In vivo*, l'expression de l'ARNm de CCL18 est retrouvée dans les macrophages alvéolaires de sujets contrôle et de

sujets asthmatiques (Kodelja et al. 1998b). Chez les sujets fumeurs, la production de CCL18 par les macrophages alvéolaires présents dans le LBA est réduite comparativement aux sujets non fumeurs (Kollert et al. 2009). Après infection à *Mycobacterium tuberculosis*, la production de CCL18 est augmentée (Ferrara et al. 2008).

Jusqu'à présent le récepteur CCR spécifique de CCL18 n'a pas été 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 (Adema et al. 1997), (Atamas et al. 2003), (Lindhout et al. 2001). De plus, l'inhibition de la protéine ERK (extracellular signal-regulated kinase) dans les fibroblastes pulmonaires inhibe l'induction de la production de collagène par CCL18 (Atamas et al. 2003). Il a été démontré que CCL18 est capable de se fixer au CCR3, mais sans induire son activation. CCL18 agit comme antagoniste de CCR3 (Nibbs et al. 2000). 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 décrit le CCRL2, connu aussi sous les noms: HCR, CRAM-A, CRAM-B, CKRX et Eo1, comme récepteur de CCL18. 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 (Otero et al.). Une autre équipe affirme que ce récepteur est non signalant et qu'il constitue un simple leurre pour le CCL19 ligand du CCR7 (Catusse et al.). Une étude récente a montré le rôle de CCL18 dans la migration métastatique du cancer du sein et incrimine le récepteur signalant P1TPNM3 par des arguments de colocalisation cellulaire, d'immunoprécipitation et de transfection (Chen et al.).

L'une des premières activités de CCL18 est son pouvoir chimiotactique envers les Lc T, que ce soit des T CD4⁺ ou CD8⁺ (Hieshima et al. 1997). Adema et al, ont montré que les cellules T naïves répondent plus au CCL18 que les mémoires (Adema et al. 1997). 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 (Guan et al. 1999). 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* (Gunther et al. 2005). 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* (de Nadai et al. 2006). CCL18 attire également les Lc B CD38⁻, naïfs, de la couronne périfolliculaire des amygdales (Gunther et al. 2005). 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 (Hieshima et al. 1997). 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 une semaine de culture ils ne répondent plus à la stimulation par la chimiokine (Schraufstatter et al. 2004). De même, CCL18 est capable d'attirer les DCs immatures, mais est incapable d'induire la migration de DC matures (Vulcano et al. 2003). CCL18 est capable d'induire non seulement la chimiotaxie de basophiles, mais également le relargage d'histamine par ces derniers (de Nadai et al. 2006). 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 (Atamas et al. 2003). CCL18 est capable également de supprimer la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques, stimulés par GM-CSF et SLF (Steel Factor) (Broxmeyer et al. 1999), 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 élevés comparativement aux sujets contrôle (Kim et al. 2009). Cette chimiokine est retrouvée en plus grande quantité dans le LBA de patients asthmatiques allergiques que dans celui des sujets sains. de Nadai et al, ont montré que des CMN issues de patients asthmatiques allergiques stimulées par l'allergène Der p 1 secrètent plus de CCL18 par comparativement à 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-13 produites 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 (de Nadai et al. 2006). D'autre part, le CCL18 induit l'activation des basophiles, le relargage de calcium intracellulaire et la libération d'histamine.

CHAPITRE 2 : LES EOSINOPHILES

2.1. Morphologie et caractéristiques générales

L'éosinophile est considéré aujourd'hui comme un acteur cellulaire multifonctionnel mais capable aussi de participer aux processus précoces intervenant dans l'immunité innée, cette dernière représentant la première barrière de l'organisme vis-à-vis de nombreux pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites). Les éosinophiles sont essentiellement impliqués dans les réponses immunes anti-parasitaires et dans les réactions allergiques.

L'éosinophile, leucocyte faisant partie de la famille des granulocytes comprenant également les neutrophiles et les basophiles, sa taille variant entre 8 et 12µm. Il se distingue des autres granulocytes par son noyau bilobé et ses nombreux granules, dont certains possèdent des corps cristalloïdes, mis en évidence en rouge-orangé par une coloration classique au MGG (May Grunwald Giemsa). Quatre types de granules ont été identifiés dans les éosinophiles : les granules primaires, les granules secondaires (ou spécifique), les petits granules et les micro-granules (Gleich et al. 1986; Kroegel et al. 1994a; Kroegel et al. 1994b).

Les granules primaires, ronds et denses au microscope électronique sont formés à un stade précoce de la différenciation dans la moelle osseuse. Ces granules, contiennent la lysophospholipase, ne comportent pas de noyau cristalloïde mais peuvent se condenser pour former des cristaux de Carcote-Leyden. Les granules secondaires ou spécifiques se distinguent au microscope électronique par un noyau cristalloïde dense et une matrice elliptique moins dense. Les granules spécifiques se retrouvent chez l'éosinophile mature et sont responsables de la coloration à l'éosine qui permet d'identifier cette cellule au microscope optique. Ces granules morphologiquement caractéristiques de l'éosinophile comportent des protéines cationiques réparties dans la matrice : l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), l'EPO (Eosinophil peroxydase) et l'EDN (Eosinophil –Derived Neurotoxin) et la MBP (Major Basic Protein) dans le core. Concernant les petits granules, ils sont invisibles en microscopie optique, ils dérivent de l'appareil de Golgi et contiennent des complexes enzymatiques incluant l'aryl sulfatase et la phosphatase acide. Les micro-granules sont un constituant du système de transport tubulo-vésiculaire.

Les éosinophiles activés libèrent des substances pro-inflammatoires incluant des médiateurs préformés, des médiateurs lipidiques néoformés et des médiateurs synthétisés (cytokines et chimiokines). Les médiateurs préformés, contenus dans des granules, sont essentiellement des protéines cationiques incluant la MBP, l'ECP, l'EPO et l'EDN (Gleich et

al. 1986). Les médiateurs néoformés comprennent des prostaglandines (PGE2 et PGD2), le PAF (Platelet-Activating Factor) et des leucotriènes (majoriteremnt LTC4) (Henderson et al. 1984; Bandeira-Melo et al. 2002). Ces cellules sont également capables de sécréter une grande variété d'enzymes telles que la métalloprotéinase MMP9 (Fujisawa et al. 1999) et l'élastase (Lungarella et al. 1992) ainsi que des dérivés oxygénés (de Andres et al. 1990).

2.2. Ontogénie et localisation

Les polynucléaires éosinophiles se développent et mûrissent dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur hématopoïétique exprimant le CD34. Sous l'influence de cytokines telles le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5, ce précurseur totipotent va donner naissance à un précurseur multipotent puis à un précurseur hybride à l'origine des lignées basophiles et éosinophiles (Rothenberg et al. 2006). Chez l'homme, quatre jours sont nécessaires à la différenciation et au stockage médullaire de l'éosinophile mature. Trois facteurs de transcription interviennent dans le développement des éosinophiles : GATA-1 (famille des facteurs à doigt de Zinc), PU.1 (membre de la famille ETS) et c/EBP α et ϵ (CCAAT/enhancer-binding protein family) (figure 11). GATA-1 possède une activité unique et spécifique au sein des éosinophiles puisqu'il agit en synergie avec PU.1 alors que les autres lignées GATA-1 antagonisent les effets de PU.1. La délétion du site palindromique de fixation de GATA-1 à son propre promoteur chez la souris abolit spécifiquement la lignée éosinophile (Yu et al. 2002). De plus, ce site de fixation est également présent dans les régions régulatrices des gènes codant pour CCR3, la MBP et la chaîne α du récepteur à l'IL-15. Ces facteurs de transcription semblent donc importants pour la différenciation vers la lignée éosinophile mais aussi pour l'expression des protéines de granules.

Les éosinophiles ne représentent que 1 à 3 % des cellules sanguines chez un individu sain. Leur demi-vie dans le sang est brève et ne dépasse pas 18 heures, ce qui explique les difficultés d'obtention et de purification d'éosinophiles de sujets sains. Les éosinophiles matures sont principalement localisés dans les tissus à l'état physiologique, notamment l'interface avec l'environnement tel que le tractus gastro-intestinal, uro-génital ou pulmonaire mais aussi au sein des organes lymphatiques et hématopoïétiques, y compris le thymus. Ces tissus constituent des endroits de renouvellement tissulaire important. Les éosinophiles, une fois dans les tissus, peuvent survivre plusieurs semaines (Rothenberg et al. 1987). Il pourrait alors exister un lien entre la présence d'éosinophiles dans les tissus lésés et la réparation au

cours d'infections. En cas de réaction inflammatoire, les éosinophiles sont redistribués et quittent leurs sites primaires pour atteindre les foyers inflammatoires.

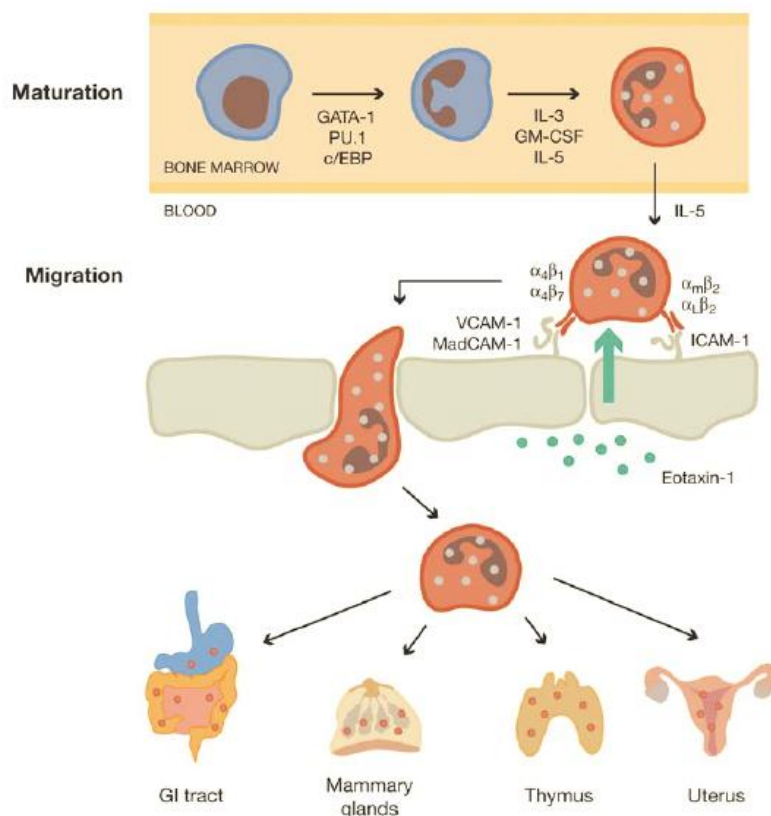


Figure 11 : Recrutement tissulaire des éosinophiles. Les éosinophiles se développent dans la moelle osseuse où ils se différencient à partir d'un progéniteur hématopoïétique sous le contrôle de différents facteurs de transcriptions, GATA-1, PU.1 et c/EBP et sous l'influence des trois éosinopoïétines GM-CSF, IL-3 et IL-5. Les éosinophiles matures passent dans le sang et sont recrutés au site de l'inflammation par des sélectines et des intégrines. Ils migrent ensuite vers les tissus sous l'influence de chimiokines et de leucotriènes. Dans des conditions homéostatiques, les éosinophiles rejoignent le thymus, les glandes mammaires, l'utérus et le tractus gastro-intestinal. D'après Rothenberg et al, 2006.

2.3. L'éosinophile : un lien entre la réponse innée et la réponse adaptative

L'éosinophile exprime en surface de multiples récepteurs qui lui confèrent un rôle important au sein de la réponse immunitaire. L'éosinophile pré-activé et recruté a ainsi la possibilité d'exprimer localement de nouveaux récepteurs de surface et d'augmenter le nombre ou l'affinité de récepteurs pré-existants. En fonction des signaux de l'environnement, les éosinophiles acquièrent la capacité d'infiltrer les tissus par diapédèse, avant d'interagir avec l'environnement inflammatoire et tissulaire.

2.3.1. Les récepteurs exprimés par les éosinophiles

Comme les cellules dendritiques qui constituent un lien entre l'immunité innée et adaptative, les éosinophiles expriment des récepteurs considérés soit comme innés, soit comme adaptatifs (figure 12).

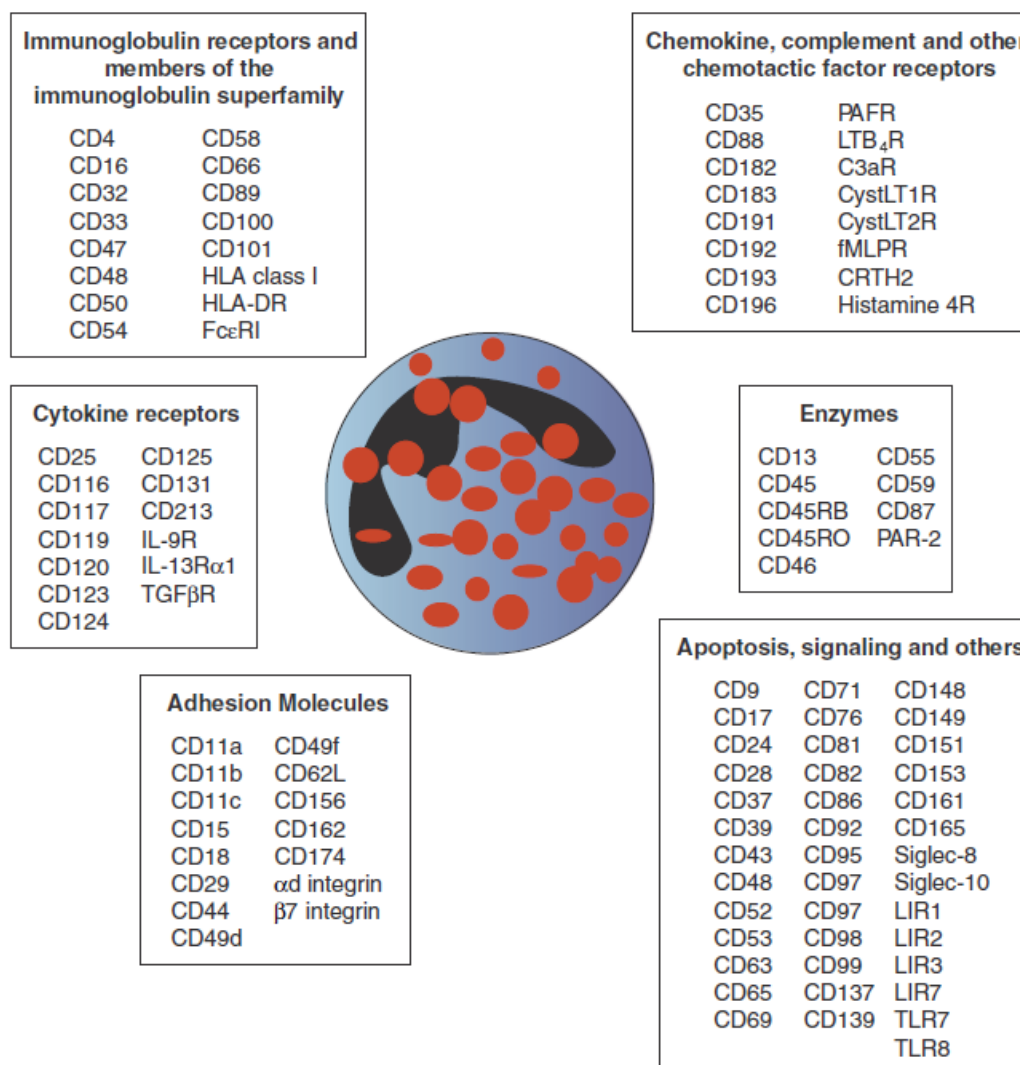


Figure 12: les différents récepteurs exprimés par les éosinophiles. D'après Hogan et al, 2008.

Plusieurs récepteurs récemment identifiés permettent aux éosinophiles d'être stimulés directement par des composés environnementaux ou encore par des motifs moléculaires communs à plusieurs pathogènes. Certaines protéases d'acariens, de champignons ou de pollens sont capables d'activer directement les éosinophiles par clivage de la partie N terminale des récepteurs PAR (Protease Activated Receptors) couplés à des protéines G. Les éosinophiles expriment PAR-1 à leur surface, et PAR-2 dans le cytoplasme (Bolton et al. 2003; Miike et al.

2003). Sous l'action de ces protéases, l'éosinophile libère des radicaux libres et des leucotriènes proinflammatoires. Le récepteur PAR-2 est impliqué dans l'activation de l'éosinophile par un champignon de l'air ambiant (genre *Alternaria*) (Inoue et al. 2005). Les éosinophiles expriment une molécule capable de lier les IgE : la galectine 3 encore appelée MAC2/εBP. Cette lectine de type S, médie une cytotoxicité dépendante des IgE efficace envers les cibles parasitaires (Truong et al. 1993). Elle pourrait aussi intervenir dans l'immunité innée en reconnaissant des pathogènes. En effet, sur les macrophages, la galectine-3, en coopération avec TLR2, se lie à *C.albicans* (Jouault et al. 2006). Les éosinophiles expriment le FPR (Formyl peptides Receptor) lequel lie un signal de danger représenté par le fMLP libéré par les bactéries (*N-formyl-Met-Leu-Phe*) (Svensson et al. 2005) mais aussi par certains allergènes (Svensson et al. 2007).

Les éosinophiles expriment également des récepteurs de l'immunité adaptative comme les récepteurs aux fragments Fc des IgG (FcγRI, FcγRII, FcγRIII), IgA (FcαRI) et IgE (FcεRI et FcεRIII). Ces récepteurs permettent l'endocytose, l'activation des cellules et leur dégranulation. Ces cellules participent également à l'élaboration de la réponse immunitaire spécifique par leurs capacités de présentation antigénique. En effet, ces polynucléaires expriment, à leur surface, des molécules leur permettant d'agir avec les lymphocytes T, telles que les CMH en particulier HLA-DR (Shi 2004). Des molécules de co-stimulation présentes sur les populations lymphocytaires ou les cellules présentant l'antigène comme CD25 (Plumas et al. 1991), CD4 (Lucey et al. 1989), CD28 et CD86 (Woerly et al. 1999b) sont aussi exprimées sur les éosinophiles.

Les éosinophiles expriment aussi à leur surface des récepteurs de cytokines (IL-2R, IL-3R, IL-5R, GM-CSFR, IL-4R, IL-13R, IFN-αR, IFN-βR, IFN-γR...), de chimiokines (CCR1, CCR3), du complément (C3aR, C5aR, CR1 et CR3) et des récepteurs de médiateurs lipidiques (PAF-R, DP-R, CRTH2, LTB4-R et LTE4-R). Ils expriment également des sélectines (PSGL-1 et L-sélectine) et des intégrines (LFA-1, Mac-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6, VLA-7, intégrines α4β7) ainsi que des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) et au TGF (Transforming Growth Factor) (Hogan et al. 2008). Les éosinophiles peuvent aussi exprimer des récepteurs pour l'adénosine, la lipoxine A4, l'histamine et le β adréno-récepteur (Prussin et al. 2006; Rothenberg et al. 2006).

Concernant l'expression des récepteurs Toll-like (TLR), il a été montré dans les éosinophiles humains, qu'ils expriment sous forme protéique les TLR-1, 2, 4, 5, 6, 7 et 9 mais leurs fonctions restent encore imprécises (Wong et al. 2007). Parmi les différents ligands des

TLR, seul un ligand du TLR 7-8 (R-848) est capable d'activer les éosinophiles humains et de déclencher la production d'ions superoxydes (Nagase et al. 2003). Cependant une autre étude suggère que les ligands des TLR-2, 5 et 7 pourraient activer de manière différentielle les éosinophiles, aboutissant à l'augmentation de l'expression de certaines molécules d'adhérence comme ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) et CD18 (chaîne β 2 des intégrines) et/ou à la libération de cytokines /chimiockines, superoxydes, protéines granulaires, spécifiques du ligand utilisé (Wong et al. 2007). Les ligands de TLR3, 4, 8 et 9 semblent moins actifs ou inactifs. Une activation possible par TLR4, grâce à une voie dépendante du CD14, reste également controversée (Meerschaert et al. 2000; Plotz et al. 2001).

2.3.2. les cytokines secrétées par les éosinophiles

Grâce à l'expression de nombreux récepteurs, les éosinophiles sont capables de répondre à différents stimuli et de libérer rapidement et sélectivement divers médiateurs dont des cytokines (figure 13). Contrairement aux lymphocytes, la plupart des cytokines sont stockées dans les granules et/ou les vésicules de l'éosinophile et donc sont libérées très rapidement après l'activation de ces cellules. Cette capacité de stockage est liée à une activité transcriptionnelle de base très faible comparée à d'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes. L'IL-12, l'IL-4, l'IL-13 sont stockées dans le core central des granules cristalloïdes (Woerly et al. 1999a; Woerly et al. 1999b; Bandeira-Melo et al. 2001; Woerly et al. 2002), tandis que l'IL-6 et le TNF- α sont localisés dans la bicouche lipidique de ces granules (Lacy et al. 1998). Leur sécrétion confère aux éosinophiles un rôle effecteur et régulateur, en particulier dans l'orientation de la réponse immune grâce à leur capacité à produire de nombreuses cytokines de types Th1 comme l'IFN- γ , l'IL-2 et l'IL-12 ou de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-10 (Dubucquoi et al. 1994; Woerly et al. 1999a; Woerly et al. 2002). Ces cellules synthétisent aussi des facteurs de croissance et d'activation, tels que le GM-CSF, l'IL-13, l'IL-15 qui peuvent intervenir dans le maintien de la réponse inflammatoire, ou encore, l'IL-6 et le TNF- α qui peuvent participer à l'inflammation conférant ainsi aux éosinophiles des fonctions pro-inflammatoires.

Les éosinophiles sont ainsi capables de libérer sélectivement des cytokines de type Th1 et Th2 ou immunorégulatrices en fonction de l'environnement, procurant à ces cellules la faculté de participer à la régulation de la réponse immune.

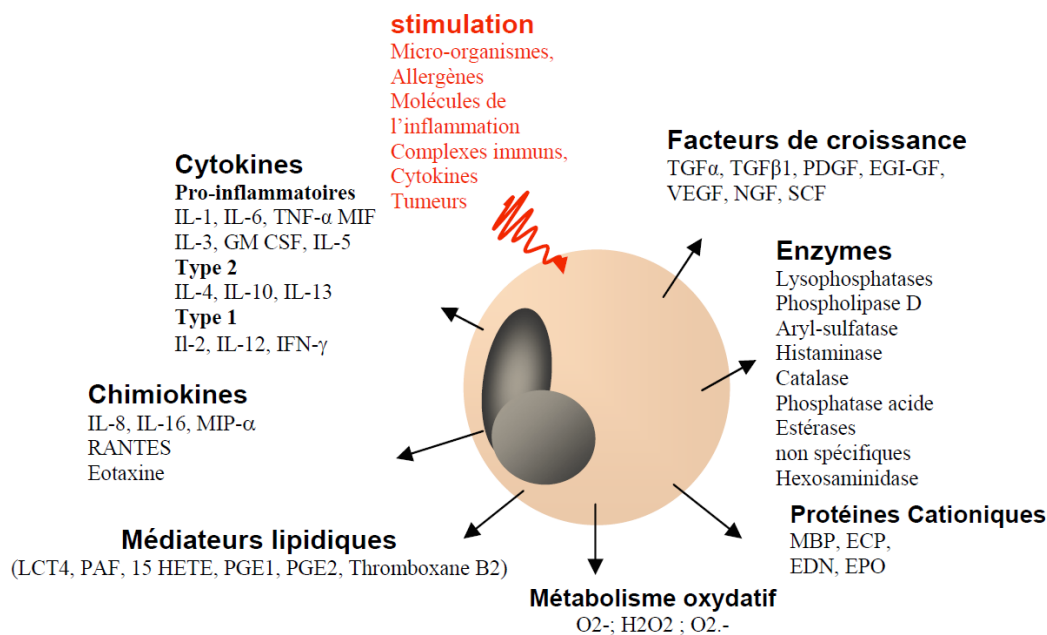


Figure 13 : Les différents médiateurs libérés par les éosinophiles activés par divers stimuli. D'après Staumont-Salle, D et al, 2007.

2.4. La migration des éosinophiles vers les tissus enflammés

Les éosinophiles matures quittent la moelle osseuse et sont recrutés au niveau des sites inflammatoires allergiques par l'action combinée de l'IL-5, de chimiokines et de molécules d'adhérence. Plusieurs chimiokines (CC) sont chimioattractantes pour les éosinophiles. Celles-ci incluent CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL24 et CCL26 (Alam et al. 1993; Noso et al. 1994; Ponath et al. 1996; Elsner et al. 1998; Rosenberg et al. 2007). Les chimiokines CCL11, CCL24 et CCL26 sont communément appelées éotaxines, puisqu'initialement elles ont été décrites comme chimioattractants spécifiques des éosinophiles. CCL11, produite par les cellules épithéliales bronchiques et les fibroblastes en réponse à l'IL-4 et l'IL-13, agit en synergie avec l'IL-5 pour le recrutement des éosinophiles dans les poumons provoqués par l'allergène (Simson et al. 2000; Pope et al. 2001; Prussin et al. 2006). De même, CCL11 joue un rôle crucial dans le recrutement des éosinophiles dans le tissu pulmonaire des patients asthmatiques (Park et al. 2006; Pease 2006). Outre son rôle chimioattractant, elle promeut la production d'éosinophiles et est directement responsable de la sortie des progéniteurs d'éosinophiles dans la circulation périphérique (Palframan et al. 1998; Sehmi et al. 2003b). Après provocation allergénique dans des modèles murins, CCL24 est produite plus tardivement que CCL11 (24h versus 6h) et agit avec l'IL-5 pour le développement de l'éosinophilie

pulmonaire et la production d'IL-13. Les interactions avec CCL24 et l'IL-13 induisent le recrutement d'éosinophiles (Rosenberg et al. 2007). CCL26, produite par les cellules épithéliales en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 semble responsable du recrutement prolongé d'éosinophiles (Blanchard et al. 2005; Rosenberg et al. 2007).

Outre les chimiokines, d'autres substances sont chimioattractantes pour les éosinophiles. Ainsi, le PAF et les anaphylatoxines C3a et C5a attirent les éosinophiles, mais aussi certaines leucotriènes et prostaglandines dont les principaux sont respectivement LTC₄ et PGD₂ (Wardlaw et al. 1986; Daffern et al. 1995).

Les molécules d'adhérence participent également au recrutement des éosinophiles en permettant leur migration transendothéliale. Tout d'abord, les sélectines PSGL-1 et L-sélectine et l'intégrine VLA-4 permettent l'attachement et le roulement des éosinophiles sur l'endothélium. La L-sélectine interagit avec les chaînes carbohydrates des CD34, GlyCAM-1 et MadCAM-1 présents à la surface de l'endothélium, alors que PSGL-1 interagit avec la P-sélectine (DiScipio et al. 1999). L'intégrine VLA-4 interagit avec VCAM-1 dont l'expression est augmentée par l'IL-13 ou l'IL-4 (Bochner et al. 1995; DiScipio et al. 1999). D'autres intégrines et les anaphylatoxines C3a et C5a permettent l'arrêt du roulement des éosinophiles et une interaction plus ferme des éosinophiles avec l'endothélium. Ces intégrines comprennent LFA-1, Mac-1, l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ et VLA-4 interagissant avec ICAM-1 (LFA-1 et Mac-1), ICAM-2 (LFA-1), et VCAM-1 (VLA-4 et $\alpha 4\beta 7$). Ensuite les éosinophiles pénètrent entre les cellules endothéliales rétractées, phénomène appelé diapédèse. L'anaphylatoxine C5a permet une rétraction stable des cellules endothéliales créant ainsi une ouverture entre ces cellules. La progression des éosinophiles semble être permise par des interactions entre PCEAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) exprimé par les cellules endothéliales au niveau de leurs jonctions et PECAM exprimé à la surface des éosinophiles. Une fois pénétrés dans la couche endothéliale, les éosinophiles rencontrent la matrice extracellulaire composée de collagène de type IV, de fibronectine, de laminine, d'entactine, de glycosaminoglycanes et d'autres molécules. De nouvelles interactions prennent place entre les éosinophiles. Par exemple, la fibronectine interagit avec VLA-4, VLA-5 et VLA-7, la lamine avec VLA-6, l'héparane avec Mac-1. La stimulation des éosinophiles par les anaphylatoxines C3a et C5a résulte en la sécrétion de MMP-9, métalloprotéase dégradant une grande partie des éléments de la matrice extracellulaire (collagène, élastine, fibronectine, entactine...) permettant ainsi la transmigraton des éosinophiles vers les tissus (DiScipio et al. 1999).

2.5. Les différents modes de dégranulation des éosinophiles

Trois mécanismes pour la libération de protéines cationiques ont été décrits dans les éosinophiles :

- i.* La « piecemeal degranulation » ou transport vésiculaire permettant la libération des protéines de granule par bourgeonnement de petites vésicules à partir des granules secondaires et expliquant le phénomène de libération sélective du contenu granulaire (Tomassini et al. 1991; Dvorak et al. 2000). Les éosinophiles subissent la piecemeal degranulation en réponse à des cytokines comme l'IFN- γ et CCL11 (Rosenberg et al. 2012).
- ii.* La cytolysse non apoptotique avec extrusion dans le milieu extracellulaire de l'ensemble de granules avec la membrane des granules et secondairement de leur contenu.
- iii.* L'exocytose par fusion directe de la membrane des granules avec la membrane plasmique, libérant les protéines de la matrice et du core granulaire.

La régulation de l'exocytose est possible grâce à la formation de complexes protéiques composés de v-SNARES (récepteurs SNAP présents sur la vésicule de sécrétion), et de t-SNARES (protéines exprimées sur la membrane de l'organe cible). Ainsi, les éosinophiles expriment VAMP-2 sur la membrane de la vésicule sécrétoire, et SNAP-23 et la syntaxin-4 au niveau de la membrane plasmique (Lacy et al. 1999).

2.6. Les stimuli permettant la libération des médiateurs éosinophiliques

Après fixation de l'antigène aux récepteurs Fc des Ig, exprimés par les éosinophiles, un pontage de ces récepteurs s'opère entraînant alors la libération des médiateurs. Dans les réactions allergiques, la principale Ig impliquée est l'IgE qui se fixe aux récepteurs de forte affinité Fc ϵ RI et de faible affinité Fc ϵ RII présents sur les éosinophiles (Tomassini et al. 1991; Kayaba et al. 2001).

Des médiateurs lipidiques sont également capables d'activer les éosinophiles. Ainsi, le PAF entraîne la dégranulation, la production d'ions superoxydes et de LTC₄. Le LTB₄, quant à lui, provoque la libération d'ECP. Le PAF et le LTB₄ peuvent être sécrétés par les mastocytes (Takafuji et al. 1998), suggérant que ceux-ci sont capables d'entraîner la libération des médiateurs par les éosinophiles.

La dégranulation des éosinophiles et la libération d'ions superoxydes sont aussi induites par des cytokines et des chimiokines. En effet, *in vitro*, des éosinophiles cultivés en présence d'IL-5 libèrent de l'EDN, des ions superoxydes et du PAF. Le PAF ainsi libéré mène à la production de LTC₄ et à une augmentation du relargage d'EDN (Bartemes et al. 1999). De plus, les chimiokines CCL5, CCL7, CCL11 ou CCL3 induisent la libération d'EDN, et ce via leur interaction avec CCR3 présent à la surface des éosinophiles (Fujisawa et al. 2000).

Les anaphylatoxines C3a et C5a entraînent une élévation rapide et transitoire de taux de calcium intracellulaire et la libération d'ECP (Takafuji et al. 1994). De plus, l'anaphylatoxine C5a induit la libération du médiateur préformé MIF (Macrophage migration Inhibitory Factor). Ce facteur fortement pro-inflammatoire est présent à des taux plus élevés dans le LBA de patients asthmatiques stables comparativement aux sujets non asthmatiques (Rossi et al. 1998).

2.7. Les modifications phénotypiques des éosinophiles activés

L'activation des éosinophiles peut se caractériser par l'augmentation de l'expression basale de certains récepteurs. Ainsi, CD63/LAMP-3 est considéré comme un marqueur de dégranulation (Mahmudi-Azer et al. 2002; Inoue et al. 2005). L'expression de CD44, CD122, CD69 et CD4 est augmentée sur des éosinophiles hypodenses, caractéristiques d'une activation (Inoue et al. 2005).

Il existe également des modifications phénotypiquement liées à l'acquisition de nouveaux récepteurs de surface, modulées par certaines cytokines. Par exemple, l'IFN- γ est capable d'induire l'expression des récepteurs aux IgG (CD64 et CD16) à la surface des éosinophiles (Hartnell et al. 1992). Certaines cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-3, l'IL-15 et le GM-CSF associées au TNF- α provoquent l'induction d'ICAM-1 tandis qu'une synergie entre l'IL-3 et l'IFN- γ entraîne l'expression d'HLA-DR sur les éosinophiles circulants (Hansel et al. 1992). L'IL-3, le TNF- α et la GM-CSF sont également capables d'induire l'expression de CD4 sur les éosinophiles (Hossain et al. 1996).

2.8. Les médiateurs libérés et les fonctions effectrices des éosinophiles

a. Les granules préformés :

- i. **La MBP :** elle représente plus de 50% de la masse protéique des granules et constitue une protéine toxique contre les parasites (Prussin et al. 2006). Cette molécule n'est pas totalement spécifique des éosinophiles puisqu'elle est retrouvée mais en moindre quantité dans les basophiles. Bien que la MBP-1 partage les mêmes propriétés fonctionnelles que la MBP-2, elle semble beaucoup plus puissante que cette dernière (Plager et al. 2006). Néanmoins la MBP-2, non exprimée par les basophiles, constitue un marqueur plus spécifique des éosinophiles que la MBP-1. La MBP possède une activité cytotoxique contre les bactéries mais aussi les helminthes. Cette activité cytotoxique s'exerce par la capacité de la MBP à perturber l'intégrité cellulaire en modifiant l'équilibre électrostatique de la bicouche de phospholipidiques de la membrane cellulaire en augmentant sa perméabilité. A côté de son activité cytotoxique, d'autres rôles sont attribués à la MBP. Elle induit la libération d'héparine par différentes cellules, d'EDN par les éosinophiles eux-mêmes et joue un rôle dans la fibrose (Rothenberg et al. 2006). Elle participe aussi au recrutement des neutrophiles et augmente l'expression du CR3 et stimule la libération d'IL-8 par ces cellules (Moy et al. 1993; Page et al. 1999). Chez les patients asthmatiques, la MBP présente dans le sérum de LBA est corrélée avec l'HRB (Wardlaw et al. 1988). Cette protéine augmente la contraction des cellules musculaires lisses en agissant comme un antagoniste endogène des récepteurs muscariniques M2 (Costello et al. 1997). La MBP induit également la libération d'histamine, de PGD₂, de TNF- α , de GM-CSF et de CXCL8 par les mastocytes dérivés du sang de cordons ombilicaux humains (Piliponsky et al. 2003). Dans un modèle de sensibilisation et de provocation à l'OVA, des souris déficientes en MBP-1 développent une HRB et une inflammation pulmonaire allergique similaire aux souris WT (Wild-Type) sensibilisées et provoquées à l'OVA. Ces résultats suggèrent donc que la MBP-1 n'est pas indispensable au développement de l'asthme expérimental dans ce modèle (Denzler et al. 2000)
- ii. **L'ECP:** il s'agit d'une protéine possédant une très faible activité ARNase permettant la destruction des virus ARN simple brin, conférant ainsi à l'éosinophile une activité antivirale. De ce fait, près de 80% de l'activité ARNase des leucocytes sanguins provient des éosinophiles et ce malgré leur faible nombre. L'ECP est produite sous plusieurs formes glycosylées, le degré de glycosylation déterminant le niveau de

cytotoxicité de la protéine (Eriksson et al. 2007). Elle possède également, comme la MBP, une toxicité envers les helminthes, les bactéries et certains types cellulaires (Carreras et al. 2003) due à son effet déstabilisant sur les lipides membranaires. L'ECP est également impliquée dans la dégranulation des mastocytes et des basophiles, dans la sécrétion de mucus au niveau des voies aériennes et dans la production de GAG et de TGF- β par les fibroblastes ainsi que dans leur migration (Venge et al. 1999; Zagai et al. 2007; Zagai et al. 2009). De plus, il a été montré que les neutrophiles sont une source potentielle d'ECP en réponse à une activation dépendante de l'IgE (Monteseirin et al. 2007).

- iii. L'EDN* : L'EDN comme l'ECP possède une forte activité ribonucléase. Ces deux protéines font partie de la famille des ARNases et partagent une homologie de séquence de 88%. L'EDN peut être produite par des cellules autres que les éosinophiles comme les macrophages activés par le TNF- α et le LPS (Yang et al. 2004). L'EDN possède une activité neurotoxique, délétère pour l'hôte mais aussi une activité antivirale, bénéfique pour l'hôte. L'EDN est considérée comme une alarmine, au même titre que les défensines ou les cathélicidines qui sont des médiateurs représentant des signaux de danger chargés d'alerter le système immunitaire (SI) en cas de dommages cellulaires et d'infections (Yang et al. 2008). En effet l'EDN attire et active les cellules dendritiques via TLR2 et augmente ainsi la réponse immune principalement de type Th2.
- iv. L'EPO* : L'EPO génère, en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénures ou de bromure, des acides hypohalogénés et de l'oxygène singulet capables de tuer des bactéries, des mycobactéries, certains helminthes ainsi que des cellules tumorales. Les substances générées à partir de l'EPO sont capables de détruire la matrice extracellulaire (Rees et al. 2007), suggérant un rôle dans la destruction de l'épithélium bronchique observée lors de la phase retardée de la réaction allergique asthmatique. De plus les taux sériques d'EPO et d'ECP chez les patients atteints de rhinite allergique sont prédictifs d'un développement ultérieur d'un asthme (Nielsen et al. 2009). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, des souris déficientes en EPO développent une HRB et une inflammation pulmonaire allergique similaires aux souris WT sensibilisées et provoquées à l'OVA, suggérant que l'EPO n'est pas indispensable au développement de l'asthme expérimental (Denzler et al. 2001).

b. Le LTC4, médiateur lipidique

Les éosinophiles constituent une source majeure de leucotriènes et en particulier de LTC4 au niveau de la muqueuse bronchique des sujets asthmatiques. Ce médiateur, bronchoconstricteur puissant, est responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sécrétion de mucus. (Rothenberg et al. 2006).

c. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des médiateurs précoces de l'éosinophilie libérés après son activation. Ils sont produits sous l'action de différents agents et de façon beaucoup plus importante que dans le cas de neutrophile. La NADPH oxydase catalyse la réduction de l'oxygène en superoxyde. Celui-ci est ensuite transformé par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en présence de brome et sous l'action de la peroxydase des éosinophiles peut être transformé en oxygène singulet (Thomas et al. 1995). L'ensemble de ces espèces activées de l'oxygène confère à l'éosinophile un rôle pro-inflammatoire et cytotoxique.

d. Les cytokines et les chimiokines

Comme nous l'avons décrit précédemment, les éosinophiles sont capables de produire un grand nombre de cytokines incluant l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12, l'IL-13, l'IL-16, l'IL-18, le TGF- α/β , le TNF- α , l'IFN- γ et le GM-CSF (Rothenberg et al. 2006). Ces cellules sont des cellules immunorégulatrices puisqu'elles sont capables de sécréter à la fois des cytokines de type Th1 et de type Th2 (Woerly et al. 1999a). L'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF produits par les éosinophiles permettent leur activation, leur survie et leur prolifération. Ainsi, les éosinophiles sont capables de s'auto-réguler.

Les éosinophiles produisent aussi des chimiokines telles que CCL3, CCL5 et CCL11, permettant l'amplification de la réponse immunitaire via le recrutement d'autres types cellulaires, mais également d'autres éosinophiles (Rothenberg et al. 2006).

e. L'éosinophile, cellule présentatrice d'antigène accessoire

Les éosinophiles sont capables d'exprimer des molécules caractéristiques des CPA (Cellules Présentatrices d'Antigènes) : l'HLA-DR (Hansel et al. 1991; Yamamoto et al. 2000), le CD40 (Ohkawara et al. 1996), le CD80 (van Rijt et al. 2003) et le CD86 (Woerly et al. 1999b). De plus, ils s'accumulent dans les ganglions drainants des souris sensibilisées et provoquées à l'OVA, et plus précisément dans les zones T (Shi et al. 2000; van Rijt et al. 2003; Duez et al. 2004). Ainsi ces cellules pourraient participer à la présentation d'antigènes. Dans des modèles murins d'asthme expérimental, les éosinophiles sont effectivement capables de capturer et de présenter des antigènes solubles aux lymphocytes T sensibilisés à l'antigène, induisant ainsi leur prolifération et leur polarisation Th2 (MacKenzie et al. 2001; Shi 2004). En revanche, ils ne sont pas capables de primer les lymphocytes T naïfs (van Rijt et al. 2003). Outre les allergènes (MacKenzie et al. 2001), les éosinophiles sont capables d'apprêter et de présenter une variété d'antigènes microbiens incluant les antigènes viraux (rhinovirus-16 humain) (Handzel et al. 1998), des antigènes parasitaires et des superantigènes (Mawhorter et al. 1994), aboutissant à la prolifération des lymphocytes T (Shi 2004).

f. L'importance des éosinophiles dans l'asthme allergique

Lors de maladies allergiques, dont l'asthme, le nombre d'éosinophiles présents dans le sang périphérique est augmenté et une éosinophilie tissulaire est souvent retrouvée au niveau des sites inflammatoires associés à ces pathologies (Prussin et al. 2006). De plus, sur des coupes histologiques de poumons de patients décédés d'une crise d'asthme, les éosinophiles sont détectés au niveau de la paroi des voies aériennes. Cette observation suggère que les éosinophiles migrent à travers la muqueuse et entrent dans la lumière bronchique, pour être retrouvés dans les LBA (Jeffery et al. 2006).

Les éosinophiles jouent un rôle important dans l'inflammation allergique des voies aériennes grâce à leur capacité à libérer des médiateurs toxiques. Plus spécifiquement, le recrutement et l'activation des éosinophiles dans les voies aériennes des patients asthmatiques semblent être un agent contribuant à l'histopathologie et aux dysfonctionnements pulmonaires caractéristiques de l'asthme (Jacobsen et al. 2007). Chez les patients souffrant d'asthme, la MBP présente dans le sérum et dans le LBA est corrélée avec l'hyperréactivité bronchique (HBR) (Wardlaw et al. 1988). Cette protéine augmente la contraction des cellules musculaires lisses en agissant comme un antagoniste endogène des récepteurs muscariniques M2 (Jacoby et

al. 2001). De plus, de concert avec la MBP, l'ECP provoque la dégranulation des mastocytes et des basophiles et stimule la sécrétion de mucus (Zheutlin et al. 1984). Au niveau de la production de l'EPO, les substances générées à partir de cette protéine sont capables de détruire la matrice extracellulaire, suggérant un rôle dans la destruction de l'épithélium bronchique observé lors de la phase retardée de la réaction allergique asthmatique (Rees, 2007). Les éosinophiles constituent aussi une source majeure de cystéinyl leucotriènes, en particulier LTC₄, dans la muqueuse bronchique chez l'asthmatique. Ce médiateur est responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la sécrétion de mucus et est un bronchoconstricteur puissant (Rothenberg et al. 2006). De plus ces cellules sont fortement productrices de TGF-β1 qui est fortement impliqué dans la production des protéines de la matrice cellulaire (tenascin, lumican...) au niveau de la muqueuse des voies aériennes, participant ainsi au processus de remodelage dans l'asthme (Flood-Page et al. 2003).

Des souris déficientes en éosinophiles (souris PHIL) sensibilisées et provoquées à l'OVA, présentent un défaut de recrutement des lymphocytes T effecteurs dans les poumons (probablement lié à l'absence de production de CCL17 et CCL22 par les éosinophiles), une diminution de l'HRB, des taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans le LBA et de l'accumulation de mucus, suggérant l'implication des éosinophiles dans la réaction pulmonaire allergique (Lee et al. 2004; Jacobsen et al. 2008). Néanmoins, des souris Δdbl GATA, elles aussi déficientes en éosinophiles, ne montrent aucune modification de production de mucus, de l'HRB et des taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) pulmonaires comparativement aux souris WT après sensibilisation et provocations à l'OVA (Humbles et al. 2004). Hormis la différence de souches utilisée (BALB/c pour les souris Δdbl GATA, C57BL/6 pour les souris PHIL) et de mutation/délétion réalisée pouvant entraîner d'autres modifications immunologiques, ces résultats sont difficilement explicables et soulignent la complexité du rôle des éosinophiles dans l'asthme. Néanmoins, dans un modèle d'asthme chronique (sensibilisation suivie de nombreuses provocations à l'OVA), les souris Δdbl GATA sont protégées contre le remodelage bronchique : absence de dépôts péribronchiques de collagène et d'hyperplasie des cellules musculaires lisses (Humbles et al. 2004). Enfin, dans un modèle chronique d'inflammation pulmonaire allergique induite par un extrait allergénique d'*Aspergillus fumigatus* (trois provocations allergéniques pendant trois semaines), les souris Δdbl GATA présentent une réduction de la production de mucus et de cytokines Th2 (Fulkerson et al. 2006).

2.9. Apoptose et signaux de survie des éosinophiles

Lorsqu'ils ont rempli leur fonction, les éosinophiles peuvent disparaître de façon contrôlée et programmée par un mécanisme nommé apoptose. Il s'agit d'un facteur important pour l'homéostasie cellulaire et pour la résolution des phénomènes inflammatoires. Ce processus est distinct de la cytolyse, dans laquelle le contenu cellulaire est libéré. L'apoptose permet à la cellule de disparaître sans causer de dommages tissulaires importants. Au niveau cytologique, il s'agit d'une formation d'invaginations membranaires, une condensation et une fragmentation, de la chromatine sous forme de polynucléosomes puis d'oligonucléosomes. La cellule dans sa globalité se rétracte et se morcelle en corps apoptotique qui sont reconnus et phagocytés par les monocytes/macrophages (Simon 2000).

Comme beaucoup d'autres cellules, les éosinophiles déclenchent non seulement leur apoptose en l'absence de facteur de survie, mais aussi en présence de signaux exogènes spécifiquement apoptogènes reconnus par des récepteurs de surfaces appelés « death receptor » qui font partie de la superfamille des TNF Receptor (TNFR). L'un de ces récepteurs exprimé par les éosinophiles est le CD95 (Fas/APO-1). Les cellules T activées expriment fortement CD95L et libèrent les hématopoïétines, produisant donc des signaux de survie et de mort pour les éosinophiles (Simon 2000). L'addition d'un anticorps monoclonal anti-Fas diminue la viabilité induite par les hématopoïétines et l'ajout de l'IL-5 ne surmonte pas le déclenchement de l'apoptose induite (Matsumoto et al. 1995; Tsuyuki et al. 1995).

Les éosinophiles humains expriment aussi le CD30, membre de la superfamille des TNFR, à un niveau faible et constant. La liaison de CD30 engendre une diminution de la survie induite préalablement par l'IL-5 de façon temps et dose dépendante en augmentant l'apoptose. Comme le CD95, l'addition de l'IL-5 n'inhibe pas le déclenchement de l'apoptose (Matsumoto et al. 2004).

Le CD69, un autre « death receptor », n'est exprimé de façon temps et concentration dépendante sur les éosinophiles que lorsque ceux-ci sont activés par les cytokines IL-3, IL-5, IL-13 et GM-CSF (Luttmann et al. 1996; Walsh et al. 1996). En présence d'un anticorps monoclonal contre le CD69, les éosinophiles subissent une apoptose même en présence du GM-CSF (Walsh et al. 1996).

Siglec 8, une molécule importante est montrée comme impliquée dans l'apoptose des éosinophiles. En présence d'un anticorps anti-Siglec 8, une apoptose des éosinophiles a été décrite. Cette apoptose est dépendante de la voie des caspases ainsi que la production des ROS

aboutissant à des dommages mitochondriaux (Kiwamoto et al. 2012). Cette apoptose est toujours présente même en présence d'IL-5.

Comme nous l'avons décrit ultérieurement, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont nécessaires pour la survie des éosinophiles. Plusieurs messagers chimiques sont également responsables, indirectement, d'une inhibition de l'apoptose en induisant la sécrétion autocrine des hématopoïétines (IL-3, IL-5, ET GM-CSF). L'IFN- γ , le CD40, le LPS, le TNF- α et le CD9 provoquent une production accrue de GM-CSF, d'IL-3 et d'IL-13 (Giembycz et al. 1999). En revanche, l'induction de l'apoptose par TGF- β est liée à l'absence de sécrétion de GM-CSF, d'IL-3 ou d'IL-5. De même, l'éotaxine (CCL11) un ligand du CCR3, favorise l'éosinophilie d'une façon coopérative avec l'IL-5 (Collins et al. 1995; Mould et al. 1997).

Les cytokines dérivées des cellules épithéliales (TSLP, IL-25, IL-33) promeuvent l'éosinophilie par la production d'IL-5. Ainsi le récepteur de TSLP est exprimé par les éosinophiles aboutissant à la modulation de leur survie et leur activation (Wong et al. 2010). L'IL-25 est produit aussi principalement par les cellules Th2 activées, les mastocytes et induit la production des cytokines de type Th2 comme l'IL-5 par les cellules Th2 et les cellules lymphoïdes innées décrites récemment chez les souris incluant les nuocytes et les cellules natural helper (Moro et al. 2010; Neill et al. 2010; Ikutani et al. 2012). De cette manière, l'IL-25 peut amplifier le développement, le recrutement et la survie des éosinophiles dans les cas d'allergies. Une expression importante d'IL-25 et une autre de son récepteur IL-25R ont été détectées dans les biopsies bronchiques et de peaux de patients allergiques (Corrigan et al. 2011a), et les éosinophiles ont été identifiés eux-mêmes comme source primaire de l'IL-25 chez les patients atteints du Churg-Strauss syndrome (Terrier et al. 2010). L'IL-33 est un membre de la famille de cytokine IL-1. Cette cytokine est exprimée par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes, et les adipocytes. L'IL-33 contribue généralement à la synthèse et la libération de l'IL-5 à partir de l'une ou plusieurs des cellules cibles précitées, et favorise ainsi l'éosinophilie systémique (Cherry et al. 2008).

CHAPITRE 3 : LES CELLULES NATURAL KILLER

3.1. Introduction

Les cellules Natural Killer (NK), cellules de l'immunité innée, ont été découvertes au début des années 1970. Chez l'adulte, les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Au cours de leur développement, ces cellules acquièrent un répertoire complexe de récepteurs activateurs et inhibiteurs, ainsi que des récepteurs aux cytokines, chimiokines et d'autres récepteurs tels que les Toll-Like Receptors (TLR). Lors de leur développement, les cellules NK sont également éduquées afin d'être tolérantes vis-à-vis du Soi à l'état basal. D'un point de vue fonctionnel, ces cellules sont essentiellement impliquées dans les mécanismes de défense anti-infectieuse et anti-tumorale de par leur capacité à lyser les cellules infectées ou tumorales et à produire des cytokines et chimiokines. Parmi les cytokines produites par les cellules NK, certaines ont un rôle déterminant dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

3.2. Développement, maturation et diversité des cellules NK chez l'homme

Les cellules NK dérivent de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺. Chez l'adulte, de par son microenvironnement riche en cytokines, facteurs de croissance et cellules stromales, la moelle osseuse est le principal site de formation des cellules NK. Le thymus, les ganglions lymphatiques, le foie et la rate constituent également des sites de développement des cellules.

3.2.1. Développement et maturation des cellules NK humaines

Les cellules NK humaines sont phénotypiquement caractérisées par l'expression du CD56 et l'absence d'expression du CD3. Le niveau d'expression du CD56 à la surface des cellules NK permet de les différencier en deux sous-populations fonctionnellement distinctes : les cellules NK CD56^{bright} et les cellules CD56^{dim}. Dans cette partie, leurs localisations ainsi que leurs propriétés seront décrites.

Un modèle de développement des cellules NK humaines *in vivo* composé de cinq stades a été proposé (Freud et al. 2006a) (Figure 14). Les trois premiers stades comportent des cellules engagées dans la lignée des cellules NK mais qui sont aussi capables de se différencier en d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et les DC myéloïdes (mDC). Les stades 4 et 5 signent l'entrée définitive dans la lignée des cellules NK.

a. Stade 1 : les pro-NK

Ce stade se développe à partir des précurseurs/progénéiteurs hématopoïétiques. Les cellules pro-NK sont caractérisées par l'expression du CD34 (CD34^{high}), du CD10 et du CD45RA et par l'absence d'expression du CD94, du CD117 et du CD122. L'absence d'expression du CD122 sur ces cellules les rend donc non-réactives à l'IL-15. Outre leur présence dans la moelle osseuse, les pro-NK sont présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires, sites supportant également la différenciation des cellules NK (Freud et al. 2005; Freud et al. 2006a).

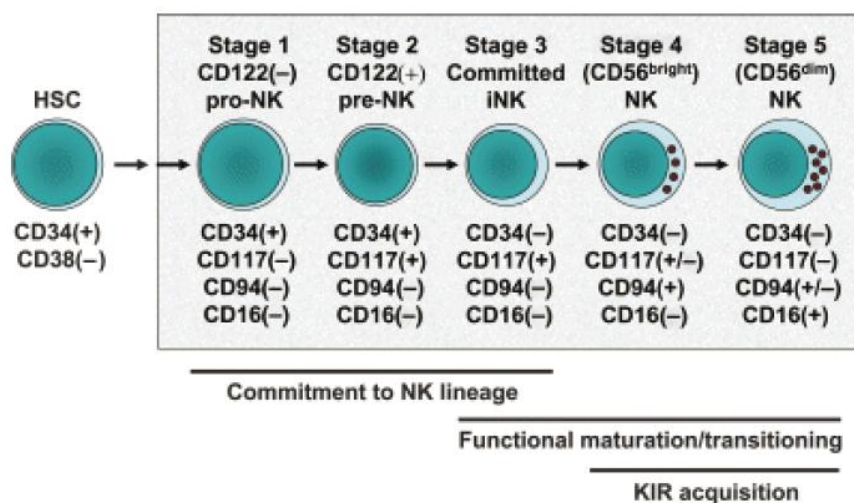


Figure 14 : Modèle *in vivo* de développement des cellules NK humaines. Le modèle de développement des cellules NK humaines à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse est composé de 5 stades. Ces derniers (encadré gris) pourraient se dérouler dans les organes lymphoïdes secondaires. Les stades 1 et 2 ne sont pas spécifiques de la lignée des cellules NK. Le stade 3 signe l'entrée définitive des cellules NK avec la perte de capacité de développement en DC ou en cellules T. A partir de ce stade, les cellules NK subissent une maturation fonctionnelle qui s'accompagne de l'acquisition des répertoires KIR. D'après Freud AG et al, 2006

b. Stade 2 : les pré-NK

L'absence d'expression du CD122 sur les pro-NK les rend non réactives à l'IL-15. Elles acquièrent cette caractéristique après différenciation en cellule pré-NK. Dans la moelle osseuse, la différenciation des pro-NK en pré-NK semble dépendante de flt3 ligand, de c-kit ligand, de l'IL-6 et de l'IL-7. En effet, des études à partir des précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ humains ont montré que ces cytokines induisaient une augmentation de la fréquence de

CD34⁺ à l'IL-15/IL-2 (Yu et al. 1998; Miller et al. 1999), pouvant correspondre aux pré-NK dans ce modèle. Dans les tissus lymphoïdes secondaires, la différenciation des pro-NK en pré-NK semble faire intervenir flt3 ligand, l'IL-3 et l'IL-7. En effet, in vitro, une partie de pro-NK isolées de tissus lymphoïdes secondaires stimulées par la combinaison flt3-ligand/IL-3/IL-7 acquiert un phénotype de pré-NK et est capable de se différencier en cellules NK en réponse à l'IL-15 (Freud et al. 2006a).

Phénotypiquement, ces pré-NK sont notamment caractérisées par l'acquisition de CD117 (c-kit) et par la diminution de l'expression du CD34. Dans le sang périphérique, des cellules CD34^{dim} CD45RA⁺β₇^{bright} (pouvant correspondre aux pré-NK de ce modèle) expriment à leur surface de forts taux de leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), L-sélectine et d'intégrines α₄ β₇. Ces trois molécules pourraient faciliter l'extravasation de ces cellules à travers les High Endothelium venules (HEV) des ganglions lymphatiques. A l'inverse, les cellules CD34^{dim} CD45RA⁺β₇^{bright} présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires expriment peu ou pas la L-sélectine. Par conséquent, la L-sélectine pourrait être impliquée dans l'extravasation de ces cellules vers les ganglions lymphatiques et son expression serait diminuée après leur entrée. En terme de localisation, ces pré-NK représentent plus de 95% de cellules CD34⁺ dans les tissus lymphoïdes secondaires, alors qu'elles ne sont que très faiblement présentes dans la moelle osseuse (moins de 1%) et le sang (moins de 6%) (Freud et al. 2005).

c. Stade 3 : les cellules NK immatures

Ce stade est caractérisé par la perte d'expression du CD34, du CD10 et des intégrines β₇, alors que l'expression du CD127 est augmentée. De plus les antigènes associées aux autres lignées (CD3, CD4, CD5, CD19, CD14, CD123, BDCA-1, DC-SIGN...) sont totalement absents de ces cellules. Néanmoins, la population du stade 3 est encore hétérogène puisque seule une fraction des cellules appartenant à ce stade s'engage dans la lignée de cellules NK. Les cellules NK immatures expriment à des taux variables des marqueurs exprimés par les cellules NK matures tels que le CD2, le CD56, dont l'expression augmente graduellement du stade 2 au stade 4, le CD161, le 2b4 (CD244) et le NKp44. Néanmoins, certains récepteurs trouvés sur les cellules NK matures, tels que les récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2, le NKG2D, le NKp46, le CD16 ou les KIR ne sont pas encore exprimés (Freud et al. 2006a). Le défaut d'expression de ces récepteurs est corrélé à un défaut fonctionnel. Ainsi, ces cellules ne peuvent ni produire d'IFN-γ ni lyser les cellules cibles déficientes en CMH I (Trinchieri 1989; Freud et al. 2006a). Néanmoins, des cellules NK immatures isolées et stimulées *ex vivo* par la

combinaison IL-2/PMA/Ionomycine produisent du GM-CSF(Freud et al. 2006b). De plus des cellules NK immatures générées *in vitro* par de fortes doses d'IL-2 produisent des cytokines de type 2 (IL-13) et lysent des cellules Jurkat via l'expression du Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL)(Zamai et al. 1998).

Dans les tissus lymphoïdes secondaires, la majorité des cellules de stade 3 CD34⁻ CD117⁺ CD161⁺ CD94⁻ expriment sélectivement et abondamment les ARNm de l'IL-22 (cytokines Th17) et de l'IL-16 et produisent de l'IL-22 (marquage intracellulaire), cytokine impliquée dans l'immunité de la muqueuse(Hughes et al. 2009). Une population de cellules NK produisant de l'IL-22 et non pas d'IL-17 et exprimant le NKp44 a été caractérisée au niveau de tissus lymphoïdes associés aux muqueuses tels que les plaques de Peyer. Les cellules NKp44⁺ sont également positives pour l'IL-26 et le LIF (Leukaemia inhibitory factor), deux médiateurs qui activent, tout comme l'IL-22, les cellules épithéliales. Ces cellules possèdent pour la plupart d'entre elles un récepteur CCR6 fonctionnel et sont capables de produire la chimiokine CCL20, couple impliqué dans la migration des lymphocytes (B, TCD4⁺ et Th17) et des cellules dendritiques (DC) vers la muqueuse. Ainsi, la production de CCL20 par les cellules NK22, promeut l'attraction de différents types cellulaires mais également leur propre accumulation(Cella et al. 2009).

d. *Stade 4 : les cellules NK CD56^{bright}*

Ce stade signe l'entrée définitive dans la lignée des cellules NK. Les facteurs permettant la différenciation des cellules NK immatures en cellules NK CD56^{bright} ne sont pas définis. Bien que permettant la prolifération des cellules NK CD56^{bright}, l'IL-15 a été montrée comme incapable d'induire cette différenciation *in vitro*, suggérant la nécessité d'autres facteurs endogènes *in vivo*. Dans les tissus lymphoïdes secondaires, ces facteurs pourraient être produits par les lymphocytes T activés puisqu'une culture de cellules NK immatures en présence de lymphocytes T autologues activés (combinaison d'anticorps activateurs anti-CD3 et anti-CD28 (anti-CD3/CD28) et d'IL-15 aboutit à la génération de cellules NK CD56^{bright} (Freud et al. 2006b).

D'un point de vue phénotypique, la progression vers ce stade est marquée par l'acquisition du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, du NKG2D, du NKp46, du CD122 et des granules de perforine et par la diminution de l'expression de CD117, du CD127 et du CD33(Freud et al. 2006a). De plus, ces cellules n'expriment pas voire peu le CD16 et les récepteurs KIR. D'un point de vue fonctionnel, leur contenu en granules intra-cytoplasmiques étant faible, ces cellules sont peu cytotoxiques *ex vivo* mais sont tout de même capables, pour la plupart, de tuer

les cellules cibles via la perforine et Fas-ligand. De plus, de par leur abondante sécrétion de cytokines (essentiellement l'IFN- γ) après stimulation, ces cellules apparaissent comme une population régulatrice de la réponse immune (Cooper et al. 2001; Jacobs et al. 2001; Freud et al. 2006b).

En terme de localisation, les cellules NK CD56^{bright} représentent 90% des cellules NK des ganglions lymphatiques et des amygdales, alors qu'elles ne représentent que 10% des cellules NK du sang périphérique (Fehniger et al. 2003; Ferlazzo et al. 2004b). Ces cellules sont également retrouvées au niveau des sites inflammatoires (par exemple dans le liquide pleural de patients souffrant de maladies pulmonaires malignes ou infectieuses) (Dalbeth et al. 2004). Certaines cellules du stade 4 sont encore déficientes en perforine et en IFN- γ , suggérant l'existence d'une étape de maturation supplémentaire (Freud et al. 2006a; Freud et al. 2006b).

e. Stade 5 : les étapes de maturation des cellules NK

Les cellules NK du sang périphérique peuvent être divisées en 2 sous-population en fonction du niveau d'expression du CD56 : les cellules CD56^{bright} (stade 4) et les cellules NK CD56^{dim} (Cooper et al. 2001). Les cellules NK CD56^{dim}, exprimant faiblement le CD56 à leur surface, expriment le CD16 et les récepteurs KIR (CD158a, CD158b...) et possèdent de grandes quantités de granules intra-cytoplasmiques contenant de la perforine et les granzymes A. Ainsi, ces cellules sont très cytotoxiques mais prolifèrent peu et produisent peu de cytokines (Jacobs et al. 2001). Elles représentent 90% des cellules NK du sang périphérique, de la moelle osseuse et de la rate.

Le lien entre ces deux sous-populations n'est pas clairement défini. Néanmoins, en 1986, Lanier et son équipe ont proposé que les cellules NK CD56^{bright} sont les précurseurs des cellules NK CD56^{dim} (Lanier et al. 1986). Au moins huit observations renforcent cette hypothèse :

- i. Seules les cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique expriment le CD117 comme les précurseurs hématopoïétiques (Matos et al. 1993).
- ii. Certaines cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique ne contiennent pas de granules intra-cytoplasmiques, alors que toutes les cellules NK CD56^{dim} en possèdent (Lanier et al. 1986).
- iii. La culture de précurseurs CD34⁺ en présence d'IL-2 et d'IL-15 conduit principalement à la génération de cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ KIR⁻ (Lotzova et al. 1993; Mrozek et al. 1996).

- iv. Après transplantation de précurseurs CD34⁺, les premières cellules issues de ces précurseurs sont les cellules NK CD56^{bright}, les CD56^{dim}, n'apparaissant que plus tardivement (Jacobs et al. 1992; Shilling et al. 2003; Vitale et al. 2004).
- v. Dans le sang et les tissus lymphoïdes secondaires, les cellules NK KIR⁺ sont principalement présentes parmi la fraction cellulaire CD94^{+/-} CD16⁺, indiquant que l'acquisition des KIR est cumulative et stable et a lieu durant des évènements tardifs de maturation à la fois *in vitro* et *in vivo* (Valiante et al. 1997; Miller et al. 2001; Shilling et al. 2002; Sivori et al. 2003; Vitale et al. 2004).
- vi. *In vitro*, les cellules NK CD56^{bright} du sang circulant sont capables de se différencier en cellules NK CD56^{dim} partageant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} du sang circulant. Cette différenciation ne touche que 30 à 40% des cellules NK CD56^{bright} et nécessiterait une interaction entre le CD56 et le FGFR1 présent à la surface des fibroblastes. Cette différenciation est retrouvée *in vivo* ou la quasi-totalité des cellules NK CD56^{bright} injectées à des souris NOD-SCID se différencient en cellules NK CD56^{dim} (Chan et al. 2007).
- vii. les cellules NK CD56^{dim} isolées du sang périphérique possèdent des télomères plus courts que les cellules NK CD56^{bright}, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle les cellules NK CD56^{dim} seraient plus matures que les cellules NK CD56^{bright} (Chan et al. 2007).
- viii. Une étude récente a montré que, *in vivo*, la *trans*-présentation de l'IL-15 conduit à la différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}. Ainsi, le transfert de cellules NK CD56^{bright} CD16⁻ KIR⁻ (stade 4) à des souris BALB/c Rag2^{-/-} γc^{-/-} traitées avec l'IL-15 humain liée de façon covalente à IL-15Rα humain aboutit à la différenciation en cellules NK CD16⁺ exprimant pour certaines des récepteurs KIR. L'IL-15 *trans*-présentée induit donc *in vivo* l'expression des récepteurs KIR sur les cellules NK CD56^{dim} CD16⁺ et suggère que les récepteurs KIR sont exprimés après le CD16 et que l'acquisition de ces récepteurs KIR représente une étape encore plus tardive dans la différenciation des cellules NK (Huntington et al. 2009).

Bien que la quasi-totalité des études supporte une différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}, une étude a proposé que les cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique représenteraient un stade activé plutôt qu'un stade immature. Les cellules NK isolées du sang périphérique, majoritairement CD56^{dim}, cultivées en présence d'IL-12 ont une expression augmentée du CD56 et une expression diminuée du CD16, leur conférant ainsi un phénotype de cellules NK CD56^{bright}. Tout comme les cellules CD56^{bright} du sang

périphérique, ces cellules possèdent une expression accrue de récepteurs activateurs (NKp44 et NKp46), du CD161 et de molécules d'adhérence/costimulation (CD2, CD62L, et CD244). D'un point de vue fonctionnel, en réponse à des stimuli spécifiques (IL-12, NKp46, lignées tumorales et activation du CD16), les cellules NK CD45^{bright} produisent davantage d'IFN- γ et de TNF- α comparativement aux cellules NK CD56^{dim}. De plus ces cellules acquièrent la capacité de produire de l'IL-10 pouvant indiquer une entrée en apoptose, suggérant ainsi que ces cellules sont à un stade terminal de différenciation. Enfin, la faible capacité cytotoxique de ces cellules liée à la diminution des granules intra-cytoplasmiques serait attribuée à une récente dégranulation *in vivo* (Loza et al. 2004).

3.2.2. Diversité des cellules NK humaines

Plusieurs différences phénotypiques et fonctionnelles existent entre les deux sous populations des cellules NK.

- i. Récepteurs de cytokines :* Ces deux sous-populations diffèrent dans l'expression de récepteurs de cytokines et notamment le récepteur de l'IL-2. Toutes les cellules NK expriment un récepteur hétérodimérique d'affinité intermédiaire à l'IL-2 (IL-2R $\beta\gamma$) (Cooper et al. 2001), mais seulement les cellules NK CD56^{bright} expriment le récepteur hétérodimérique de forte affinité (IL-2R $\alpha\beta\gamma$) (Caligiuri et al. 1990). Ces dernières expriment également le récepteur *c-kit*, favorisant leur prolifération et leur survie en réponse à l'IL-2 (Matos et al. 1993; Carson et al. 1994). Les cellules NK CD56^{bright} sont donc extrêmement réceptives à l'IL-2, et peuvent ainsi proliférer *in vitro* et *in vivo* en réponse à de très faibles concentrations de cette cytokine (Caligiuri et al. 1993). Au contraire, les cellules NK CD56^{dim}, n'exprimant que le récepteur hétérodimérique $\beta\gamma$ à l'IL-2, et négatives pour *c-kit*, ne prolifèrent pas, même en présence de très fortes doses d'IL-2 *in vitro* (Caligiuri et al. 1990).
- ii. Récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion :* Les deux sous-populations des cellules NK ont des localisations différentes dans l'organisme (Walzer et al. 2011). Cette distribution résulte probablement de l'expression différentielle de récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion par ces deux sous-populations (figure 15). Ainsi, les cellules NK CD56^{bright}, expriment les récepteurs CCR7, CXCR3 et la sélectine CD62L expliquant leur localisation préférentielle dans les organes lymphoïdes secondaires (Walzer et al. 2011). Les cellules NK CD56^{dim} n'expriment pas, quant à elles, CCR7 et perdent progressivement l'expression de CD62L au cours de leur différenciation (Juelke et al. 2010).

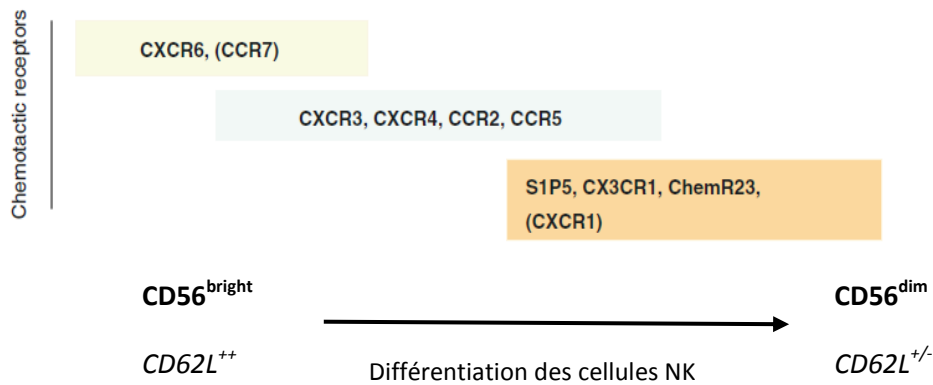


Figure 15 : Récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion sur les cellules NK humaines : Adaptée d'après Walzer et Vivier, 2011

iii. **Récepteurs des cellules NK (NKR) et CD16 :** Les mécanismes par lesquels les cellules NK reconnaissent une cellule cible à éliminer et la distinguent d'une cellule saine à tolérer sont complexes et encore non entièrement élucidés à ce jour (Caligiuri 2008). Ces mécanismes comprennent un ensemble de signaux inhibiteurs et activateurs, transmis par des récepteurs appelés Natural Killer Cell Receptors (NKR). Chez l'homme, les NKRs sont divisés en familles structurales : les récepteurs de type immunoglobuline (ou KIRs : *Killer-cell Immunoglobulin-like receptors*) et les récepteurs de type lectine-C (par exemple le CD94 couplé aux récepteurs NKG2)(Cooper et al. 2001). Ces différents récepteurs, leurs ligands et la transduction de leurs signaux seront décrits dans le prochain chapitre. L'expression de l'ensemble de ces récepteurs est différente pour les deux sous-populations de cellules NK. Ainsi, les cellules NK CD56^{bright}, n'expriment pas ou peu des KIRs, mais fortement le complexe inhibiteur CD94-NKG2A. Le niveau d'expression de ces récepteurs est inversé pour les CD56^{dim} : majoritairement KIRs⁺ et CD94-NKG2A⁻.

Le CD16, ou FcγRIII, est le récepteur de faible affinité pour la chaîne lourde des immunoglobulines G. Il est responsable du phénomène de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), que nous dériverons plus tard. Son expression diffère également entre les deux sous populations des cellules NK humaines : les CD56^{bright} sont majoritairement (à 50-70%(Cooper et al. 2001) négatives pour le CD16 (la faible proportion de CD56^{bright} CD16⁺) l'exprimant avec une faible densité) ; alors que plus de 95% des cellules NK CD56^{dim} sont des CD16^{bright} et réalisent ainsi plus d'ADCC que les CD56^{bright} (Cooper et al. 2001).

3.3. Activation et inhibition des cellules NK / intégration des différents signaux

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas les enzymes RAG-1 (*Recombinase Activating Gene-1*) et RAG-2 (*Recombinase Activating Gene-2*) permettant à ceux-ci de réarranger et d'exprimer de façon stochastique un récepteur spécifique d'un antigène particulier (Lanier 2005). Néanmoins les cellules NK sont capables de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées ou des cellules tumorales. Leur système de discrimination du Soi et du non-Soi ou du Soi altéré met en jeu des récepteurs capables d'interagir avec les molécules du CMH I ainsi que d'autres récepteurs aux ligands mal connus. Elles expriment un ensemble de récepteurs (activateurs et inhibiteurs) qui permettent à la cellule NK de distinguer une cellule cible à éliminer d'une cellule saine à tolérer.

3.3.1. La reconnaissance par la cellule NK

Par bien des aspects, les cellules NK sont plus proches des lymphocytes T CD8⁺ que d'autres cellules immunitaires innées (Narni-Mancinelli et al. 2011b). Leurs fonctions effectrices sont relativement proches (Vivier et al. 2008): les cellules NK comme les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, peuvent lyser une cellule cible via la sécrétion de perforine et granzymes. De plus, tout comme les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les T CD4⁺ Th1, les lymphocytes NK peuvent produire des quantités importantes d'IFN- γ . Enfin, il a été montré que la reconnaissance d'une cellule cible par une cellule NK requiert la formation d'une synapse NK, comparable à celle mise en jeu entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène. Cette synapse correspond à une organisation très structurée des récepteurs participant à la reconnaissance des micro-domaines membranaires de la cellule cible (Davis et al. 1999; Lou et al. 2000; Vyas et al. 2001).

Cependant, les mécanismes de reconnaissance des cellules NK semblent plus complexes que ceux des lymphocytes T, pour lesquels le TCR joue un rôle nécessaire et quasi-suffisant, entraînant la différenciation, l'activation et les fonctions effectrices de ces cellules. L'activation des cellules NK n'est, en effet, pas gouvernée par un signal unique de ce type, mais par l'intégration de très nombreux signaux, parmi lesquels plusieurs pourraient être assimilés à ceux fournis par les molécules co-stimulatrices ou les molécules d'adhérence des lymphocytes T (Lanier 2005).

De nombreux récepteurs des cellules NK (NKR), inhibiteurs et activateurs, ont ainsi été caractérisés. Ces NKRS constituent le répertoire de reconnaissance des cellules NK (Raulet et al. 2001; Stewart et al. 2006).

3.3.2. Les récepteurs des cellules NK

3.3.2.1. La superfamille des lectines de type C

- i. Les hétérodimères CD94/ NKG2* : Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK sous la forme d'hétérodimères. Ceux-ci comprennent une sous-unité commune invariante, le CD94, liée de façon covalente à une sous-unité codée par un gène de la famille NKG2 (Lazetic et al. 1996; Brooks et al. 1997; Carretero et al. 1997). Alors que le CD94 est un simple gène ne présentant pas ou peu de polymorphisme allélique (Chang et al. 1995), la famille NKG2 comprend quatre gènes *NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E*, *NKG2D/F*. Le CD94 et les quatre gènes sont colocalisés sur le chromosome humain 12p12.3-p13.1. Les domaines extracellulaires et cytoplasmiques du *NKG2A*, *NKG2C* et *NKG2E* sont structurellement divers, suggérant ainsi à la fois des différences dans la reconnaissance du ligand et dans la transduction du signal (Houchins et al. 1991; Yabe et al. 1993; Adamkiewicz et al. 1994; Plougastel et al. 1996; Plougastel et al. 1997). Concernant la transduction du signal, celle-ci semble assurée par le récepteur NKG2 puisque le CD94 est dépourvu de partie cytoplasmique (Chang et al. 1995). Les complexes CD94/*NKG2A*, CD94/*NKG2B* (le *NKG2B* étant une forme alternative du *NKG2A*) et CD94/*NKG2C* reconnaissent la molécule du CMH I non classique, HLA-E. Contrairement aux autres molécules du CMH I qui fixent et présentent des peptides cytoplasmiques du Soi, les molécules HLA-E fixent et présentent des peptides dérivés de séquences signal des molécules du CMH I classiques HLA-A, HLA-B, HLA-C et de la molécule de CMH I non classique HLA-G. La fixation de ces séquences signal est indispensable pour la stabilisation et l'expression membranaire des molécules HLA-E. Ainsi, une diminution de l'expression des molécules du CMH I HLA-A, HLA-B, HLA-C et HLA-G mène à une réduction de l'expression membranaire de la molécule HLA-E. L'interaction entre les complexes CD94/*NKG2* et la molécule HLA-E permet alors aux cellules NK de surveiller indirectement l'expression des autres molécules du CMH I par une cellule donnée et de surveiller directement l'expression de la molécule HLA-E en elle-même (Braud et al. 1997; Borrego et al. 1998; Braud et al. 1998a; Braud et al. 1998b; Lee et al. 1998; Llano et al. 1998). Chez la souris, les complexes hétérodimériques CD94/*NKG2A*, CD94/*NKG2C* et

CD94/NKG2E reconnaissent une molécule proche du HLA-E : la molécule Qa-1 (Vance et al. 1998). Hormis la reconnaissance d'un ligand différent et leur localisation chromosomique différente (chromosome 6), les complexes murins CD94/NKG2 présentent les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles que leurs homologues humains.

D'un point de vue fonctionnel, seuls les hétérodimères CD94/NKG2A et CD94/NKG2B sont inhibiteurs. Au niveau de leur domaine cytoplasmique, ces complexes présentent des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIM). Après phosphorylation de la tyrosine de ce motif, des phosphates et plus particulièrement SHP-1, sont recrutées, conduisant ainsi à la transduction d'un signal négatif (Lanier 1998). Les hétérodimères CD94/NKG2C et CD94/NKG2E sont, quant à eux, des récepteurs activateurs. Ces récepteurs ne contiennent pas de motifs ITIM dans leur domaine cytoplasmique, mais sont associés à la protéine DAP12 contenant des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif (ITAM), relayant ainsi des signaux activateurs aboutissant à la fois à la sécrétion de cytokines/chimiokines et à la cytotoxicité (Lanier L.L 2008) (Figure 16). Généralement, que ce soit pour les complexes CD94/NKG2 ou les autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance des molécules du CMH I (tels que les KIR humains qui feront l'objet d'une description ultérieure), la fixation du CMH I sur les récepteurs activateurs est de plus faible affinité, suggérant ainsi une dominance de l'inhibition (Lanier 1998; Bryceson et al. 2006).

- ii. **Le NKG2D :** Contrairement aux autres membres de la famille NKG2, le NKG2D s'exprime sous forme d'homodimères et ne contient aucun motif de signalisation connu dans son domaine intracellulaire. Ainsi, le NKG2D s'associe à des protéines adaptatrices via des résidus chargés dans son domaine transmembranaire. Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, le NKG2D forme un complexe avec la protéine adaptatrice DAP10 (Wu et al. 1999; Nausch et al. 2008). Contrairement à la protéine adaptatrice DAP12, DAP10 ne contient aucun des motifs ITAM mais un autre motif permettant le recrutement de la PI-3Kinase (PI3K) et du complexe Grb2-Vav, relayant des signaux activateurs aboutissant uniquement à la cytotoxicité (Lanier 2008) (Figure 17). Chez la souris, le NKG2D s'associe également avec la protéine adaptatrice DAP12 (Rosen et al. 2004). Chez l'homme, le NKG2D fixe des membres de la famille RAET-1 et les membres de la famille MIC (MICA et MICB). Les membres de la famille RAET-1 ont été initialement référencés comme les protéines ULBP (human cytomegalovirus UL16 binding protein) (Nausch et al. 2008). Cette famille comporte six protéines fonctionnelles (Radosavljevic et al. 2002; Eagle et al. 2009). Bien que les transcrits de ces gènes sont détectés dans les cellules de

différents tissus (cœur, poumon, foie...) non touchées par une infection virale ou par un processus de tumorigénèse, l'expression de la protéine à leur surface est quant à elle absente (Cosman et al. 2001), suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle. MICA et MICB sont hautement polymorphiques : 61 allèles pour MICA et 30 allèles pour MICB ont été décrits (Nausch et al. 2008). Leur capacité à fixer le NKG2D diffère en fonction des allèles (Steinle et al. 2001). Les transcrits MICA et MICB sont également trouvés dans de multiples tissus, à l'exception du système nerveux central (Schrambach et al. 2007). Les protéines MICA et MICB sont, quant à elles, faiblement exprimées dans les tissus normaux. En revanche, leur expression est augmentée à la surface des cellules stressées ou tumorales (Nausch et al. 2008).

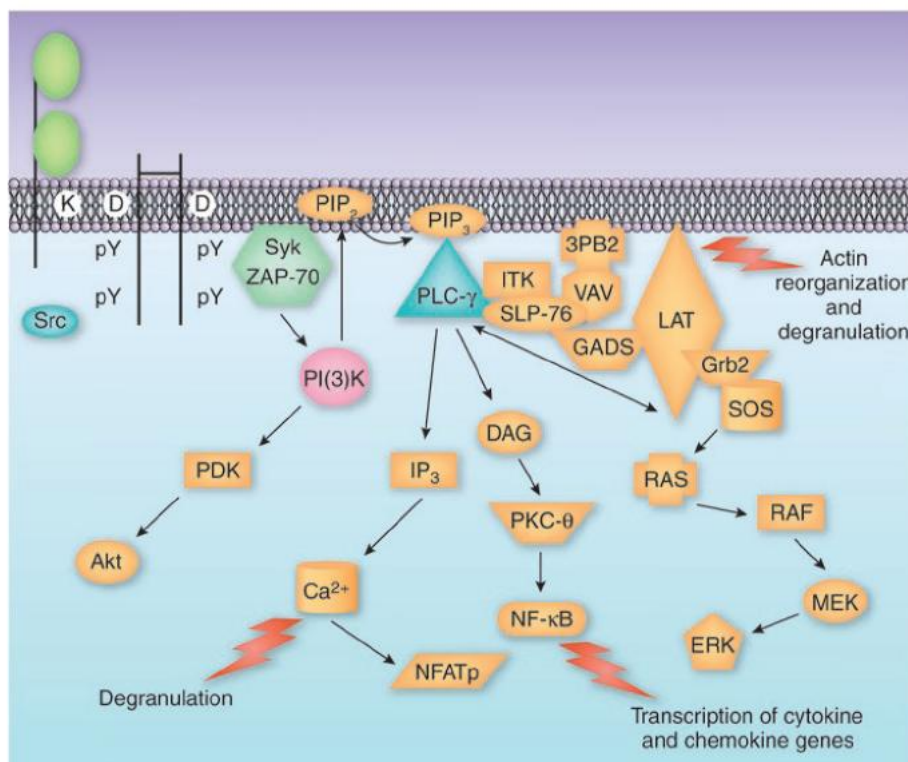


Figure 16 : Transduction du signal via les séquences ITAM et conséquences fonctionnelles sur les cellules NK. Suite à l'activation du récepteur, les motifs ITAM (Y : résidus tyrosine à l'intérieur des domaines ITAM) sont phosphorylés probablement par des kinases de la famille Src. Syk et/ou ZAP-70 (à la fois exprimées par les cellules NK murines et humaines) sont recrutées au niveau des ITAM phosphorylés, initiant ainsi la cascade de signalisation décrite. Ces voies de signalisation sont hypothétiques et sont le résultat d'une synthèse de différentes études réalisées sur les cellules NK humaines et murines. L'activation des récepteurs contenant de motifs ITAM ou étant associés à des molécules adaptatrices portant ces motifs aboutit à la dégranulation des cellules NK mais également à la transcription de gènes codant des cytokines et des chimiokines. D'après Lanier LL, 2008.

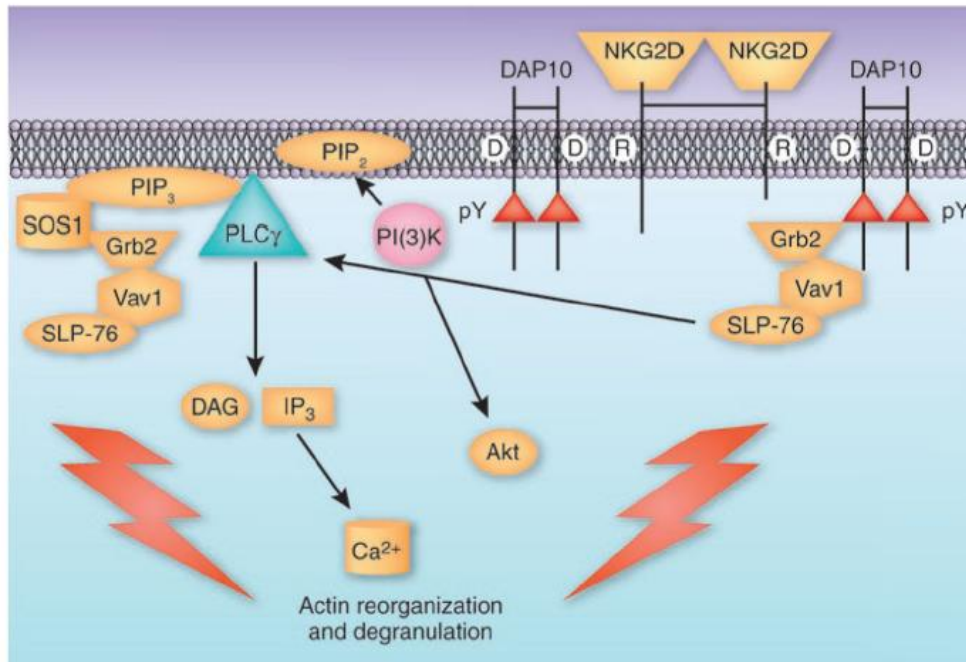


Figure 17 : Transduction du signal via la molécule adaptatrice DAP10 et conséquences fonctionnelles sur les cellules NK. Le récepteur NKG2D ne contient pas d'ITAM mais est associé à la molécule adaptatrice DAP10 contenant un motif YINM dans son domaine cytoplasmique. Après engagement du récepteur, ce motif est phosphorylé et recrute la PI3K et le complexe Grb2-Vav1-SLP76, induisant alors la cascade de signalisation décrite qui aboutit à la dégranulation de la cellule NK. D'après Lanier LL, 2008.

3.3.2.2. Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines

- i. **Les récepteurs KIR :** Ces récepteurs sont absents chez la souris mais présents chez l'homme où les gènes codant ces protéines sont localisés sur le chromosome 19q13.4 au niveau du cluster des récepteurs leucocytaires. En fonction du nombre de domaines extracellulaires Ig-like, ces récepteurs peuvent être divisés en deux sous-familles. Ainsi, la sous-famille KIR3D contient trois domaines Ig-like, alors que les structures KIR2D n'en contiennent que deux (Lanier 1998). Actuellement, quatorze KIR ont été identifiés avec une prédominance de KIR2D (Tableau 1). Outre le nombre de domaines Ig-like extracellulaires variables, ces récepteurs diffèrent également au niveau de la longueur de leur domaine cytoplasmique. Cette divergence caractérise les formes inhibitrices et activatrices. Ainsi les récepteurs à domaine intracellulaire long (KIR2DL et KIR3DL) contiennent deux motifs ITIM responsables du recrutement de phosphatases (SHP1 et SHP2), relayant ainsi un signal inhibiteur (Binstadt et al. 1996; Burshtyn et al. 1996; Valiante et al. 1996). En revanche, les récepteurs à domaine intracellulaire court (KIR2DS et KIR3DS) sont dépourvus de séquences ITIM, mais possèdent un acide aminé chargé (Lysine) dans leur domaine

transmembranaire (Biassoni et al. 1996). Cet acide aminé fixe la protéine adaptatrice DAP12, relayant ainsi un signal activateur (Olcese et al. 1997; Lanier et al. 1998).

Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL, KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent la molécule de CMH I classique HLA-C.

Les récepteurs activateurs KIR2DS1, KIR2DS2 et KIR3DS1 possèdent des similarités de séquences dans leur domaine extracellulaire avec leurs contreparties inhibitrices correspondantes (respectivement KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3 et KIR3DL1), suggérant des spécificités de fixation de ligands communes. Ainsi, KIR2DS1 fixe faiblement l'HLA-C de groupe 1 relayant ainsi un signal positif, alors que KIR2DS2 fixerait faiblement l'HLA-C de groupe 2 (Biassoni et al. 1997; Stewart et al. 2005; Chewning et al. 2007; Foley et al. 2008). Le récepteur KIR2DL4 est un KIR particulier car il est à la fois inhibiteur et activateur (Moretta et al. 2008). Ce récepteur KIR contient à la fois un motif ITIM dans son domaine cytoplasmique et un acide aminé chargé (Arginine) dans son domaine transmembranaire (Cantoni et al. 1998; Ponte et al. 1999; Rajagopalan et al. 2001; Faure et al. 2002; Kikuchi-Maki et al. 2005).

KIR	Original denominations	Ig-like domains	Charged in TM region	Identified ligand
2DL1	p58.1, nkat1	D1-D2	–	HLA-C ^{Lys80} (e.g. HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6)
2DL2	p58.2, nkat6	D1-D2	–	HLA-C ^{Asn80} (e.g. HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8)
2DL3	p58.2, nkat2	D1-D2	–	HLA-C ^{Asn80} (e.g. HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8)
2DL4	p49, I03AS	D0-D2	Arg	HLA-G, -A3, -B46
2DL5		D0-D2	–	?
2DS1	p50.1	D1-D2	Lys	HLA-C ^{Lys80}
2DS2	p50.2, nkat5	D1-D2	Lys	(HLA-C ^{Asn80})?
2DS3	nkat7	D1-D2	Lys	?
2DS4	p50.3, nkat8	D1-D2	Lys	?
2DS5	nkat9	D1-D2	Lys	?
3DL1	p70, NKB1, nkat3	D0-D1-D2	–	HLA-B ^{Bw4} (e.g. HLA-B27)
3DL2	p140, nkat4	D0-D1-D2	–	HLA-A3, -A11
3DL3	KIRC1, KIR3DL7, KIR44	D0-D1-D2	–	?
3DS1	nkat10	D0-D1-D2	Lys	?

Tableau 1 : Principales caractéristiques des KIR humains. D'après Moretta A et al, 2008.

- ii. **Les récepteurs ILT/LIR (Immunoglobulin Like Transcripts/Leucocytes Ig Like Receptors) :** Ces récepteurs sont proches des KIR à la fois génétiquement, structurellement et fonctionnellement. Contrairement à ces derniers, ils n'ont pas une expression restreinte aux cellules NK et à certains lymphocytes T. En effet, ceux-ci sont également exprimés sur les monocytes, les lymphocytes B et les cellules dendritiques (DC). D'un point de vue structural, les protéines ILT/LIR sont caractérisées par la présence de deux ou quatre domaines extracellulaires Ig-like (figure 18). Ainsi, les LIR1, 2, 3, 4, 6a, 7 et 8 et les ILT7 et 8 possèdent 4 domaines extracellulaires Ig-like, alors que LIR5 et 6b n'en possèdent que

deux (Colonna et al. 1999). Comme les récepteurs KIR, la longueur de leur domaine cytoplasmique définit le type de signal (activateur ou inhibiteur) qu'ils relaient. Ainsi, les LIR1, 2, 3, 5 et 8 possèdent un long domaine cytoplasmique contenant deux à quatre motifs ITIM responsables du recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1, relayant ainsi un signal inhibiteur (Arm et al. 1997; Cella et al. 1997; Colonna et al. 1997; Cosman et al. 1997; Colonna et al. 1998; Fanger et al. 1998). Un autre groupe de récepteurs comprenant les ILT, ILT1-like protein, ILT7, ILT8, et LIR6 possède un domaine cytoplasmique court dépourvu de motifs ITIM. En revanche, ces récepteurs possèdent un acide aminé chargé (arginine) dans leur domaine transmembranaire (Borges et al. 1997; Samaridis et al. 1997). Les ILT1, LIR6 et ILT7 s'associent avec le FcεRI-γ, relayant ainsi des signaux stimulateurs (Colonna et al. 1999; Nakajima et al. 1999). Le résidu arginine présent dans le domaine transmembranaire de ces ILT/LIR pourrait être crucial dans cette association (Colonna et al. 1999). Enfin, une troisième catégorie comprenant uniquement LIR4 ne possède ni domaine cytoplasmique, ni domaine transmembranaire suggérant que ce récepteur pourrait être sécrété (Arm et al. 1997; Borges et al. 1997; Colonna et al. 1997).

Seuls les LIR1/ILT2 et LIR7/ILT1 semblent exprimés par les cellules NK. LIR1 appartient au groupe des récepteurs inhibiteurs. Il possède quatre domaines extracellulaires Ig-like et 4 motifs ITIM intracellulaires. Ce récepteur interagit à la fois avec des molécules du CMH I classiques et non classiques. Ainsi, il interagit avec une large variété de molécules classiques HLA-A et -B alors qu'une faible interaction avec le HLA-C est observée (Borges et al. 1997; Colonna et al. 1997; Cosman et al. 1997; Colonna et al. 1998; Fanger et al. 1998). Concernant les molécules du CMH I non classiques, ce récepteur est capable de fixer l'HLA-G et l'HLA-E. L'HLA-G étant sélectivement exprimée sur le trophoblaste, son interaction avec LIR1 pourrait inhiber les leucocytes décidaux, contribuant ainsi à la tolérance materno-fœtale (Colonna et al. 1997; Colonna et al. 1998; Allan et al. 1999; Colonna et al. 1999). L'interaction avec l'HLA-E permet, comme pour certains complexes CD94/NKG2, de tester l'expression générale des molécules de CMH I pour une cellule. Outre les molécules du CMHI, ce récepteur reconnaît la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalovirus humain (Cosman et al. 1997). L'expression de la protéine UL18 à la surface des cellules infectées n'est pas clairement définie pour le moment. De ce fait, cette molécule a été principalement étudiée dans des cellules transfectées avec la protéine UL18. Ainsi, UL18 inhibe les cellules NK LIR1⁺, alors que les cellules LIR1⁻ sont activées (Prod'homme et al. 2007).

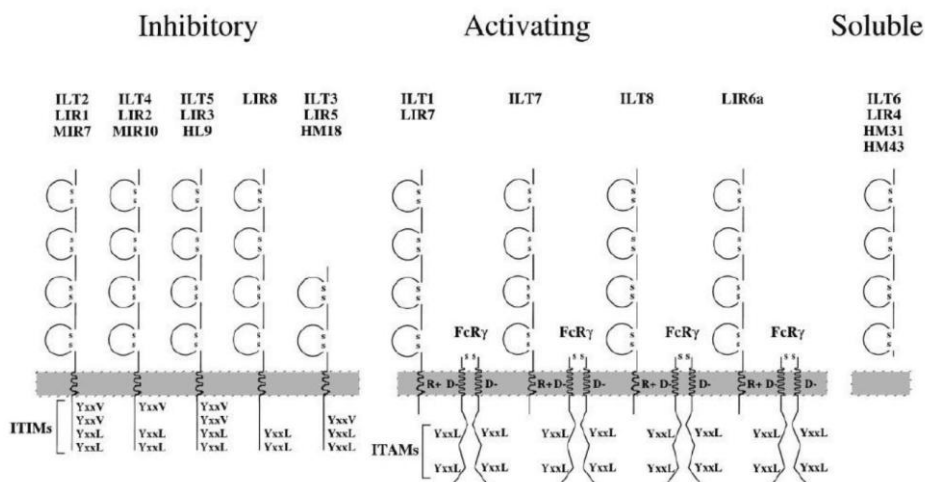


Figure 18 : La famille des récepteurs MIR/LIR/ILT. En fonction de leurs domaines cytoplasmiques et transmembranaires, ces récepteurs sont classés en trois groupes : les récepteurs inhibiteurs contenant dans les domaines cytoplasmiques des motifs ITIM, les récepteurs activateurs associés au FcR γ comportant des motifs ITAM et le récepteur soluble ne contenant aucun domaine cytoplasmique et transmembranaire. D’après Colonna M et al, 1999.

3.3.2.3. Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptor)

Les NCR sont des récepteurs Ig-like activateurs impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales (Pessino et al. 1998; Cantoni et al. 1999; Pende et al. 1999). Quatre NCR ont été décrits : NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) et NKp46 (CD335) (Figure 19) et NKp80. Ce sont des protéines qui ont une faible homologie entre elles mais qui présentent des conséquences similaires sur l’activité des cellules NK. Les ligands exprimés par les cellules tumorales ne sont pas clairement identifiés. Néanmoins, les structures héparine/héparane sulfate ont été suggérées comme étant des ligands, mais les conséquences fonctionnelles de ces interactions sont controversées (Bloushtain et al. 2004; Warren et al. 2005; Hershkovitz et al. 2007; Hecht et al. 2009). Le NKp30 a récemment été montré comme fixant une molécule nouvellement caractérisée, la molécule B7-H6 membre de la famille B7, présente à la surface de diverses lignées de cellules tumorales mais pas à la surface des cellules normales (Brandt et al. 2009).

Le gène codant le NKp30 est situé sur le chromosome humain 6 dans la région HLA III. Le récepteur NKp30 est caractérisé par un domaine extracellulaire de type V et un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé (Arginine) (Moretta et al. 2000). Ce résidu (Arginine) permet l’association du NKp30 avec les polypeptides CD3 ζ et Fc ϵ R γ (Moretta et al. 2004) relayant ainsi un signal activateur permettant à la cellule NK d’exercer ses fonctions. Son expression est coordonnée à celle de NKp46 puisque les cellules NKp46^{high} sont aussi

NKp30^{high}. Ce récepteur est exprimé par toutes les cellules NK (Pende D 1999). Le NKp30 ne reconnaît pas les hémagglutinines virales (Arnon et al. 2001), mais reconnaît les protéines pp65 exprimée à la surface du cytomégalo virus humain. Cette interaction inhibe la cytotoxicité induite normalement par l'interaction du NKp30 avec son ligand, et ce par dissociation du NKp30 et du CD3 ζ (Arnon et al. 2005). Le NKp30 est également impliqué dans le cross-talk DC/cellules NK qui sera discuté ultérieurement.

Le gène codant le NKp44 est situé sur le chromosome humain 6. Le récepteur NKp44 est caractérisé par un domaine extracellulaire de type V et un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé (lysine) (Cantoni et al. 1999; Moretta et al. 2000). Cette Lysine permet l'association du NKp44 avec les protéines adaptatrices KARAP/DAP12 contenant un motif ITAM (Moretta et al. 2004), relayant ainsi un signal activateur. Chez l'homme ce récepteur est exprimé sur les cellules NK stimulées par l'IL-2, les cellules NK22 et sur certains clones de cellules T $\gamma\delta$ (Vitale et al. 1998; Cella et al. 2009). Aucun orthologue murin n'a été identifié pour le NKp44. Outre son implication dans la lyse des cellules tumorales, le NKp44 reconnaît les hémagglutinines virales (Arnon et al. 2001; Ho et al. 2008), les glycoprotéines de l'enveloppe des virus de la Dengue et du West Nile (Hershkovitz et al. 2009), les bactéries appartenant au genre *Mycobacterium* et les bactéries *Norcadia farcinica* et *Pseudomonas aeruginosa* (Esin et al. 2008).

Le gène codant le NKp46 est situé sur le chromosome humain 19 au niveau du cluster leucocytaire. Le récepteur NKp46 possède deux domaines extracellulaires Ig-like, un domaine transmembranaire contenant un acide aminé (Arginine) et un domaine cytoplasmique dépourvu de motifs impliqués dans le relais d'un signal activateur (Pessino et al. 1998; Moretta et al. 2000). Ainsi, l'arginine permet l'association du NKp46 avec les polypeptides de signalisation CD3 ζ et Fc ϵ R γ contenant des motifs ITAM (Moretta et al. 2004), relayant ainsi un signal activateur. Un homologue murin, dont le gène se situe sur le chromosome 7, a été identifié (Biassoni et al. 1999). Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, l'expression du NKp46 a été décrite comme restreinte et constitutive aux cellules NK. De ce fait, ce récepteur a été suggéré comme un marqueur spécifique des cellules NK quelle que soit l'espèce (Walzer et al. 2007a). Cependant deux exceptions ont été signalées : le NKp46 peut être exprimé à la surface de certains lymphocytes T tels que les lymphocytes T CD8⁺ CD56⁻ activés par l'IL-15 (Correia et al. 2009) ou sur des cellules lymphoïdes innées de la muqueuse qui expriment le facteur de transcription retinoid-related orphan receptor (ROR)- γ t, et produisent de l'IL-22 (Narni-Mancinelli et al. 2011a). De plus, les cellules NKp46⁺ présentes au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses produisent de l'IL22, sont peu cytotoxiques et expriment

faiblement le NK1.1, caractéristiques différentes des cellules NK conventionnelles (Cella et al. 2009; Luci et al. 2009; Sanos et al. 2009; Satoh-Takayama et al. 2009). Outre son implication dans la lyse des cellules tumorales, le NKp46 reconnaît les hémagglutinines virales (hémagglutinines du virus influenza et hémagglutinines du virus neuraminidase du virus de Sendai) (Mandelboim et al. 2001).

Le NKp80 est le dernier membre identifié de la famille des NCR (Vitale 2001). Cette protéine forme un homodimère composé de deux protéines à la surface de la cellule. Elle est exprimée de manière corrélée avec les autres NCR de sorte que les NCR^{high} expriment fortement NKp80 et les NCR^{dull} ne le présentent pas. En 2006, activation-induced C-type lectin (AICL) a été identifié comme ligand de NKp80 (Welte et al. 2006). Cette protéine est fortement exprimée par les monocytes, macrophages et granulocytes via différents Toll (TLR-2, -3, -4, -6, -9) et semble promouvoir la sécrétion du TNF- α lorsqu'il est stimulé. L'expression d'AICL par les monocytes pourrait être reconnue par les cellules NK et permettrait un contrôle de ces populations au cours des phases inflammatoires. Ces différentes données impliquent les cellules NK dans les mécanismes régulateurs des populations immunitaires au cours de la réponse inflammatoire.

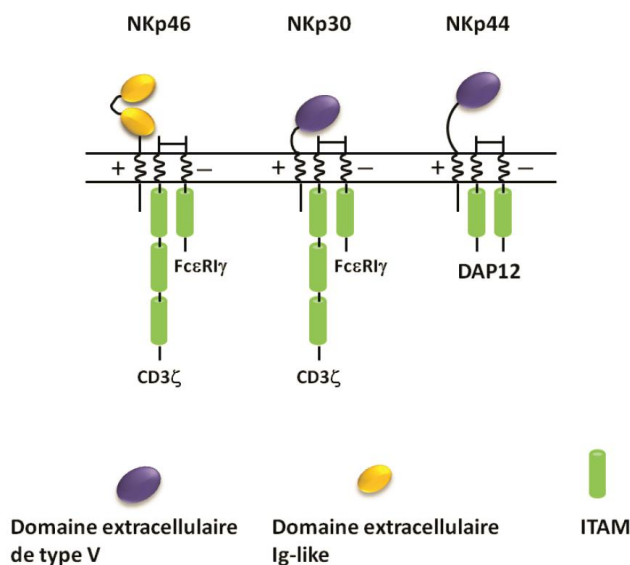


Figure 19 : Structure des NCR. Les polypeptides de signalisation qui sont associés aux différents NCR sont également cités. D'après Moretta A et al, 2004.

3.3.2.4. Les récepteurs de Fc des immunoglobulines

Les récepteurs Fc sont exprimés par de nombreux types cellulaires incluant les macrophages, les monocytes, les granulocytes, les neutrophiles et plus particulièrement les cellules NK (Trinchieri and Valiante, 1993). Ces protéines ont une fonction de reconnaissance des fragments constants (Fc) des anticorps présents à la surface des pathogènes (bactérie, cellules infectées par un virus ou celles tumorales). Ces protéines de la superfamille des Ig sont subdivisées en trois groupes : les récepteurs Fc γ , Fc α , Fc ϵ , dont le profil d'expression est différent d'un type cellulaire à l'autre. Chaque sous-groupe de récepteur Fc reconnaît un type d'anticorps différent (IgG, IgA et IgE respectivement). La reconnaissance du fragment Fc induit l'ADCC des cellules NK.

Les cellules NK sont caractérisées en partie par le niveau d'expression d'un récepteur de fragment Fc (CD16, FcR γ III), comme décrit précédemment. Le récepteur FcR γ III est un récepteur de faible affinité pour les IgG. Par conséquent, il est nécessaire pour la cellule NK d'interagir avec un grand nombre d'anticorps pour pouvoir initier cette voie d'activation. Le CD16 s'associe au CD3 ζ ou la sous-unité Fc ϵ R1 γ au niveau intracellulaire pour aboutir à l'activation de Syk et ZAP70. L'activation de la cellule NK par la voie ADCC stimule la sécrétion d'IFN- γ et l'induction de la cytotoxicité cellulaire par la libération de granules contenant les granzymes B/perforine. Certains individus peuvent exprimer le récepteur Fc γ RII ou CD32 à la surface de leurs cellules NK (Morel et al. 1999) renforçant les fonctions d'ADCC.

3.3.2.5. Les récepteurs Toll

Les récepteurs TLR appartiennent à la famille des récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires conservés ou PRR (Pattern-Recognition Receptors). Les TLR reconnaissent des molécules ou protéines (appelés PAMPs, Pathogen-Associated Molecular Patterns) dont l'expression est conservée dans de nombreux micro-organismes, notamment les bactéries ou les parasites. Ces récepteurs sont exprimés par de nombreuses cellules immunitaires et contribuent à l'efficacité de la réponse innée. Chez les cellules NK, la présence d'ARNm des TLR1-10 a été reportée (Lauzon et al. 2006) mais le nombre de TLR fonctionnels est plus limité. Les cellules NK stimulées par les ligands du TLR2 (peptidoglycanes, KpOmpA), TLR3 (Poly I : C), TLR4 (LPS), TLR5 (flagellin), TLR9 (CPG, ODN A et ODN B) et TLR7/TLR8 (R-848 et ARN HIV) répondent par une production notable et variable d'IFN- γ et de TNF- α . (Becker et al. 2003; Chalifour et al. 2004; Schmidt et al. 2004; Sivori et al. 2004; Schlaepfer et

al. 2008). De plus, leur activité cytotoxique est accrue et leur activation permet par la suite une meilleure stimulation de l'immunité adaptative.

3.3.2.6. Les récepteurs de la famille SLAM

Les cellules NK expriment trois membres de la famille SLAM : 2B4 (CD244), NTB-A et CRACC (CD319) chez l'homme et 2B4 et CRACC chez la souris. Seul 2B4 a un ligand spécifique de la sous-famille CD2 (CD48, exprimé par les cellules hématopoïétiques) et les autres protéines de cette famille transmettent leur signal par des interactions homotypiques (Veillette 2006).

Chez l'homme, 2B4 agit en tant que co-receptor. En effet, des expériences de lyses redirigées ont montré que la présence seule de 2B4 ne permettait pas l'activation du lymphocyte NK alors que sa stimulation conjointe avec la voie NKp46 permettait un signal activateur plus intense (Sivori et al. 2000).

3.3.2.7. Le récepteur DNAM-1

Le récepteur DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1, CD226) est un membre de la super famille des Ig exprimé par l'ensemble des cellules NK mais aussi les lymphocytes T, B et les monocytes. Les ligands de ce récepteur sont le CD112 (récepteur du virus de la polio, PVR) et le CD155 (nectine-2) (Tahara-Hanaoka et al. 2004). DNAM-1 s'associe à LFA-1 à la surface des cellules NK ce qui permet de favoriser la phosphorylation des résidus tyrosines présents dans la partie intracellulaire de la protéine lorsqu'elle reconnaît son ligand. La phosphorylation de DNAM-1 est dépendante de Fyn et a pour conséquence une augmentation de la sécrétion d'IFN- γ et de la cytotoxicité des cellules NK.

De plus, les propriétés migratoires des monocytes font intervenir DNAM-1 et CD155 et il est envisageable que ces protéines exercent le même rôle chez les cellules NK. L'expression de CD112 et CD155 est augmentée dans de nombreux types de cancer notamment dans les mélanomes (Chan et al. 2009) ou les carcinomes ovariens (Carlsten et al. 2009) ce qui implique directement DNAM-1 dans les fonctions anti-tumorales des cellules NK.

3.3.2.8. Le récepteur CD2

Le récepteur CD2 est une glycoprotéine transmembranaire de 50 kDa qui s'associe au CD3 ζ pour assurer sa signalisation (Moingeon et al. 1992). Il a pour ligand la protéine d'adhésion LFA-3 (CD58) et joue un rôle primordial dans la formation d'une synapse immunologique (SI).

3.3.3. Situations pathologiques reconnues par les cellules NK

Le groupe de K. Karre a montré dans les années 90 une propriété emblématique concernant les cellules NK. Il s'agit de la reconnaissance de *missing-self* ou *soi-manquant*. En effet, les cellules NK sont capables de reconnaître des cellules qui ont diminué l'expression à leur surface des molécules de CMH I, processus fréquent lors d'une transformation tumorale ou lors d'une infection (Karre et al. 1986; Karre 2008). Cette reconnaissance est due à une levée d'inhibition de la cellule NK dont les récepteurs inhibiteurs des molécules de CMH I ne reconnaissent plus, ou reconnaissent moins de ligands.

Récemment, il a été montré également que les cellules NK sont capables de reconnaître deux autres situations pathologiques : *le stress-induced self* ou *soi induit par le stress* et *l'infectious non-self* ou *non-soi d'origine infectieuse* (Luci et al. 2008) (figure 20). L'archétype du récepteur impliqué dans le *stress-induced self* est la molécule NKG2D dont les ligands sont induits par un stress cellulaire provoqué par une infection virale ou un processus de tumorigénèse (Diefenbach et al. 2000). *L'infectious non-self* est illustré de façon classique par l'interaction entre Ly49H et la protéine virale m157 (Arase et al. 2002). Il apparaît aujourd'hui que ces trois théories sont étroitement liées, et que l'activation des cellules NK est dictée par l'ensemble des signaux activateurs et inhibiteurs qu'elles reçoivent.

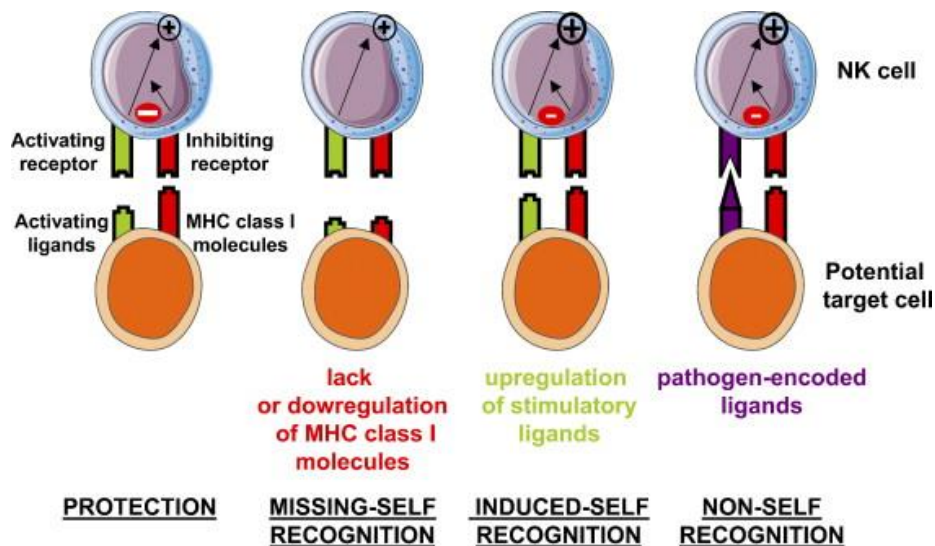


Figure 20: Balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs qui régulent les fonctions des cellules NK. L'activation des cellules NK est régulée par les signaux activateurs et inhibiteurs qu'elles perçoivent. La diminution de l'expression du CMH I, la surexpression de ligands de récepteurs activateurs, ainsi que l'expression de molécules d'origine infectieuse sont autant de signaux activateurs pour les cellules NK. D'après Luci C et Tomasselo E, 2008.

3.4. Homéostasie des cellules NK

3.4.1. Distribution des cellules NK

Les cellules NK sont des cellules de l'immunité innée très mobiles, réparties dans les tissus lymphoïdes et non-lymphoïdes de l'organisme. Ces cellules sont majoritairement produites dans la moelle osseuse. Suite à leur développement, elles rejoignent la périphérie via la circulation sanguine. Elles représentent, en effet, 3 à 10% des lymphocytes du sang, de la rate, du foie et des poumons, et sont présentes en fréquences plus faibles dans les ganglions lymphatiques et le thymus (à l'état basal) (Gregoire et al. 2007). Il est intéressant de noter un recrutement massif des cellules NK au niveau de l'utérus lors d'une grossesse (Moffett-King 2002). Les cellules NK sont aussi présentes mais en faible densité au niveau des interfaces muqueuses comme la *lamina propria* intestinale ou le derme (Cella et al. 2009; Luci et al. 2009). Au niveau des poumons, elles sont localisées près des petites et des moyennes bronches (Barnig et al. 2013).

3.4.2. Circulation des cellules NK

Les cellules NK doivent sortir de la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine. Cette sortie s'opère par la migration vers un compartiment intermédiaire constitué par les sinusoides veineux de la moelle. En 2007, il a été montré que l'export des cellules NK de la moelle osseuse dépend du récepteur S1P₅, qui fait partie d'une famille de cinq récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs du sphingosine-1 phosphate (S1P) (Walzer et al. 2007b). Le S1P est un lipide présent à la fois au niveau intracellulaire et extracellulaire. Dans sa forme extracellulaire, il est véhiculé par l'albumine et les lipoprotéines dans le sang et la lymphe. L'action de différentes enzymes qui métabolisent ou catabolisent le S1P maintient un gradient de S1P avec une concentration forte dans le sang et une faible concentration dans les tissus, en particulier lymphoïdes (Schwab et al. 2007). L'expression de S1P₅ augmente de façon graduelle chez les cellules NK lors de leur maturation pour atteindre un maximum dans les cellules NK CD56^{dim} chez l'homme (Walzer et al. 2007b). Dans les souris déficientes pour S1P₅, les cellules NK matures s'accumulent dans la moelle osseuse et les ganglions et diminuent dans le sang, la rate, le foie et les poumons. En 2001, une étude avait montré que S1P₅ est nécessaire pour la sortie des cellules NK à la fois de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques (Mayol et al. 2011).

D'une façon coordonnée à l'augmentation de S1P₅, les cellules NK humaines diminuent leur expression en CXCR4 en surface au cours de leur maturation. CXCR4 est le récepteur de la chimiokine CXCL12, produite en quantité très importante dans le stroma de la moelle

osseuse, permettant notamment une rétention des cellules souches hématopoïétiques. Lorsqu'un inhibiteur de CXCR4 est injecté à des souris, les cellules NK sont recrutées de façon importante vers la périphérie, ce qui montre que CXCR4 et S1P₅ régulent de façon opposée la sortie des cellules NK.

Les cellules NK sont capables de circuler rapidement pour rejoindre les tissus enflammés en réponse à une infection virale ou bactérienne (Walzer et al. 2011), ou en cas d'allergie ou d'auto-immunité (Schleinitz et al. 2010; von Bubnoff et al. 2010). L'utilisation des souris déficientes pour ces chimiokines ou pour leurs récepteurs, a permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant le recrutement des cellules NK dans différentes situations inflammatoires, et ce dans différents organes (Figure 21).

Selon le contexte inflammatoire, différents récepteurs de chimiokines sont utilisés par les cellules NK pour leur recrutement, en fonction de l'ensemble des chimiokines produites sur ce site. Ainsi, CCR2 (Mignot et al. 2008), CXCR3 (Wendel et al. 2008) ou CCR5 (Liu et al. 2008) permettent la migration des cellules NK vers le site tumoral, en fonction du modèle de tumeur étudié. Lors d'une infection virale, les interférons de type I et II produits favorisent l'expression de CXCL9 et CXCL10 sur le lieu de l'intrusion du virus. Ces deux chimiokines sont des ligands de CXCR3, expliquant le rôle majeur de ce récepteur dans la migration des cellules NK lors d'infections virales (Groom et al. 2011). Cependant, lors d'infections bactériennes, les cellules dendritiques stimulées via leurs Toll-Like Receptors (TLRs) produisent des ligands de CCR5 qui permettent le recrutement des cellules NK via CCR5 (Sallusto et al. 1999).

De plus, les cellules NK expriment des récepteurs leur permettant d'infiltrer le tissu cutané. Il a été décrit que le récepteur ChemR23 exprimé par les cellules dendritiques et les monocytes/macrophages est également exprimé par certaines cellules NK CD56^{dim} et impliqué dans leur migration vers le tissu cutané (Parolini et al. 2007). Certaines cellules NK expriment aussi l'antigène CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), récepteur de la sélectine E. Cette molécule, initialement décrite sur les lymphocytes T, pourrait être impliquée dans le recrutement des cellules NK dans la peau (Yoshino et al. 2002). Les cellules NK peuvent aussi être recrutées dans les poumons sous certaines conditions par le biais de différentes chimiokines comme CCL2 et CCL3 (Morrison et al. 2003; Zeng et al. 2003).

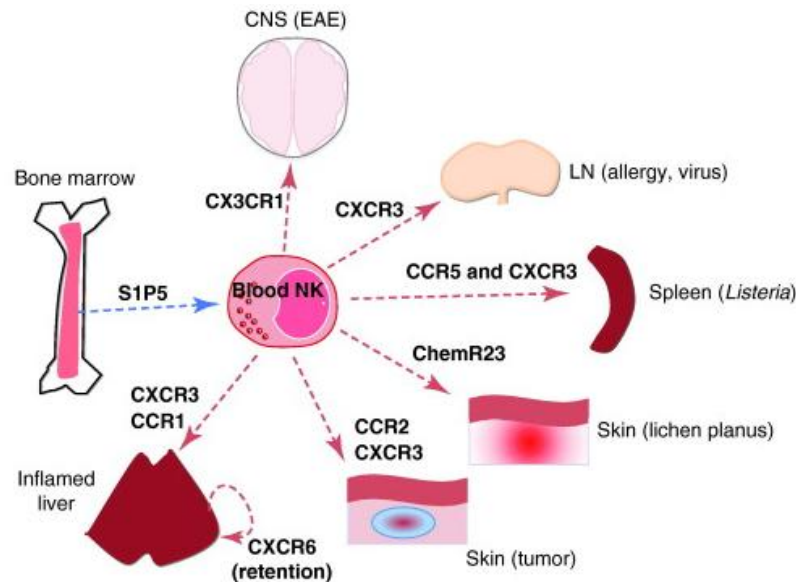


Figure 21 : Rôle des récepteurs de chimiokines dans le recrutement des cellules NK dans les organes inflammés. La flèche bleue représente l'export des cellules NK de la moelle osseuse, cependant les flèches rouges représentent leur recrutement dans les tissus enflammés. EAE : *Experimental autoimmune encephalomyelitis*. D'après Walzer T et Vivier E, 2011.

3.4.3. Durée de vie et facteurs de survie des cellules NK

Il a été montré que la demi-vie des cellules NK est de 17 jours en périphérie (Jamieson et al. 2004). Cependant le temps nécessaire au repeuplement de la périphérie dans des souris transgéniques (NDE) chez lesquelles les cellules NK sont sélectivement éliminées par injection de toxine diphtérique est d'un mois, ce qui corrèle avec les données précédentes (Chiossone et al. 2009).

L'IL-15 est nécessaire à la survie des cellules NK, ainsi que l'ont montré les études de souris déficientes pour l'IL-15 (Kennedy et al. 2000) ou par la chaîne alpha de son récepteur IL15R α (Lodolce et al. 1998). La surexpression d'IL-15 endogène (Fehniger et al. 2001) ou l'injection de complexes IL-15/IL15R α (Rubinstein et al. 2006) entraîne une forte expansion des cellules NK et des lymphocytes T CD8 $^{+}$. L'IL-15 est produite sous la forme d'un complexe avec IL15R α par les cellules présentatrices d'antigène comme les DC et par certaines cellules stromales (Dubois et al. 2002; Burkett et al. 2004). Ce complexe est présenté en trans aux cellules NK et autres lymphocytes exprimant en surface le complexe IL15R $\beta\gamma$. L'IL-15 présente une dualité fonctionnelle : à l'état basal, elle est essentielle au maintien des cellules NK et lors d'une infection virale, son expression augmentée sur les cellules dendritiques conduit à une forte activation de l'activité cytotoxique des cellules NK (Lucas et al. 2007) et à leur prolifération (Ferlazzo et al. 2004a). Cette dernière action affecte principalement la sous-population CD27 $^{+}$ CD11b $^{+}$ (Walzer et al. 2007b) en l'absence d'autres signaux de maturation.

Plusieurs articles ont rapporté que les cellules dendritiques sont également indispensables à la survie des cellules NK matures en périphérie via leur production d'IL-15 (Hochweller et al. 2008; Guimond et al. 2010). Lorsque le nombre de cellules dendritiques est artificiellement augmenté dans la souris suite à une injection de Flt3-ligand, la population de cellules NK augmente d'une façon dépendante de l'IL-15 (Guimond et al. 2010). D'autres populations myéloïdes comme les monocytes pourraient également jouer un rôle dans la survie/différenciation des cellules NK via la trans-présentation d'IL-15. La déplétion des monocytes chez la souris entraîne un rapide déclin de la population NK la plus mature CD11b⁺CD27⁻ (Soderquest et al. 2011a). D'un point de vue mécanistique, l'IL-15 agit en empêchant l'apoptose des cellules NK : d'une part, elle limite l'expression du membre pro-apoptotique de la famille Bcl2 *Bim*, d'autre part, elle augmente l'expression du membre anti-apoptotique de cette famille *Mcl1* (Huntington et al. 2007).

3.5. Fonctions effectrices des cellules NK

3.5.1. Mécanismes de cytotoxicité

Les cellules NK comme les lymphocytes T cytotoxiques, lysent leurs cibles principalement via la sécrétion de granules lytiques contenant de la perforine et des granzymes (Kagi et al. 1994).

3.5.1.1. Formation de la synapse immunologique

La destruction d'une cellule cible par une cellule NK nécessite l'établissement d'une synapse immunologique activatrice (ou aNKIS pour activating NK cell immunological synapse) entre les deux cellules, comparable en de nombreux points à celle établie par les lymphocytes T cytotoxiques (Orange 2008; Topham et al. 2009). Ce phénomène permet la reconnaissance de la cible, la polarisation de la cellule NK puis la sécrétion des granules lytiques conduisant à l'élimination de la cellule cible. Il a été montré que le déroulement de la synapse immunologique NK est formé de trois phases : une phase d'initiation, une phase effectrice puis une phase terminale (Orange 2008). Lors de la phase d'initiation, la cellule NK rencontre sa cible. Plusieurs facteurs d'adhésion comme le LFA-1 et le CD11b vont former un anneau dénommé pSMAC (peripheral supramolecular activation cluster), et délivrer les premiers signaux activateurs à la cellule NK. L'anneau ainsi formé délimite le cSMAC (central SMAC), contenant d'autres récepteurs activateurs, et permettant d'amplifier l'activation de la cellule NK. Durant la phase effectrice, la réorganisation du cytosquelette de la cellule NK

provoque l'accumulation d'actine-F dans le pSMAC, et permet l'agrégation de radeaux lipidiques, zone de la membrane plasmique capable d'inclure ou d'exclure spécifiquement des molécules au niveau de l'aNKIS (Taner et al. 2004). Ces radeaux lipidiques permettent la concentration des récepteurs activateurs et l'exclusion des inhibiteurs de la synapse formée. Pendant la phase effectrice, les granules lytiques se rassemblent au niveau de la synapse néoformée. Cette polarisation nécessite la migration des granules le long des microtubules vers le MTOC (microtubule-organizing center), structure d'ancrage de l'ensemble des microtubules cellulaires, qui va être polarisé vers l'aNKIS. Les granules lytiques, ainsi concentrés au niveau du cSMAC, vont alors fusionner avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu. Finalement, la phase terminale constitue la fin de l'interaction entre les deux cellules. La cellule NK diminue progressivement l'expression de ses récepteurs et autres molécules d'adhésion pour se dissocier de sa cible et retrouver une autre.

3.5.1.2. Granules lytiques et modes d'action

Les granules lytiques constituent les acteurs majeurs de la cytotoxicité des cellules NK. Contrairement aux lymphocytes T, dans lesquels ils ne sont produits qu'après rencontre avec un antigène et une activation de la cellule, ces granules sont constitutivement présents dans la cellule NK (Colucci et al. 2003). L'interaction entre les cellules NK et leurs cellules cibles est accompagnée d'une polarisation du cytosquelette d'actine, de l'appareil de Golgi et des microtubules des cellules NK au niveau de la zone de contact avec les cellules cibles. Celle-ci est suivie de la libération de granules cytotoxiques qui contiennent différents types de molécules : la perforine, les granzymes et la granulysine (chez l'homme), dont la finalité est d'induire l'apoptose des cellules à éliminer.

- i. La perforine* : elle a été initialement purifiée dans les lymphocytes T cytotoxiques en 1985 (Podack et al. 1985). Sa structure cristallographique a récemment été décrite (Law et al. 2010). Elle forme des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible, permettant le passage des granzymes et de la granulysine (Bolitho et al. 2007). L'importance de la perforine dans la fonction cytotoxique des lymphocytes T et des cellules NK est soulignée par les tableaux cliniques gravissimes présentés par les patients atteints d'un déficit génétique en perforine (souffrant de lymphohistiocytose familiale de type 2) (Voskoboinik et al. 2010).
- ii. Les granzymes* : les cellules NK humaines et murines expriment les granzymes A, B, K et M. Chez l'homme, elles expriment également la granzyme H (Pardo et al. 2009). Les

granzymes constituent une famille de sérines protéases induisant la mort des cellules cibles, de façon dépendante ou indépendante des caspases (Cullen et al. 2008). Les granzymes A et B sont les plus abondantes et les plus étudiées dans les cellules NK chez l'homme et chez la souris. L'utilisation d'inhibiteurs de ces deux granzymes a montré que la granzyme B est l'effecteur majeur de la lyse des cellules cibles par les cellules NK (Mahrus et al. 2005). La granzyme A induit la mort cellulaire de façon indépendante de caspases, selon un processus relativement lent, alors que la granzyme B utilise les caspases pour éliminer les cibles. Elle induit rapidement l'apoptose via deux mécanismes. Elle peut activer directement la caspase 3 mais aussi la caspase 7, ou peut induire la perméabilité mitochondriale et cliver *Bid*, une molécule de la famille *Bcl2*, qui via le cytochrome C et la caspase 9 aboutira également à l'activation de la caspase 3. Concernant la granzyme H, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant sa façon à induire l'apoptose (Fellows et al. 2007; Hou et al. 2008). Comme la granzyme A, la granzyme K induit la mort cellulaire indépendamment des caspases (MacDonald et al. 1999). La voie de mort cellulaire induite par la granzyme M est controversée dans la littérature. D'une part il a été montré qu'elle est capable d'induire une mort cellulaire rapide et indépendante des caspases laquelle ressemblait à une mort autophagique (Kelly et al. 2004), d'autre part, la granzyme M humaine recombinante issue de levures conduit à une mort cellulaire dépendante des caspases (Lu et al. 2006; Hua et al. 2007).

- iii. *La granulysine*: Il s'agit d'une petite protéine cationique apparentée aux saposines. Elle induit l'apoptose de la cellule cible en interagissant avec les lipides de la membrane mitochondriale de la cellule cible en induisant des dommages membranaires (Latinovic-Golic et al. 2007). Elle peut également induire l'activation de la caspase 3 (Kaspar et al. 2001). Il a été montré une synergie entre la granulysine et la perforine dans l'induction de l'apoptose (Walch et al. 2007). Alors que de fortes concentrations de granulysine sont nécessaires pour sa fonction cytotoxique (10-10 μ M) (Kaspar et al. 2001; Zhang et al. 2009), de plus faibles concentrations de granulysine (pic à 10nM) attirent les monocytes, les cellules T mémoires (CD4⁺ et CD8⁺), les cellules NK et les mDC (stimulation avec du TNF- α) (Deng et al. 2005). Outre son effet chimioattractant, elle induit une augmentation deux taux d'ARNm de cytokines (IL-1, IL-6, IL-10 et IFN- α) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5 et CCL7) dans les cellules monocytaires U937. Une production de CCL2 et CCL5 est observée après stimulation de monocytes et de cellules U739 avec la granulysine (1nM à 10 μ M) (Deng et al. 2005).

En plus de la sécrétion de granules lytiques (phénomène majeur de la lyse induite par les cellules NK), les cellules NK peuvent également induire la mort des cellules cibles via l'activation de récepteurs de mort à la surface de celles-ci. Elles utilisent notamment les voies Fas/Fas-L (Arase et al. 1995) et TRAIL-R/TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) (Kayagaki et al. 1999). L'expression Fas-L et de TRAIL est constitutive sur les cellules NK, et peut être augmentée après activation par l'IFN- γ ou de l'IL-15 (Zamai et al. 1998; Smyth et al. 2001; Takeda et al. 2001).

3.5.2. Production de cytokines

La deuxième fonction effectrice importante des cellules NK est la synthèse de cytokines. C'est particulièrement le cas de la sous-population CD56^{bright} qui, en réponse à différents stimuli, peut produire des quantités importantes d'IFN- γ , d'IL-10, de TNF- α , de TNF- β ou de GM-CSF (Cooper et al. 2001). Toutefois, au sein de toutes ces cytokines, c'est sûrement la production d'IFN- γ qui caractérise mieux la cellule NK. En effet, la cellule NK est capable de produire (en réponse à différentes inductions) de l'IFN- γ de façon plus importante et plus précoce que toute autre population lymphocytaire (Stetson et al. 2003; Martin-Fontecha et al. 2004).

L'IFN- γ est une cytokine aux effets pléiotropes, puisque la majorité des types cellulaires exprime son récepteur. L'IFN- γ induit ainsi l'augmentation de l'expression de molécules du complexe Majeur d'histocompatibilité CMH I et CMH II, ainsi que la polarisation des réponses T CD4⁺ vers un profil Th1 (Shtrichman et al. 2001). L'importance de cette production d'IFN- γ par les cellules NK a été largement démontrée dans les réponses contre les virus (Orange et al. 1995) et les tumeurs (Street et al. 2001; Mocikat et al. 2003).

Récemment, plusieurs groupes ont identifié des cellules apparentées aux cellules NK et aux LTi (lymphoid tissue inducer cells) dans les muqueuses associées aux tissus Lymphoïdes (Sato-Takayama et al. 2008; Cella et al. 2009; Luci et al. 2009). Ces cellules ne produisent que de faibles quantités d'IFN- γ , mais sont capables de sécréter de l'IL-22, une cytokine de la famille de l'IL-10. L'IL-22 produite induit la production d'IL-10 par les cellules épithéliales environnantes, leur prolifération ainsi que la production d'agents anti-apoptotiques. Ces cellules productrices d'IL-22 pourraient donc participer au contrôle de l'inflammation et à la protection des muqueuses lors de l'intrusion des pathogènes.

3.6. Rôles des cellules NK dans l'immunité

Les cellules NK sont capables d'éliminer des cellules qu'elles reconnaissent comme dangereuses (stressées, tumorales ou infectées). Dans la partie suivante, nous allons décrire l'implication des cellules NK dans différents contextes pathologiques ou dans la régulation de la réponse immune.

3.6.1. Cellules NK et défense anti-tumorale

Des études *in vitro* utilisant des cellules humaines ou d'autres mammifères, ainsi que des études *in vivo* dans des modèles de rats ou de souris, suggèrent depuis longtemps que les cellules ayant subi une modification tumorale puissent être la cible des cellules NK (Trinchieri 1989). Elles participent ainsi, avec d'autres cellules du système immunitaire (comme les lymphocytes T et B), au phénomène d'immunosurveillance des tumeurs, initialement proposé par Burnet (Burnet 1967).

Il a ainsi été montré *in vivo* dans des modèles murins que les cellules NK sont impliquées dans le rejet de différents types de tumeurs transplantées à la souris, de façon dépendante de ligands des récepteurs NK exprimés ou non par les cellules tumorales. Ainsi, l'absence d'expression de molécules de CMH de classe I (Karre et al. 1986), ou la sur-expression de ligands de NKG2D (Diefenbach et al. 2001) rend les cellules tumorales sensibles à la lyse par les cellules NK. De plus, l'étude de souris déficientes en NKG2D montre un rôle important de ce récepteur dans l'immunosurveillance anti-tumorale (Guerra et al. 2008). De façon intéressante, dans certains modèles expérimentaux, il a été montré que la lyse des cellules tumorales par les cellules NK favorisait le développement de lymphocytes T spécifiques de ces cellules cancéreuses (Kelly et al. 2002).

L'interprétation des études dans des modèles animaux doit toutefois être prudente car aucun des modèles existants n'affecte sélectivement les cellules NK (Vivier et al. 2008) : les modèles utilisés sont déficients pour les molécules clés des fonctions effectrices des cellules NK, mais ces modèles sont partagés par d'autres types cellulaires, comme les lymphocytes T. De ce fait, il n'existe donc pas de preuve directe et irréfutable, à ce jour, de l'implication des cellules NK dans l'immunosurveillance des tumeurs.

Chez l'homme, comme nous l'avons mentionné, très peu de déficits sélectifs en cellules NK ont été décrits, la caractérisation de l'implication directe des cellules NK dans l'immunosurveillance des tumeurs n'est donc pas possible (Orange 2006). Toutefois, une étude

longitudinale de 11 ans sur plus de 3500 patients montre une relation inverse entre l'activité cytotoxique des cellules NK et le risque de développer un cancer (Imai et al. 2000).

3.6.2. Cellules NK et défense anti-virale

L'importance du rôle des cellules NK dans la lutte antivirale est largement prouvée. En effet, des déficiences en cellules NK, qu'elles soient le résultat de mutations génétiques chez l'homme ou de déplétions expérimentales dans des modèles murins, résultent en une augmentation majeure de la susceptibilité à de nombreux virus, tels que *Ectromelia*, *Ebola*, *Influenza*, ou des virus de types herpes (Lee et al. 2007), comme *CMV*, *Varicella* ou *HSV*. Les cellules NK semblent également jouer un rôle dans le contrôle de l'infection par le virus de l'hépatite C (*VHC*) (Cheent et al. 2011), par le virus de l'immunodéficience humaine (*VIH*) (Biron et al. 1999), ou encore le virus de la dengue ou de la fièvre jaune (Andoniou et al. 2006). Chez l'homme, très peu de cas de déficience sélective en cellules NK ont été décrits (Orange 2002, 2006), mais ces cas suggèrent bien un rôle des cellules NK dans la défense anti-virale, notamment contre les virus de types herpes.

La lutte anti-virale assurée par les cellules NK est le résultat de trois de leurs fonctions effectrices que nous avons décrites précédemment : la sécrétion de cytokines (notamment d' $\text{IFN-}\gamma$), le relargage de granules cytotoxiques dirigés contre des cellules infectées, ou enfin l'induction de l'apoptose des cellules infectées via leurs récepteurs de mort (Lee et al. 2007).

Le modèle de réponse NK contre une infection virale le mieux étudié aujourd'hui est le modèle murin d'infection par le cytomégalovirus (*MCMV*). En 2002, il a été décrit que la reconnaissance directe et spécifique de la protéine virale m157 (codée par *MCMV*) par le récepteur activateur Ly49H est présent chez certaines souches de souris (Arase et al. 2002). Chez ces souris, les cellules NK prolifèrent suite à l'infection par *MCMV*, et contrôlent l'infection par la production d' $\text{IFN-}\gamma$ et/ou la lyse des cellules infectées. La plupart des souches murines déficientes pour le récepteur Ly49H sont d'ailleurs sensibles à l'infection par le *MCMV*.

Il est intéressant de noter que certaines observations laissent supposer que les virus de la famille des *herpesviridae* se sont adaptés à une pression de sélection exercée par les cellules NK. Ainsi, certaines molécules produites par les virus peuvent empêcher l'expression de ligands de NKG2D à la surface de la cellule infectée. D'autres molécules virales leurrent les récepteurs inhibiteurs des cellules NK pour empêcher leur reconnaissance du soi manquant (Jonjic et al. 2008). Ces différentes tentatives pour échapper à la reconnaissance par les cellules

NK renforcent donc l'idée que celles-ci exercent une fonction importante dans la défense contre les infections virales.

3.6.3. Coopération entre les cellules NK et les cellules de l'immunité

Les cellules NK ont été initialement décrites comme étant des lymphocytes produisant une première ligne de défense contre les agressions virales, bactériennes et tumorales pendant l'établissement d'une réponse immunitaire adaptative efficace. Pourtant, il est maintenant admis que leur rôle au sein de l'immunité ne se résume pas à une simple question de vie ou de mort pour la cible, mais ils interagissent avec de nombreuses composantes du système immunitaire pour participer à sa régulation (figure 22).

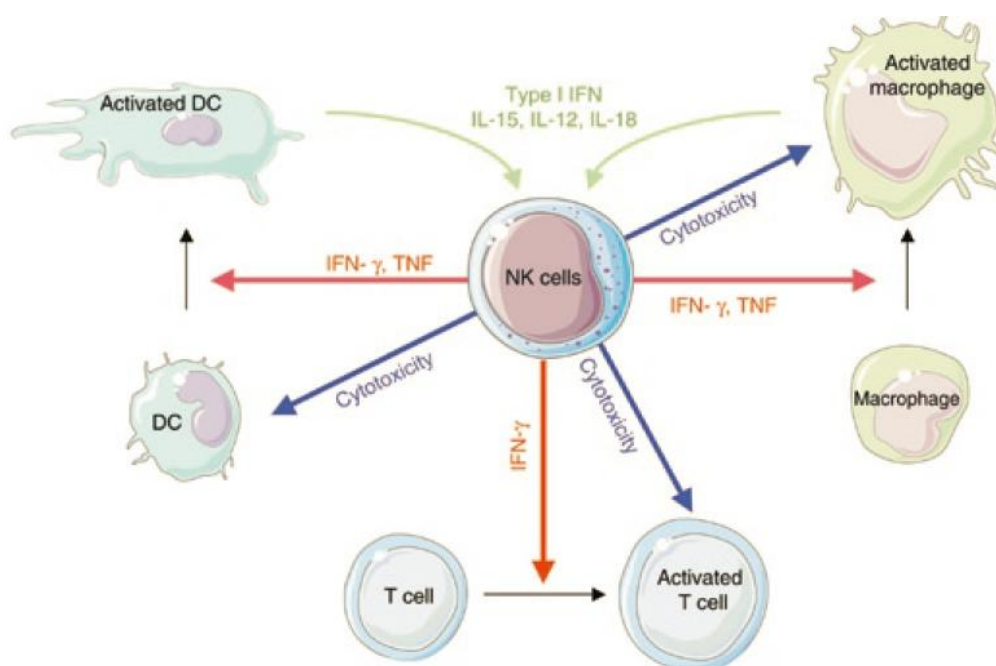


Figure 22 : Cellules NK et coopération avec les cellules de l'immunité : les cellules NK (NK cells), après avoir été stimulées par différents facteurs, peuvent favoriser (flèches rouges) la maturation et l'activation de cellules dendritiques (DC), de macrophage et de lymphocytes T (T cell), via des contacts cellulaires ou la production de cytokines. A l'inverse, les cellules NK peuvent éliminer (flèches bleues) des cellules dendritiques immatures, des lymphocytes T activés ainsi que des macrophages suractivés. D'après Vivier et al, 2008.

3.6.3.1. Interactions entre cellules NK et cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) sont les principales CPA du système immunitaire. Elles jouent un rôle de sentinelle nécessaire à l'initiation et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Elles peuvent produire des cytokines inflammatoires et sont impliquées dans la maturation des lymphocytes B et l'orientation des lymphocytes T naïfs vers des profils

matures et fonctionnels. Au cours de cette maturation, des facteurs cellulaires et environnementaux conditionnent l'issue de l'interaction entre DC-T ou DC-B.

De récentes données démontrent que les DC peuvent aussi entrer en interaction avec les cellules NK au niveau des tissus lymphoïdes secondaires et des sites inflammatoires (Buentke et al. 2002; Walzer et al. 2005; Bajenoff et al. 2006; Moretta et al. 2006). Les résidus apoptotiques de lyse des cibles de cellules NK peuvent être pris en charge par des DC matures, conduisant à des phénomènes de présentations croisées, induisant ainsi la mise en place de réponses immunes spécifiques d'antigènes par les lymphocytes T CD8⁺ ainsi que la production d'IgG (Vivier et al. 2008).

Les DC peuvent activer les cellules NK indirectement par la sécrétion des cytokines (Interférons de type I, IL-12, IL-15, IL-18) ou directement, via des contacts cellulaires et la formation d'une SI particulière. La synapse établie entre une cellule NK et une DC (DC-NK IS) diffère des synapses aNKIS et iNKIS décrites précédemment. En effet, l'adhérence initiale entre les deux cellules ne fait pas intervenir LFA-1 mais implique une interaction entre DC-SIGN, LFA-3 et CXCL1 présents sur les DC avec les protéines ICAM et CX3CL1 exprimées par la cellules NK (Borg et al. 2004; Brilot et al. 2007; Pallandre et al. 2008). L'activation des cellules NK fait intervenir les récepteurs NKp30 et NKp46. Après formation de la DC-NK IS, il y a migration des MTOC de la DC au niveau de la DC-NK IS permettant ainsi l'exocytose des interleukines régulatrices (Ferlazzo et al. 2004a) (IL-12, IL-15, IL-18, IFN type I) et la stimulation des cellules NK (Semino et al. 2005). On peut identifier la DC-NK IS comme une structure empruntant les caractéristiques des aNKIS et iNKIS.

L'interaction DC-NK permet une activation bidirectionnelle des cellules. L'IL-2 favorise la sécrétion d'IFN- γ et la prolifération des cellules NK (Orange et al. 1996b, a) tandis que l'IL-15 est déterminante pour leur survie (Brilot et al. 2007; Lucas et al. 2007). Enfin, les IFN de type I contribuent à l'amélioration de la cytotoxicité des cellules NK (Gerosa et al. 2005). L'activation des cellules NK est bénéficiaire pour les DC puisque leur production de TNF- α , d'IFN- γ et les contacts cellulaires permettent la maturation des DC (expression de CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CCR7 et une sécrétion d'IL-12 accrue) (Gerosa et al. 2002; Piccioli et al. 2002). Dans les organes lymphoïdes secondaires, la boucle d'activation DC/NK se situe dans les mêmes niches anatomiques que l'activation et la maturation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et la forte production d'IL-12 et d'IFN- γ résultante peut conduire à une réponse Th1 efficace (Adam et al. 2005). Il a été aussi montré un rôle particulier de l'IFN- α produit par les DC plasmacytoïdes (pDC) aux sites inflammatoires comme intermédiaire de l'activation des cellules NK. Celles-ci peuvent ensuite poursuivre la maturation des DC

conventionnelles qui vont initier des réponses T CD8⁺ efficaces (Mailliard et al. 2003; Tosi et al. 2004; Liu et al. 2008).

Les cellules NK activées peuvent aussi lyser les DC immatures par la formation d'aNKIS lytique selon un mécanisme dépendant de NKp30, NKp46 et DNAM-1 (Spaggiari et al. 2001; Ferlazzo et al. 2002; Pende et al. 2006). Ce mécanisme est contourné par les DC matures puisque ces dernières expriment une plus grande quantité de HLA-E qui intervient dans la répression des fonctions NK dépendantes du CD94/NKG2A (Della Chiesa et al. 2003). Cette destruction spécifique des DC immatures permet de participer à leur homéostasie et ainsi limiter leur recrutement dans les organes lymphoïdes secondaires pouvant orienter vers une réponse immunitaire tolérogène (Spaggiari et al. 2001; Ferlazzo et al. 2002; Pende et al. 2006).

3.6.3.2. Interactions entre cellules NK et macrophages

Les macrophages sont des cellules de l'immunité innée qui participent au nettoyage des débris cellulaires (apoptotique et nécrotique) par leur propriété de phagocytose. Ils sont capables de produire des cytokines immunomodulatrices (IL-1 β , TNF- α et TGF- β 1), participent à la réponse anti-bactérienne et peuvent contribuer à l'activation des lymphocytes T mémoires grâce à leur capacité à présenter des antigènes mineurs. Récemment des publications suggèrent une interaction réciproque entre les macrophages et les cellules NK *in vitro*. Cette interaction nécessite la formation d'une synapse M-NK IS particulière. Il y a accumulation du récepteur 2B4 et augmentation modérée de la F-actine à l'interface M-NK IS (Nedvetzki et al. 2007). Comme c'est le cas pour la DC-NK IS, la conséquence de M-NK IS est une stimulation de la prolifération cellulaire, la sécrétion cytokinique, l'augmentation de l'expression des récepteurs activateurs et par suite la cytotoxicité des cellules NK.

En retour les cellules NK sont capables de tuer les macrophages fortement activés par de grandes doses de LPS par la formation d'une aNKIS et par suite la lyse du macrophage par voie dépendante de NKG2D. Cela indiquerait un rôle régulateur des cellules NK dans la prévention des désordres inflammatoires dus à des macrophages sur-activées, prévenant ainsi le développement de pathologies inflammatoires sévères, comme le syndrome d'activation macrophagique. Cette observation est confrontée par une co-localisation des lymphocytes NK et des macrophages au niveau de la rate ou des organes périphériques (Gregoire et al. 2007).

3.6.3.3. Interactions entre cellules NK et lymphocytes

Outre leur influence sur les cellules myéloïdes, les cellules NK peuvent également influencer la réponse immune adaptatrice en interagissant directement sur les lymphocytes T. Premièrement, les cellules NK constituent une source d'IFN- γ , orientant la réponse vers un profil Th1. Ceci a été rapporté par Martin-Fontecha et al., qui montrent que la production d'IFN- γ par les cellules NK dans les ganglions oriente la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ activés vers un profil Th1 (Martin-Fontecha et al. 2004).

Deuxièmement, les cellules NK peuvent également lyser *in vitro* des cellules T activées, d'une façon dépendante de NKG2D (Rabinovich et al. 2003). Il a été montré *in vivo* que les cellules NK étaient capables de lyser des lymphocytes T CD4⁺ activés ayant diminué l'expression de molécules de classe I à leur surface (Lu et al. 2007). Ils démontrent aussi que la reconnaissance de ces lymphocytes T CD4⁺ anormaux est due à la levée du signal inhibiteur CD94/NKG2A de la cellule NK. Ils rapportent d'ailleurs que des anticorps bloquant dirigés contre ce récepteur conduisent à l'activation des cellules NK et de la lyse des lymphocytes T CD4⁺ activés, suggérant l'utilisation potentielle de ce type d'anticorps à des fins thérapeutiques dans des contextes d'auto-immunité ou de transplantation.

Enfin, il a été montré que les cellules NK sont capables de réguler la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo* (Soderquest et al. 2011b). Les auteurs montrent que les cellules NK limitent l'expansion clonale des lymphocytes T CD8⁺ et orientent leur différenciation vers un phénotype T effector memory Tcell (T_{EM}), via un mécanisme également dépendant de NKG2D et de perforine. Ils montrent, de plus, que l'activation de lymphocytes T CD8⁺ naïfs en l'absence de cellules NK conduit à un nombre élevé de cellules T_{CM} et ainsi à des réponses mémoires augmentées.

3.6.3.4. Interactions entre cellules NK et neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules de l'immunité innée les plus abondants dans le sang périphérique. La demi-vie de ces cellules est entre 6 et 8 heures en circulation. Pendant les premiers stades des lésions tissulaires secondaires suite à une infection, les neutrophiles sont rapidement recrutés depuis le sang vers les tissus où ils jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire et dans la clairance des microbes. Ils phagocytent les pathogènes et les tuent par le biais des réactifs oxygénés (ROS) et par une gamme d'autres substances toxiques et des enzymes qui sont préformées dans des granules dans leurs cytosols (Borregaard et al. 1997; Hampton et al. 1998).

Suite à une infection, les cellules NK ainsi que les neutrophiles sont parmi les premières cellules qui sont recrutées au site de l'inflammation ce qui suggère un cross-talk bilatéral qui pourra avoir lieu entre ces deux types cellulaires. Différents articles ont montré ces interactions bidirectionnelles entre les cellules NK et les neutrophiles.

Les neutrophiles sont capables d'inhiber les cellules NK du sang périphérique grâce à la production des réactifs oxygénés (RO) (Seaman et al. 1982). En 1984, il a été montré que l'activité cytotoxique des cellules NK est modulée par le relargage des molécules par les neutrophiles autologues (Yang et al. 1984). Il a été montré que les cellules NK CD56^{dim} sont plus sensibles à la production de H₂O₂ par les granulocytes que les cellules NK CD56^{bright}. Ce qui pourrait expliquer l'accumulation préférentielle des cellules NK CD56^{bright} dans les environnements riches en RO comme les tumeurs et les sites d'inflammation que les cellules NK CD56^{dim} (Harlin et al. 2007). Dans des modèles expérimentaux, il a été montré que les neutrophiles peuvent activer les cellules NK par le biais de l'IL-18 cytokine nécessaire à l'activation des cellules NK contre une infection au *légiionella pneumophila* (Sporri et al. 2008), et sont aussi nécessaires à la régulation de leurs proliférations, développements ainsi que leurs survies, ce qui pourrait être un problème dans le cas des maladies associées à une neutropénie (Jaeger et al. 2012). Chez les patients atteints d'une neutropénie, la réponse et la maturation des cellules NK sont altérées (Jaeger et al. 2012)

Concernant l'effet des cellules NK sur les neutrophiles, il a été montré que les facteurs solubles présents dans les surnageants des cellules NK stimulées par des cytokines activatrices, sont capables de produire des signaux de survie vers les neutrophiles aboutissant ainsi à une diminution de leur apoptose et à la préservation de leurs capacités de phagocyter et de produire des réactifs oxygénés (ROS) (Bhatnagar et al. 2010). De plus il a été montré que les cellules NK exposées à l'IL-15 ou l'IL-18 induisent la survie des neutrophiles via la production d'IFN- γ et de GM-CSF et leur activation ainsi que la production de d'anion superoxyde d'une façon contact dépendant (Costantini et al. 2010) ce qui favorise la capacité des neutrophiles à détruire les pathogènes. Ces études ont permis de trouver des explications pour certaines maladies où il existe un dysfonctionnement impliquant les cellules NK et les neutrophiles. Il s'agit des patients infectés par HIV-1 où les cellules NK présentent une déficience dans la production des cytokines et de leur activité cytotoxique (Fauci et al. 2005), ce qui se reflète d'une façon négative sur les neutrophiles qui subissent une apoptose spontanée rapide ainsi qu'une diminution de leurs capacités de phagocyter et de produire des réactifs de l'oxygène (Hayani et al. 1999; Kuritzkes 2000; Salmen et al. 2004).

Récemment, en 2012, il a été montré que les cellules NK sont capables d'induire l'apoptose des neutrophiles d'une façon contact dépendant via la molécule NKp46 et Fas-L tout en

impliquant la voie des caspases (Thoren et al. 2012) et via la molécule CD18 suite à une stimulation via l'IL-15 et l'IL-18 (Costantini et al. 2010). Cette accélération de l'apoptose des neutrophiles peut être bénéfique dans le cas de résolution de l'inflammation aiguë.

Cela montre une fois de plus une interaction bénéfique entre les différentes cellules de l'immunité innée.

3.6.3.5. Interactions entre cellules NK et éosinophiles

Les éosinophiles sont essentiellement impliqués dans les réponses immunitaires anti-parasitaires et dans les réactions allergiques. Ces cellules sont produites dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ sous l'influence du GM-CSF, de l'IL-3 et de l'IL-5 (Lopez et al. 1986; Denburg et al. 1994; Shalit et al. 1995). Néanmoins, l'IL-5 est le facteur le plus spécifique de la lignée des éosinophiles puisqu'il est responsable de leur différenciation terminale, leur croissance, leur survie et leurs fonctions effectrices (Coffman et al. 1989; Sanderson 1992; Lee et al. 1997). Ces cellules seront décrites plus précisément dans la deuxième partie de l'introduction.

Plusieurs articles ont montré une relation entre les cellules NK et les éosinophiles. Deux études réalisées chez les souris C57BL/6 ont évalué l'effet d'une déplétion des cellules NK par l'administration d'un anticorps anti-NK1.1 sur l'inflammation éosinophilique associée à une réponse Th2 vis-à-vis de l'ovalbumine (Korsgren et al. 1999) (OVA) ou de l'ambroisie (Walker et al. 1998). La déplétion des cellules NK dès la phase de sensibilisation à l'OVA et tout au long du protocole réduit considérablement l'infiltrat péribronchique et périvasculaire des éosinophiles. Cette diminution d'éosinophilie pulmonaire pourrait s'expliquer par une diminution des taux d'IL-5 dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA). Ces résultats suggèrent que la déplétion des cellules NK avant l'immunisation réduit l'éosinophilie pulmonaire. En revanche, l'administration de l'anti-NK1.1 lors de la phase de provocation à l'OVA n'atténue pas l'éosinophilie pulmonaire (Korsgren et al. 1999). Dans un modèle d'inflammation péritonéale allergique aux antigènes d'ambroisie, le nombre des cellules NK ainsi que l'IL-5 sont augmentées dans le lavage péritonéal. La déplétion des cellules NK par l'anti-NK1.1 avant la provocation à l'ambroisie ou avant les phases de sensibilisation et de provocation à l'ambroisie, réduit fortement l'éosinophilie et les taux d'IL-5 dans le lavage péritonéal. Dans ces deux modèles, la déplétion des cellules NK par l'anti-NK1.1 déplete aussi également la moitié des cellules NKT (Walker et al. 1998). En effet, le NK1.1 n'est pas un marqueur sélectif des cellules NK, il est retrouvé sur certaines populations des lymphocytes T incluant les cellules NKT. Cela rend difficile l'interprétation de ces deux études sur le rôle des cellules NK,

surtout que les cellules NKT sont impliquées dans le développement de la réaction allergique pulmonaire (Akbari et al. 2003b; Lisbonne et al. 2003; Stock et al. 2009). Chez des souris BALB/cByJ, il a été montré que la déplétion des cellules NK avant la provocation allergénique par le biais d'un anticorps anti-ASGM1 (permettant la déplétion de 60 à 70% des cellules NK) aboutissait à une diminution d'éosinophilie dans le LBA (Ple et al. 2010) . Cependant lorsque la déplétion avait eu lieu après la provocation allergénique, il a été observé un retard dans la résolution éosinophilique inflammatoire (Haworth et al. 2011). Cela montre que les cellules NK peuvent jouer un rôle anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire en interagissant avec les éosinophiles.

Une corrélation positive a été observée chez les patients atteints d'une Pneumonie éosinophilique, entre le pourcentage d'éosinophiles et le nombre de cellules NK dans le LBA (Papakosta et al. 2009). De plus, chez les patients atteints d'une rhinite allergique, il a été montré que les cellules NK sont capables de recruter les éosinophiles par le biais de l'IL-8 et que cette chimiotaxie était plus importante en présence d'IL-15 (El-Shazly et al. 2011). Récemment, un nouveau article en 2013 a montré que le pourcentage des cellules NK est corrélé au pourcentage d'éosinophilie chez les patients atteints d'asthme sévère. De plus, les cellules NK sont capables d'induire l'apoptose des éosinophiles autologues d'une façon contact-dépendant. Cette apoptose est plus faible chez les asthmatiques sévères que les asthmatiques modérés et les patients normaux (Barnig et al. 2013).

L'ensemble de ces informations montre de nouveau la capacité des cellules NK à interagir avec différents types cellulaires, en particulier les éosinophiles, et par suite participer à la régulation la réaction allergique.

Résumé de l'article : Natural Killer cells from allergic donors are defective in their response to CCL18 chemokine

Initialement décrites comme des cellules effectrices cytolytiques, les cellules Natural Killer (NK) possèdent également des fonctions immunorégulatrices. Les chimiokines permettent la localisation des cellules NK dans tout l'organisme dans des conditions homéostasiques et pathologiques. Outre leur activité chimiotactique, les chimiokines peuvent également réguler directement la réponse immune. CCL18 est une chimiokine constitutive et inductible, exprimée uniquement chez les primates, dont le récepteur est inconnu. Son expression préférentielle dans les poumons en fait une chimiokine de choix dans l'étude de l'asthme allergique. Sa fonction dans la pathologie allergique est double puisqu'elle recrute les lymphocytes Th2, mais également les lymphocytes T régulateurs et génère des cellules dendritiques tolérogènes capables d'induire des lymphocytes T régulateurs, uniquement chez des donneurs non allergiques.

Le but de mon travail était d'évaluer les effets chimiotactiques et immunorégulateurs de CCL18 sur les cellules NK de donneurs allergiques et non allergiques. Nos travaux ont montré que CCL18 attire *in vitro* les cellules NK de sujets non allergiques et induit leur cytotoxicité, de façon dépendante des protéines G. Par contre, les cellules NK de sujets allergiques ne répondent pas au CCL18. Cette chimiokine n'a aucun effet sur la prolifération des cellules NK, ou la production d'IFN- γ . Le défaut de réponse à CCL18 des cellules NK de patients allergiques n'est pas lié à un défaut d'expression de son récepteur, puisque CCL18 se lie aux cellules NK isolées de donneurs allergiques ou non allergiques

En résumé, ces travaux ont permis de montrer que les cellules NK de sujets allergiques présentent un dysfonctionnement dans la réponse vis-à-vis de CCL18 comparativement aux sujets non-allergiques.

Natural Killer cells from allergic donors are defective in their response to CCL18 chemokine

Latiffa Amniai^{*,a,b,c,d}, Coline Ple^{*,a,b,c,d}, Ali Awad^{*,a,b,c,d}, Patricia de Nadai^{a,b,c,d}, Philippe Marquillies^{a,b,c,d}, Han Vorng^{a,b,c,d}, André-Bernard Tonnel^{a,b,c,d,e}, Benoit Wallaert^{a,b,c,d,e}, Philippe Lassalle^{a,b,c,d}, Anne Tsicopoulos^{a,b,c,d,e}, Mathieu Barrier^{a,b,c,d,1}, Catherine Duez^{a,b,c,d}.

*The three first authors contributed equally to this work

^aPulmonary Immunity, INSERM, U1019, F-59019, Lille, France ; ^bInstitut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019, Lille, France ; ^cCNRS UMR 8204, F-59000, Lille, France ; ^dUniv Lille Nord de France, F-59000, Lille, France; ^eClinique des Maladies Respiratoires et CHRU Lille, 59037 Lille, France

¹Present address: ALZPROTECT, Parc Eurasanté, 70 rue du Dr. Yersin, 59120 Loos, France

Corresponding author:

Catherine Duez

Center for Infection and Immunity of Lille, Pulmonary Immunity

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP 245

59019 Lille, France

Phone: (33)320877183

Fax: (33)320877345

e-mail: catherine.duez@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells were originally described as cytolytic effector cells, but since then have been recognized to possess regulatory functions on immune responses. Chemokines locate NK cells throughout the body in homeostatic and pathological conditions. Recent data suggest that chemokines may also directly regulate the immune response. CCL18 is a constitutive and inducible chemokine preferentially expressed in the lung. The aim of this study was to evaluate CCL18 effect on NK cells from allergic and nonallergic donors in terms of both chemotactic and immune effects. Results showed that CCL18 was able to induce migration of NK cells from nonallergic donors in a G-protein-dependent manner, whereas NK cells from allergic patients were unresponsive. Moreover, CCL18 was able to induce NK cell cytotoxicity only in nonallergic subjects. IFN- γ production and NK cell proliferation was unaffected. The defect in CCL18 response by NK cells from allergic patients was unrelated to a defect in CCL18 binding as CCL18 was found to bind to NK cells from both allergic and nonallergic donors. Our results suggest that some NK cell functions may be defective in allergic diseases.

Key words: natural killer cell, CCL18, migration, cytotoxicity, allergy

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are unconventional lymphocytes with an innate immune function that play a role in the early defense against viral, bacterial and other infections, as well as against cancer. They were originally described as cytolytic effector cells, but have been also recognized as major producers of cytokines such as interferon- γ (IFN- γ) in many physiological and pathological conditions (Vivier et al.). In humans, NK cells are divided into CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets, which differ in phenotype and functions. The former subset is more immunoregulatory and the latter, the most differentiated subset, is more cytolytic (Cooper et al. 2001). NK functions are not restricted to microbe-infected cells or tumor cells but also impact dendritic cells, macrophages, and neutrophils (Moretta et al. 2005; Thoren et al.) and endow NK cells with regulatory functions. The role of NK cells in allergic diseases is unknown but modifications in their phenotype and functions have been shown (Wei et al. 2005; Scordamaglia et al. 2008; Luci et al. 2012).

NK cells develop mainly in the bone marrow and reach the periphery via the blood. They are highly motile and constantly survey peripheral organs. Expression of distinct sets of chemotactic receptors on NK cell subsets results in differential distribution (Walzer et al. 2011). Further, chemokines may activate NK cells to exert robust cytolytic activity against tumor cells in cytotoxicity assays performed *in vitro* and in mouse models (Maghazachi 2010). Until recently, CCL18 was still an orphan chemokine without known receptor. Its gene is thought to be absent in rodents (Tasaki et al. 1999), precluding experimental studies to assess its functionality *in vivo*. CCL18 attracts different cell types including naïve CD4⁺ T cells, B lymphocytes, immature dendritic cells, skin-homing memory T cells, Th2 cells, T regulatory cells and basophils (Adema et al. 1997; Lindhout et al. 2001; Gunther et al. 2005; de Nadai et al. 2006; Chenivresse et al. 2012). CCL18 has been involved in allergic diseases (Gunther et al. 2005; de Nadai et al. 2006). It is secreted by mononuclear cells from allergic asthmatic patients but not from healthy donors after allergen stimulation, and attracts Th2 cells and basophils (de

Nadai et al. 2006). Nevertheless, it may also limit allergic immune responses (Chang et al. 2010b; Azzaoui et al. 2011; Bellinghausen et al. 2012; Chenivresse et al. 2012). Recently, glycosaminoglycans (GAGs) were identified to be the major binding molecules for CCL18 on the cellular membrane of peripheral blood leucocytes, without mediating chemotactic activity (Krohn et al. 2013a). Moreover, CCL18 was reported to be an endogenous agonist of the human CCR8 receptor (Islam et al. 2013).

To evaluate the effects of CCL18 on NK cells in the context of allergy, we compared the chemotactic and cytotoxic response of NK cells from allergic or nonallergic donors.

MATERIALS AND METHODS

NK cell preparation

Venous blood was collected from allergic and nonallergic donors. All allergic patients had a clinical history of asthma or rhinitis and exhibited positive skin prick tests toward relevant allergen, positive specific IgE (>3.5KUI/L). Nonallergic patients were defined by an absence of allergy history, total IgE levels <100KUI/L, and negative specific IgE toward major allergens.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified on Ficoll-Hypaque gradient (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). NK cells were isolated using the NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergsch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Purity was assessed by flow cytometry (FACScalibur®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) and was greater than 95%. After purification, NK cells were cultured overnight in 24 well plates (Corning Incorporated, Acton, MA) at 10^6 cells/mL in complete RPMI (RPMI 1640 (Gibco BRL, UK) supplemented with 10% fetal calf serum, 1% ticarpen, 2mM L-glutamine) with or without pertussis toxin (0.1µg/ml, Calbiochem, EMD Chemicals Inc, San Diego, CA, USA).

Staining of NK cells

10^6 PBMC were stained with monoclonal antibodies against BV510-conjugated CD3 (Biolegend, San Diego, CA, USA) and phycoerythrin(PE)-conjugated CD56 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). After washings, NK cells were stained for CCL18 receptor as previously described (Azzaoui et al. 2011). As a control, we used a biotinylated small molecular weight protein derived from *Plasmodium falciparum* (Chang et al. 2010b). The specificity of the biotinylated CCL18 was shown by inhibition with nonlabeled CCL18 (data not shown). After washings, cells were fixed in paraformaldehyde 1% and analyzed by flow

cytometry (LSRFortessaTM, BD Biosciences). The purity of NK cell preparations was checked by cell surface staining with fluorescein (FITC)-, PE- or allophycocyanin-conjugated antibodies against CD56 (Beckman Coulter), CD3, CD14, CD19 (BD Biosciences) and the matched isotype IgG. For the expression of chemokine receptors by NK cells, FITC-conjugated CXCR3, CXCR4, CCR4 and CCR9 (R&D systems) specific antibodies were used. After washings, NK cells were immediately analyzed by flow cytometry (FACScalibur®). Results are expressed as mean percentage of positive cells ± sem.

NK cell migration assays

Chemotaxis experiments were performed in Boyden chamber as previously described (Chenivesse et al. 2012). NK cells were incubated for 2h with CCL18 (at a concentration of 10^{-10} to 10^{-7} M, R&D systems), or CXCL12 (10^{-7} M, Peprotech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) and complete RPMI as positive and negative controls, respectively. Each condition was performed in triplicate. NK cells were counted in the inferior chamber using a hemocytometer. Results are expressed as chemotactic index = (migration towards the tested chemokine)/(migration obtained with complete RPMI).

To phenotype NK cells migrating in response to CCL18, chemotaxis experiments were performed using Transwells[®] (5µm, 24 wells, Corning). CCL18 (5×10^{-8} M) was added to the lower chamber in a 500µL volume. 5×10^5 NK cells/100µL were added to the upper chamber and incubated for 2h at 37°C in 5% CO₂. Migrating NK cells were obtained from the lower chamber and stained for phenotype analysis. NK cell phenotype was also assessed before migration. Results are expressed as percentage of migrating NK cells = (migrating NK cell number)/(NK cell number before migration) x100.

Cytotoxicity Assays

Target cell death was measured either using fluorometric assessment derived from previously described FATAL (Fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis) assay (Sheehy et al. 2001) or by measuring the release of the adenylate kinase enzyme from damaged cells (Toxilight[®] BioAssay kit, Lonza, Rockland, USA). NK cells were cultured overnight in 6 well plates at 10^6 cells/mL in complete RPMI (negative control), with cytokine cocktail (IL-15, 20ng/mL, plus IL-12, 5ng/mL, plus IL-2, 10ng/mL) (positive control), or with CCL18 (10^{-8} M). Target cell lines (K562 and Jurkat cells) were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

For FATAL assay, K562 cells were stained with 2×10^{-6} M PKH-26 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) and 2.5×10^{-6} M carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester (CFSE) (FluoProbes, USA). Target cells and NK cells were incubated for 3h at different ratios effector:target (0:1, 10:1, 20:1) in a 96 well round bottom plate (Corning). The death of PKH-26⁺ target cells was measured by intracellular CFSE loss on flow cytometer (FACScalibur[®]). Cytotoxicity is expressed as % specific lysis = (% CFSE^{low} cells obtained in the tested ratio) – (% CFSE^{low} cells obtained for target cells alone (ratio 0:1)).

For measurement of adenylate kinase release, Jurkat (sensitive to Fas-dependent cytotoxicity) and NK cells were resuspended at 0.5×10^6 cells/mL and 10×10^6 cells/mL respectively and incubated for 3h at 37°C in 5% CO₂ at a 10:1 effector:target ratio in a 96 well round bottom plate. To monitor NK cell death, NK cells were incubated alone in complete RPMI in numbers equivalent to a ratio 10:1. Cell death was evaluated by the Toxilight[®] BioAssay on supernatants, according to the manufacturer's recommendations and measured as cpm (count per minute) (Victor[®], PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Results are expressed as cytotoxicity index = (cpm obtained for the tested ratio in wells containing target and NK cells - cpm obtained for the corresponding ratio in wells containing NK cells alone)/mean cpm for target cells alone.

Statistical analysis

Values for all measurements were expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were done using GraphPad Prism 4.03 software. Values were compared using non parametric Wilcoxon, Kruskal Wallis or Friedman tests. When statistical significance was observed, differences were subsequently analyzed by using the Dunn test. p values for significance were set to 0.05.

RESULTS

CCL18 attracts NK cells from nonallergic donors in a G-protein dependent manner

To determine the chemotactic effect of CCL18 on NK cells, *in vitro* migration was assessed in Boyden chamber. Whilst NK cells from allergic and nonallergic donors similarly migrated towards the positive control CXCL12, only NK cells from nonallergic donors migrated dose-dependently towards CCL18 (figure 1A). Because allergic patients exhibit high levels of circulating CCL18 compared to nonallergic donors (de Nadai et al. 2006), which may induce internalization of the receptor after ligand recognition (Neel et al. 2005), we evaluated NK cell chemotaxis after resting in the absence of ligand in order to allow receptor cell surface re-expression. NK cells from allergic donors cultured in medium alone for 24 and 48 hours, did not migrate in response to CCL18 (data not shown). We also checked that NK cell migration of nonallergic donors was not due to chemokinesis, by performing migration assays in the presence of CCL18 in the upper compartment of the Boyden chamber (data not shown). Finally, NK cell pre-treatment by pertussis toxin abolished the migration of NK cells in response to CCL18 (figure 1B), suggesting G-protein-dependent pathway.

To evaluate if CCL18 preferentially attracted a defined subset, NK cells from nonallergic donors were stained and analyzed by flow cytometry before and after migration toward CCL18 through a Transwell[®]. As seen above, NK cells from nonallergic donors significantly migrated in response to CCL18 (% of migrating cells = 26.69 ± 2.84) compared to migration toward medium (% of migrating cells = 16.88 ± 1.44). However, we did not evidence any enrichment of CD56^{bright} or CD56^{dim} subsets, nor of NK cells positive for perforin or CD161 (involved in cytotoxicity), IFN- γ (the major cytokine produced by NK cells), or CCR4 (important chemokine receptor in Th2 allergic response) (data not shown).

CCL18 induces cytotoxic function of NK cells from nonallergic donors in a G-protein-dependent manner

Cytotoxicity toward the NK cell-sensitive target cell lines was measured after overnight stimulation of NK cells by CCL18. The cytokine cocktail IL-2+IL-12+IL-15 significantly increased cytotoxicity of NK cells from allergic and nonallergic donors. However, only NK cells from nonallergic donors exhibited increased cytotoxicity in response to CCL18 (figure 2A-B). CCL18-induced cytotoxicity was inhibited by pertussis toxin, suggesting a G-protein-dependent pathway (figure 2C).

Defective response of NK cells from allergic patients to CCL18 is not related to a down regulation of its putative receptor

The defective response of NK cells from allergic donors to CCL18 suggested a problem at the receptor level. As the putative CCL18 receptor is still debated, it was indirectly labeled using the biotinylated ligand as previously described (Azzaoui et al. 2011). NK cells from both allergic and nonallergic donors were able to bind CCL18 (figure 3A-B), suggesting that CCL18 receptor is not down regulated. Both CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cell subsets bound CCL18, confirming our previous data on transmigrated cells. However more CD56^{dim} NK cells bound CCL18 than CD56^{bright} NK cells in allergic and nonallergic donors (figure 3A-B), suggesting that CCL18 receptor may identify subpopulations among subsets. In contrast, we did not evidence difference in the expression of other chemokine receptors by CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells between allergic and nonallergic donors (figure 3C). Chemokine binding to these receptors induced *in vitro* migration of NK cells from both nonallergic and allergic donors (data not shown). These results suggest that CCL18-related defects on NK cells from allergic donors is restricted to this chemokine.

DISCUSSION

In this work, we found that CCL18 was able to bind, attract and stimulate NK cells *in vitro*. Our data confirm a very recently published work (Krohn et al. 2013b), but show for the first time that this response is restricted to NK cells isolated from nonallergic donors. Such differential effect has been previously observed for this particular chemokine but in terms of T cell and dendritic cell activation (Azzaoui et al. 2011). The absence of NK cell migration towards CCL18 in allergic patients is not related to a downregulation of CCL18 receptor cell surface expression because resting of NK cells from allergic patients for 24 or 48 hours in medium, which allows re-expression of chemokine receptor after internalization (Neel et al. 2005), did not restore their migration. Moreover, labelled-CCL18 was able to bind NK cells from both allergic and nonallergic donors suggesting that the putative receptor for CCL18 was present at the cell surface of NK cells from allergic patients. The other known chemokine receptors expressed by NK cells were not differentially expressed between allergic and nonallergic donors suggesting that the defect in NK reactivity to CCL18 is specific to the chemokine and not to the allergic status. CCL18 receptor was coupled to G-protein as shown by pertussis toxin inhibition of CCL18-induced migration and cytotoxic response. This is concordant with previous studies showing that chemokine signalling in NK cells involves pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins (Maghazachi et al. 1997; Maghazachi 2010; Walzer et al. 2011). In NK cells from allergic patients, this receptor might be uncoupled from proper signalling. This may be the consequence of a mutated receptor as shown for CXCR2. Indeed, Cys-mutated CXCR2 displayed a severely reduced chemotaxis toward CXCL8, despite its conserved ability to bind this chemokine (Limatola et al. 2005). Another explanation is suggested by a recent publication showing that the major binding interaction of CCL18 is to glycosaminoglycans (GAGs). However, a CCL18 mutant unable to bind to GAGs was still able to induce the chemotactic response (Krohn et al. 2013b), suggesting the existence of a different functional receptor for CCL18, mediating chemotaxis.

Therefore, in our experiments, the functional G-protein-coupled receptor for CCL18 might be down-regulated on NK cells from allergic patients, whereas GAG may bind the biotinylated-CCL18 consequently showing no difference of expression between allergic and nonallergic subjects. Very recently, it was shown that CCL18 binds to and activate CCR8 (Islam et al. 2013). However, CCR8 was found to be undetectable on freshly-isolated NK cells (Ebert et al. 2006) or expressed by 0.7% of NK cells and restricted to the CD56^{bright} NK cell subset (Soler et al. 2006), suggesting that a different receptor might be involved in CCL18-induced NK cell chemotaxis.

In nonallergic donors, we showed that CCL18 did not preferentially attract CD56^{bright} or CD56^{dim} subset and that the two subsets bound CCL18. However, only a fraction of CD56^{bright} or CD56^{dim} NK cells was able to bind CCL18 (respectively around 75 and 50%) suggesting the existence of different subsets based on chemokine receptor expression within CD56^{bright} and CD56^{dim} subsets as previously shown (Berahovich et al. 2006). We also showed that CCL18 migration did not modify the percentage of NK cells expressing perforin, CD161, IFN- γ and CCR4, suggesting that CCL18 does not preferentially attract NK cells specialized in cytotoxicity or IFN- γ production.

We found CCL18 to have no effect on IFN- γ production, on KIR or NKp46 expression or on NK cell proliferation (data not shown). However, CCL18 increased cytotoxicity of NK cells from nonallergic donors. Other chemokines have been shown to enhance the cytotoxic activity of resting NK cells mainly through the release of cytotoxic granules (Taub et al. 1995; Loetscher et al. 1996; Yoneda et al. 2000). Because NK cells were washed after CCL18-induced activation, another mechanism may probably account for CCL18 induced NK cell cytotoxicity. One possibility is cell polarization, which is required for the release of NK cytolytic granules as well as for the formation of conjugates between killer cells and their target cells, as shown for other chemokines (Nieto et al. 1998).

As CCL18 does not exist in rodent (Tasaki et al. 1999), it prevents *in vivo* studies in animal models. However, we can speculate that CCL18 produced in particular by dendritic cells (Lindhout et al. 2001; Vulcano et al. 2003) may help to locate and activate NK cells in their vicinity for crosstalk (Buentke et al. 2002; Walzer et al. 2005). One argument in favour of this hypothesis is given by the analysis of skin lesions of atopic dermatitis patients where natural killer cells were detected in the epidermis in close contact with CD1a⁺ dendritic cells (Buentke et al. 2002), whilst all CCL18-expressing cells in the epidermis were CD1a⁺ (Gunther et al. 2005). Moreover both CCL18 and intratumoral NK cells were associated with prolonged survival of gastric cancer patients (Ishigami et al. 2000; Leung et al. 2004), which may be related to CCL18 increasing NK cell cytotoxic function.

Altogether, our results showing that NK cells from allergic donors did not respond to CCL18 suggest that efficient crosstalk between dendritic cells and NK cells may be disrupted in allergic patients, resulting in defect in NK cell activation.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CCL18 attracts NK cells from nonallergic donors in a G-protein-dependent manner.

(A) Migration towards the positive controls CXCL12 and different concentrations of CCL18 (n=14 for nonallergic donors, n=5 for allergic donors). The line sets at 1 represents chemotactic index of medium. * p<0.05 chemokines versus medium. (B) NK cells from nonallergic donors were incubated with or without pertussis toxin immediately before chemotaxis assay (n=3).

Figure 2: CCL18 enhances cytotoxic activity of NK cells from nonallergic donors in a G-protein-dependent manner.

(A) Purified NK cells from nonallergic (n=13) or allergic (n=9) donors were incubated overnight in complete medium alone or supplemented with IL-15+IL-12+IL-2 (cytokine cocktail) or CCL18. Afterward, NK cells were incubated with Jurkat target cells at a 10:1 (effector:target) ratio and specific lysis was evaluated by adenylate kinase release. (B) NK cells stimulated in the same conditions with cytokine cocktail or CCL18 were incubated with K562 target cells at 10:1 and 20:1 (effector:target) ratio and specific lysis was evaluated by fluorometric method. One representative experiment out of 3 is shown for nonallergic and allergic donors. (C) NK cells from nonallergic donors were incubated with or without pertussis toxin immediately before activation with CCL18 (n=3). NS: not significant.

Figure 3: CCL18 binds to NK cells from both allergic and nonallergic donors.

(A) Mean \pm sem of percentages of cells binding CCL18 amongst total CD3⁻CD56⁺, CD3⁻CD56^{dim}, CD3⁻CD56^{bright} NK cells for nonallergic (n=7) and allergic (n=6) donors. Results are expressed as mean percentage of CCL18 receptor positive (% CCL18-R⁺) cells \pm sem. * and #: p<0.05 between CD3⁻CD56^{dim} and CD3⁻CD56^{bright} NK cells for nonallergic and allergic donors, respectively. (B) A representative histogram of CCL18 receptor staining is shown for

one nonallergic and one allergic donor. Black histogram: biotinylated-CCL18, grey histogram: non relevant biotinylated protein. (C) Expression of other chemokine receptors on total or subsets of NK cells, isolated from nonallergic (black columns, n=8) or allergic (white columns, n=12) donors. Results are expressed as mean percentage of chemokine receptor positive (% chemokine-R⁺) cells \pm sem.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM, UCB Institute of Allergy and Société Française d'Allergologie. LA, CP, AA were supported by Ministère de l'Éducation et de la Recherche. MB was supported by Région Nord-pas-de Calais and Agence Nationale de la Recherche SEST. We thank BioImaging Center Lille Nord-de-France for access to flow cytometer, Dr Emeric Deruy for technical advice in flow cytometry, and Dr Stanilas Tomavo for his kind gift of control protein.

REFERENCES

- [1] E. Vivier, D.H. Raulet, A. Moretta, M.A. Caligiuri, L. Zitvogel, L.L. Lanier, W.M. Yokoyama, S. Ugolini, Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells, *Science* 331 (2011) 44-49.
- [2] M.A. Cooper, T.A. Fehniger, M.A. Caligiuri, The biology of human natural killer-cell subsets, *Trends Immunol* 22 (2001) 633-640.
- [3] A. Moretta, E. Marcenaro, S. Sivori, M. Della Chiesa, M. Vitale, L. Moretta, Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues, *Trends Immunol* 26 (2005) 668-675.
- [4] F.B. Thoren, R.E. Riise, J. Ousback, M. Della Chiesa, M. Alsterholm, E. Marcenaro, S. Pesce, C. Prato, C. Cantoni, J. Bylund, L. Moretta, A. Moretta, Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46- and Fas-Dependent Mechanism, *J Immunol* 188 (2012) 1668-1674.
- [5] C. Luci, C. Gaudy-Marqueste, P. Rouzair, S. Audonnet, C. Cognet, A. Hennino, J.F. Nicolas, J.J. Grob, E. Tomasello, Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis, *Br J Dermatol* 166 (2012) 789-796.
- [6] F. Scordamaglia, M. Balsamo, A. Scordamaglia, A. Moretta, M.C. Mingari, G.W. Canonica, L. Moretta, M. Vitale, Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases, *J Allergy Clin Immunol* 121 (2008) 479-485.
- [7] H. Wei, J. Zhang, W. Xiao, J. Feng, R. Sun, Z. Tian, Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance, *J Allergy Clin Immunol* 115 (2005) 841-847.
- [8] T. Walzer, E. Vivier, G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration, *Trends Immunol* 32 (2011) 486-492.

- [9] A.A. Maghazachi, Role of chemokines in the biology of natural killer cells, *Curr Top Microbiol Immunol* 341 (2010) 37-58.
- [10] Y. Tasaki, S. Fukuda, M. Iio, R. Miura, T. Imai, S. Sugano, O. Yoshie, A.L. Hughes, H. Nomiyama, Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes, *Genomics* 55 (1999) 353-357.
- [11] G.J. Adema, F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K.B. Bacon, C.G. Figdor, A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells, *Nature* 387 (1997) 713-717.
- [12] C. Chenivresse, Y. Chang, I. Azzaoui, S. Ait Yahia, O. Morales, C. Ple, A. Foussat, A.B. Tonnel, N. Delhem, H. Yssel, H. Vorng, B. Wallaert, A. Tsicopoulos, Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells, *J Immunol* 189 (2012) 128-137.
- [13] P. de Nadai, A.S. Charbonnier, C. Chenivresse, S. Senechal, C. Fournier, J. Gilet, H. Vorng, Y. Chang, P. Gosset, B. Wallaert, A.B. Tonnel, P. Lassalle, A. Tsicopoulos, Involvement of CCL18 in allergic asthma, *J Immunol* 176 (2006) 6286-6293.
- [14] C. Gunther, C. Bello-Fernandez, T. Kopp, J. Kund, N. Carballido-Perrig, S. Hinteregger, S. Fassl, C. Schwarzler, G. Lametschwandtner, G. Stingl, T. Biedermann, J.M. Carballido, CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells, *J Immunol* 174 (2005) 1723-1728.
- [15] E. Lindhout, J.L. Vissers, F.C. Hartgers, R.J. Huijbens, N.M. Scharenborg, C.G. Figdor, G.J. Adema, 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* 166 (2001) 3284-3289.
- [16] I. Azzaoui, S.A. Yahia, Y. Chang, H. Vorng, O. Morales, Y. Fan, N. Delhem, C. Ple, A.B. Tonnel, B. Wallaert, A. Tsicopoulos, CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects, *Blood* 118 (2011) 3549-3558.

- [17] I. Bellinghausen, S. Reuter, H. Martin, J. Maxeiner, U. Luxemburger, O. Tureci, S. Grabbe, C. Taube, J. Saloga, Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity, *J Allergy Clin Immunol* 130 (2012) 1384-1393.
- [18] Y. Chang, P. de Nadai, I. Azzaoui, O. Morales, N. Delhem, H. Vorng, S. Tomavo, S. Ait Yahia, G. Zhang, B. Wallaert, C. Chenivresse, A. Tsicopoulos, The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4⁺ T cells of healthy but not allergic subjects, *Faseb J* 24 (2010) 5063-5072.
- [19] S. Krohn, A. Garin, C. Gabay, A.E. Proudfoot, The Activity of CCL18 is Principally Mediated through Interaction with Glycosaminoglycans, *Front Immunol* 4 (2013) 193.
- [20] S.A. Islam, M.F. Ling, J. Leung, W.G. Shreffler, A.D. Luster, Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor, *J Exp Med* 210 (2013) 1889-1898.
- [21] M.E. Sheehy, A.B. McDermott, S.N. Furlan, P. Klenerman, D.F. Nixon, A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis, *J Immunol Methods* 249 (2001) 99-110.
- [22] N.F. Neel, E. Schutysse, J. Sai, G.H. Fan, A. Richmond, Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking, *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2005) 637-658.
- [23] S.C. Krohn, P. Bonvin, A.E. Proudfoot, CCL18 exhibits a regulatory role through inhibition of receptor and glycosaminoglycan binding, *PLoS One* 8 (2013) e72321.
- [24] A.A. Maghazachi, B.S. Skalhegg, B. Rolstad, A. Al-Aoukaty, Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins, *Faseb J* 11 (1997) 765-774.
- [25] C. Limatola, S. Di Bartolomeo, M. Catalano, F. Trettel, S. Fucile, L. Castellani, F. Eusebi, Cysteine residues are critical for chemokine receptor CXCR2 functional properties, *Exp Cell Res* 307 (2005) 65-75.

- [26] L.M. Ebert, S. Meuter, B. Moser, Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance, *J Immunol* 176 (2006) 4331-4336.
- [27] D. Soler, T.R. Chapman, L.R. Poisson, L. Wang, J. Cote-Sierra, M. Ryan, A. McDonald, S. Badola, E. Fedyk, A.J. Coyle, M.R. Hodge, R. Kolbeck, CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes, *J Immunol* 177 (2006) 6940-6951.
- [28] R.D. Berahovich, N.L. Lai, Z. Wei, L.L. Lanier, T.J. Schall, Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression, *J Immunol* 177 (2006) 7833-7840.
- [29] P. Loetscher, M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, B. Moser, Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release, *J Immunol* 156 (1996) 322-327.
- [30] D.D. Taub, T.J. Sayers, C.R. Carter, J.R. Ortaldo, Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity, *J Immunol* 155 (1995) 3877-3888.
- [31] O. Yoneda, T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E.T. Bloom, N. Domae, H. Umehara, Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells, *J Immunol* 164 (2000) 4055-4062.
- [32] M. Nieto, F. Navarro, J.J. Perez-Villar, M.A. del Pozo, R. Gonzalez-Amaro, M. Mellado, J.M. Frade, A.C. Martinez, M. Lopez-Botet, F. Sanchez-Madrid, Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions, *J Immunol* 161 (1998) 3330-3339.
- [33] M. Vulcano, S. Struyf, P. Scapini, M. Cassatella, S. Bernasconi, R. Bonecchi, A. Calleri, G. Penna, L. Adorini, W. Luini, A. Mantovani, J. Van Damme, S. Sozzani, Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells, *J Immunol* 170 (2003) 3843-3849.
- [34] E. Buentke, L.C. Heffler, J.L. Wilson, R.P. Wallin, C. Lofman, B.J. Chambers, H.G. Ljunggren, A. Scheynius, Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--*Malassezia*-influenced cell interaction, *J Invest Dermatol* 119 (2002) 850-857.

- [35] T. Walzer, M. Dalod, S.H. Robbins, L. Zitvogel, E. Vivier, Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force", *Blood* 106 (2005) 2252-2258.
- [36] S. Ishigami, S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, C. Xiangming, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita, T. Aikou, Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer, *Cancer Lett* 159 (2000) 103-108.
- [37] S.Y. Leung, S.T. Yuen, K.M. Chu, J.A. Mathy, R. Li, A.S. Chan, S. Law, J. Wong, X. Chen, S. So, Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer, *Gastroenterology* 127 (2004) 457-469.

Figures

Figure 1:

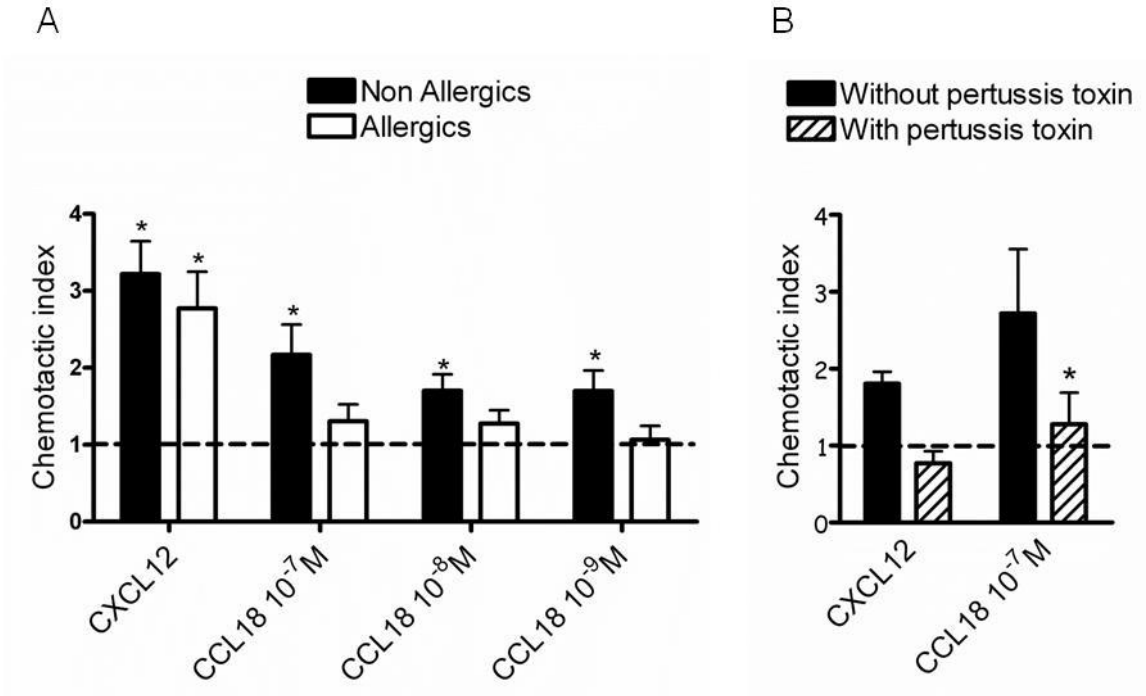


Figure 2:

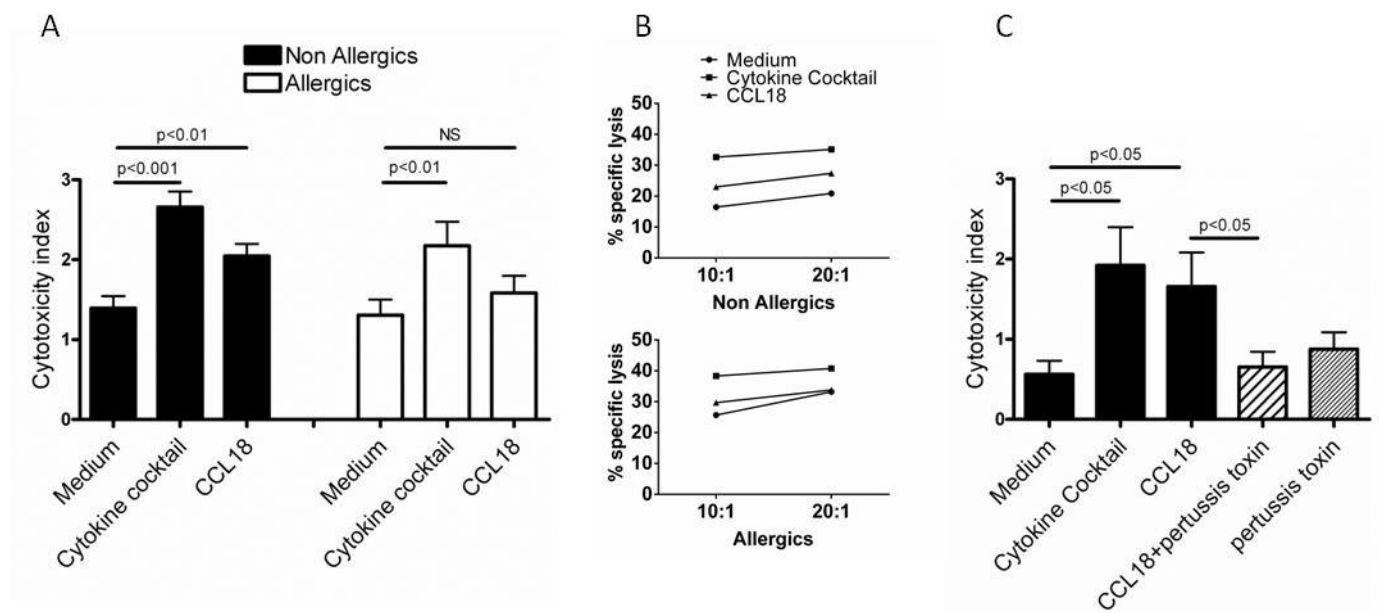
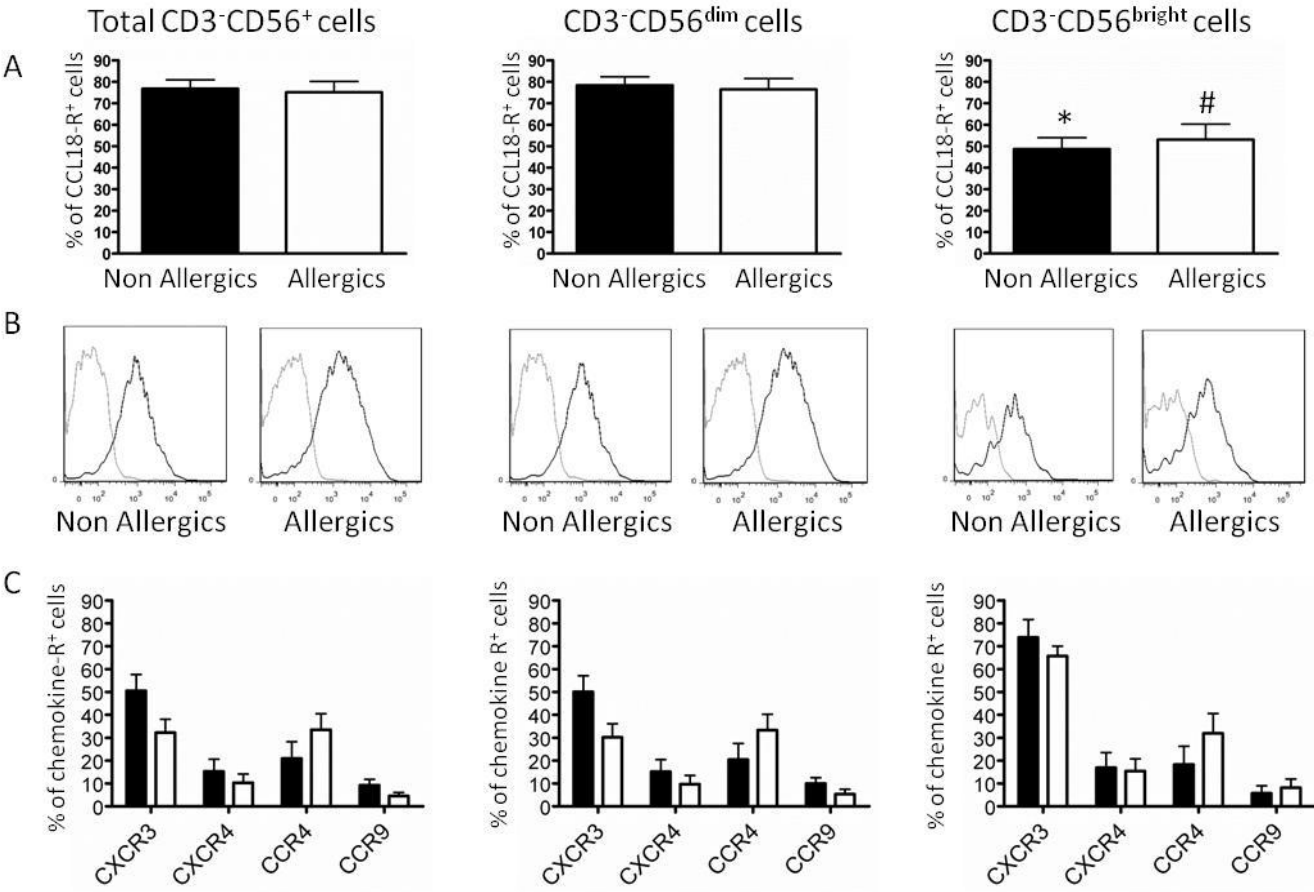


Figure 3:



Résumé de l'article: Natural Killer cells induce eosinophils activation and apoptosis

Les cellules Natural Killer (NK) sont des lymphocytes du système immunitaire inné initialement caractérisées par leurs fonctions cytotoxiques sur des cellules infectées et transformées sans sensibilisation préalable. Les cellules NK jouent également un rôle immunorégulateur en libérant des cytokines et chimiokines et en interagissant avec différentes cellules de l'immunité comme les cellules dendritiques, les lymphocytes, les monocytes et les neutrophiles. Les éosinophiles sont fortement impliqués dans les maladies allergiques, où ils induisent des dommages et des dysfonctionnements tissulaires et contribuent au maintien de l'inflammation en libérant un ensemble de protéines cationiques de granules cytotoxiques. Ainsi, la régulation de leur activation et apoptose semble cruciale pour développer une réponse immune bénéfique et éviter les dommages tissulaires.

La deuxième partie de mon travail de thèse s'est basé sur l'hypothèse d'un dialogue entre les cellules NK et les éosinophiles qui modifierait leurs fonctions respectives. Très peu de données ont été publiées sur ce sujet (certaines l'ont été au cours de la thèse) mais toutes suggèrent une interaction entre les cellules NK et les éosinophiles. Nous avons purifié et cocultivé des cellules NK et des éosinophiles autologues pendant 3 et 12h, à différents ratios. Nous avons montré que les cellules NK activent directement les éosinophiles comme en témoignent l'augmentation du CD69 et la diminution de l'expression du CD62L, et induisent leur dégranulation : expression membranaire du CD63 sur les éosinophiles vivants et libération de l'eosinophil cationic protein (ECP), l'eosinophil derived neurotoxin (EDN). De plus, la coculture avec les cellules NK induit l'apoptose et la mortalité des éosinophiles dès la première heure de coculture. Cependant l'apoptose et la mortalité des cellules NK ne sont pas modifiées. La fixation des cellules NK et la séparation des cellules NK et des éosinophiles par une membrane poreuse empêche presque totalement l'activation et l'apoptose des éosinophiles, suggérant l'implication de molécules de surface bien que l'implication de facteurs solubles ne puisse être exclue. L'expression de ERK (extracellular signal-regulated kinase) phosphorylé est augmentée dans les éosinophiles en coculture. De plus, l'expression membranaire du CD63 est diminué après traitement par des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation impliquant ERK, p38MAPK (mitogen-activated protein kinase), c-Jun Nterminal kinase (JNK), et PI3K (phosphoinositide 3-kinase), suggérant l'implication de ces voies de signalisation dans la dégranulation des eosinophiles induite par les cellules NK. Enfin, nous avons montré que les cellules NK augmentent l'expression des réactifs dérivés de l'oxygène (ROS) par les éosinophiles en co-culture et que des inhibiteurs mitochondriaux (rotenone et antimycine) diminuent partiellement l'apoptose des éosinophiles induite par les cellules NK,

suggérant l'implication des ROS mitochondriaux dans l'apoptose des éosinophiles induite par les cellules NK. Un inhibiteur de caspases (ZVAD-FMK) ne diminue que très modérément l'apoptose des éosinophiles en co-culture.

En résumé, nos résultats suggèrent que les cellules NK pourraient réguler l'inflammation à éosinophiles en induisant leur activation et/ou leur apoptose.

Natural Killer cells induce eosinophil activation and apoptosis

Ali Awad^{a,b,c,d}, Hanane Yassine^{a,b,c,d}, Mathieu Barrier^{a,b,c,d,f}, Han Vorng^{a,b,c,d}, Philippe Marquillies^{a,b,c,d}, Anne Tsicopoulos^{a,b,c,d,e}, Catherine Duez^{a,b,c,d}.

^aPulmonary Immunity, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019, Lille, France ; ^bInstitut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019, Lille, France ; ^cCNRS UMR 8204, F-59000, Lille, France ; ^dUniv Lille Nord de France, F-59000, Lille, France; ^eClinique des Maladies Respiratoires et Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille, France ; ^fcurrent address : ALZPROTECT, Bio-incubateur, Parc Eurasanté, 70 rue du Dr. Yersin, 59120 Loos, France

Corresponding author:

Catherine Duez

Center for Infection and Immunity of Lille, Team 11: Pulmonary Immunity

Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP 245

59019, Lille Cedex, France

Phone: (33) 3 20 87 71 83

Fax: (33) 3 20 87 73 45

e-mail: catherine.duez@pasteur-lille.fr

Key words: Natural killer cell, eosinophil, degranulation, apoptosis

Abstract

Eosinophils are potent inflammatory cells with numerous immune functions, including antigen presentation and exacerbation of inflammatory responses through their capacity to release a range of largely preformed cytokines and lipid mediators. Thus, timely regulation of eosinophil activation and apoptosis is crucial to develop beneficial immune response and to avoid tissue damage and induce resolution of inflammation. Natural Killer (NK) cells have been reported to influence innate and adaptive immune responses by multiple mechanisms including cytotoxicity against other immune cells. In this study, we analyzed the effect of the interaction between NK cells and eosinophils. Co-culture experiments revealed that human NK cells could trigger autologous eosinophil activation, as shown by up-regulation of CD69 and down-regulation of CD62L, as well as degranulation, evidenced by increased CD63 surface expression, secretion of eosinophil cationic protein (ECP) and eosinophil derived neurotoxin (EDN). Moreover, NK cells significantly and dose dependently increased eosinophil apoptosis as shown by annexin V and propidium iodide (PI) staining. Both direct contact and soluble factors were necessary for eosinophil degranulation and apoptosis. Increased expression of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in cocultured eosinophils and inhibition of eosinophil CD63 expression by pharmacologic inhibitors suggest that ERK pathway is involved in NK cell-induced eosinophil degranulation. Finally, we showed that NK cells increased reactive oxygen species (ROS) expression by eosinophils in co-culture and that mitochondrial inhibitors (rotenone and antimycin) partially diminished NK cell-induced eosinophil apoptosis, suggesting the implication of mitochondrial ROS in NK cell-induced eosinophil apoptosis. Pan-caspase inhibitor (ZVAD-FMK) only slightly decreased eosinophil apoptosis in coculture. Altogether, our results suggest that NK cells regulate eosinophil functions by inducing their activation and their apoptosis.

Introduction

Eosinophils are multifunctional leukocytes implicated in the pathogenesis of numerous inflammatory processes including parasitic helminth, bacterial and viral infections, tissue injury, tumor immunity, and allergic diseases. Among various hematopoietic factors, IL-5 potently and specifically stimulates eosinophil production and survival (Sanderson 1992). Eosinophils have been shown to possess the ability to perform numerous immune functions, including antigen presentation and exacerbation of inflammatory responses through their capacity to release a range of largely preformed cytokines and lipid mediators (Hogan et al. 2008). For example, eosinophils can serve as major effector cells inducing tissue damage and dysfunction by releasing an array of cytotoxic granule cationic proteins: Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP) and Eosinophil derived Neurotoxin (EDN) (Gleich et al. 1986). CD63 translocation and enhanced cell surface expression is associated with this release of mediators (Mahmudi-Azer et al. 2002). Timely regulation of eosinophil activation and apoptosis is crucial to develop beneficial immune response and to avoid tissue damage and induce resolution of inflammation.

Human Natural Killer cells (NK) are large granular lymphocytes discovered more than 30 years ago, defined by the absence of CD3 and the presence of CD56 on their surface. NK cells constitute approximately 10% to 15% of the total blood lymphocytes and are found in several tissues, including the bone marrow, spleen, liver, omentum, intestine, peritoneal cavity, placenta and lung (Gregoire et al. 2007; Caligiuri 2008). They can play a cytotoxic role against stressed, transformed or infected cells by integrating several signals transduced by various activating and inhibitory surface receptors without prior sensitization (Lanier 2005). In humans, activating receptors include NKp46, NKp30, NKp44 (collectively termed Natural Cytotoxicity receptors, NCR), NKG2D (Moretta et al. 2001), the leucocyte adhesion molecule DNAM-1 (CD226) (Shibuya et al. 1996), whereas NKp80 and 2B4 (CD244) (Moretta et al.

2001) are generally considered as co-receptors since their triggering function is dependent on the simultaneous engagement of major activating receptors. LFA-1 (a heterodimer of CD11a/CD18) is required for lysis by NK cells and is sufficient to induce activation signals in NK cells (Barber et al. 2004). The main pathway of NK-cell-mediated cytotoxicity is dependent on perforin and granzymes (Lieberman 2003); however, other mechanisms of target-cell lysis induction have been described, including the role of FAS-L (CD178) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-dependent receptors (Arase et al. 1995; Kashii et al. 1999).

NK cells are known to have immunoregulatory effects on immune cells, such as T cells, B cells, dendritic cells, monocytes and neutrophils through cell-cell contact and secretion of various soluble products (Blanca et al. 2001; Cooper et al. 2004; Dalbeth et al. 2004; Zingoni et al. 2004; Thoren et al. 2012). For example, they were shown to edit the immune response through induction of lysis or maturation of dendritic cells, a key cell in T lymphocyte polarization (Ferlazzo et al. 2002; Vitale et al. 2005). Few studies have evaluated the potential interactions between NK cells and eosinophils, and have provided contradictory results. NK cells were shown to up- or down-regulate allergic eosinophilic inflammation. In murine models of asthma, depletion of NK cells prior to allergen challenge, using anti-NK1.1 or anti-AsialoGM-1 antibodies decreased eosinophilia in bronchoalveolar lavage fluid (Korsgren et al. 1999; Ple et al. 2010). However depletion of NK cells after allergen challenge delayed clearance of airway eosinophils and antigen-specific CD4⁺T lymphocytes through NKG2D (Haworth et al. 2011). In humans, a positive correlation between the eosinophil percentage and NK cell number and activation was observed in peripheral blood from severe asthmatic patients (Barnig et al. 2013). Supernatants of NK cells from patients with allergic rhinitis were shown to induce *in vitro* recruitment of eosinophils through IL-8 (El-Shazly et al. 2011). In contrast, NK cells interacted with autologous eosinophils to promote their apoptosis (Barnig et al. 2013).

The current study was designed to characterize activating or inhibitory effects of NK cells on eosinophils *in vitro* and to investigate the molecular events involved in this scenario. We show that NK cells in co-culture with autologous eosinophils rapidly induce dose-dependent eosinophil degranulation and apoptosis whatever the allergic status of the subjects. Mechanisms involve cell-cell contact and soluble mediators. NK cell-induced eosinophil degranulation depends upon mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, whereas their apoptosis seems to involve mitochondrial ROS and caspase pathways.

Materials and methods

Ethic statement

The study was approved by the Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale de Lille (CP 04/45). All donors signed an informed consent form.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells and NK cell purification

Blood from adult donors was obtained either through the Etablissement français du Sang in Lille or from allergic or nonallergic volunteers. Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were separated from heparinized blood after removal of platelets and plasma (centrifugation 1000 rpm, 12 min, 18°C), dilution of blood in RPMI 1640 (Invitrogen, GIBCO) supplemented with Ticarpen (200 µg/ml) and centrifugation (1800 rpm, 25 min, 18°C) on Ficoll-PaqueTM plus (GE Healthcare, Bio-science AB). After washings in RPMI 1640 (centrifugation 2000 rpm, 10 min, 10°C), PBMC were counted on a Thoma Cell. NK cells were negatively selected as recommended by the manufacturer (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada V5Z 1B3), after incubation with an antibody cocktail for the depletion of cells expressing the following surface antigens: CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR, glycophorin A, for 10 min at room temperature. This step was followed by incubation for 5 min at room temperature with magnetic beads. NK cells were obtained after incubation for 2.5 min in easysep[®] magnet and counted on a Thoma Cell with trypan blue to assess their viability and were then resuspended at 1×10^6 living cells/ml in complete RPMI (RPMI + 10% Fetal Calf Serum (FCS) + 2mM glutamine + 200 µg/ml Ticarpen). The purity of NK cell fraction (CD3⁻ CD56⁺) was more than 95%, as assessed by flow cytometry (FACScalibur[®], Becton-Dickinson, California USA) using FITC-conjugated anti-CD3 and PE-conjugated anti-CD56 antibodies (Becton-Dickinson and Beckman Coulter, Fullerton, California).

Purification of Eosinophils

After the Ficoll step described above, red blood cells from pellets were lysed after two successive incubations (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, 0.1mM EDTA) of 15 and 10 min on ice. Eosinophils were negatively selected by magnetic separation as recommended by the supplier (StemCell Technologies). After 10 min incubation with a cocktail of antibodies for the depletion of cells expressing the following antigens: CD2, CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD36, CD56, CD123, glycophorin A, granulocytes were incubated for 10 min at room temperature with magnetic beads. Eosinophils were obtained after two successive incubations of 10 min in the Easysep[®] magnet. Living Eosinophils were counted on the Thoma Cell after trypan bleu exclusion and then resuspended at 1x10⁶ living cells/ml in complete RPMI. Purity of eosinophils checked on a slide stained with May-Grünwald Giemsa (Reagent RAL, Martillac, France) was always > 95%.

Co-culture of NK cells and Eosinophils

After purification, the two cell types were cultured in a 96 round bottom wells (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) at different ratio in complete RPMI in the presence of interleukin-5 (20 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) : NK cells alone, eosinophils alone and NK cells : eosinophils at the ratios 1:1; 5:1; 10:1. Cultures were performed for 3 or 12 hours as indicated in the figures.

Treatment of cells

To inhibit the cell contact, NK cells and eosinophils were co-cultured on both sides of Transwell[®] permeable supports 3µm (Corning Incorporated-Life Sciences). NK cells were also incubated for 1h30 in the presence of paraformaldehyde (PFA) 4% and then washed 3 times before incubation with eosinophils. To analyze the role of activating NK cell receptors and co-receptors or death receptors in the modulation of eosinophil function, NK cells were

preincubated with different antibodies: anti-FasL, anti-NKp46, anti-DNAM-1, anti-LFA-1, anti-CD30L mouse IgG1 control (BD PharmigenTM), anti-TRAIL, anti-NKG2D (R&D Systems), anti-NKp30 (Biolegend, San Diego, California, USA) and anti-2B4 (Immunotech, Marseille, France) antibodies. Eosinophils were also preincubated with anti-CD54 and anti-CD40 antibodies (Biolegend) or mouse IgG1 control antibody (BD PharmigenTM). The role of IFN- γ and TNF- α was studied after addition of neutralizing antibodies against each cytokine (R&D system and Biolegend, respectively) or the corresponding control antibodies. To evaluate perforin-mediated cytotoxicity, NK cells were preincubated with Concanamycin A (CMA) (Sigma-Aldrich) 50 nM for 2h followed by 3 washes before culture with eosinophils. Controls were performed using the corresponding quantities of DMSO used as diluent. To identify signaling pathways involved in their activation, eosinophils were preincubated for 5 min at 37C^o, in the presence or absence of inhibitors for P38MAPK, ERK, JNK and PI3K: SB 203580 1 μ M, PD 98059 25 μ M, SP 600125 20 μ M and LY 294002 10 μ M, respectively. NK cells were added to the culture without washes. To characterize apoptotic pathways, pan caspase inhibitor (ZVAD-FMK) 50 μ M (Calbiochem-Merck, Germany) or inhibitors of mitochondrial electron transport: rotenone 25 μ M and antimycin A 45 μ M (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were incubated with eosinophils for 30 min at 37C^o before co-culture with NK cells.

ECP and EDN measurements

ECP and EDN levels were measured in co-culture supernatants (Medical & Biological Laboratories CO, Japan). Briefly, supernatants or standards were incubated with anti-human ECP or EDN monoclonal antibody for 60 minutes at room temperature. After washings, peroxidase anti-human ECP or EDN polyclonal antibodies was added into the microwells and incubated for 60 minutes at room temperature. After washings, the peroxidase substrate was added for 10 minutes at room temperature. The optical density was read at 450 nm using a

microplate reader (Multiskan Ascent, Thermo electron Corporation, WI, USA). The sensitivity of ECP and EDN assays is 0.125ng/ml and 0.62ng/ml, respectively.

Measurement of apoptosis and vitality by flow cytometry

After 3 and 12 hours of co-culture, cells were centrifuged (1500 rpm, 5min, 4°C) and washed twice in sterile PBS and resuspended in Annexin V Binding Buffer. Annexin V-FITC/Propidium Iodide (PI) staining was performed using 5 µL/test of anti-Annexin V antibody and 5 µL/test of PI as recommended by the manufacturer (BD Pharmingen™, CA, USA). The analysis was performed on flow cytometer (FACScalibur® piloted by CellQuest Software, Becton-Dickinson). NK cells and eosinophils were identified on the basis of their size difference (FSC) and granularity (SSC) as shown in figure 1. Dead cells were defined as Annexin V⁺ cells, including Annexin V⁺ PI⁻ early apoptotic cells and Annexin V⁺ PI⁺ late apoptotic or dead cells, using FlowJo 7.6.5 software.

Measurement of reactive oxygen species (ROS) production by flow cytometry

Cells were resuspended at 1x10⁶/ml PBS and labeled with dihydroethidium (Hydroethidine, HE, 1µM) (Molecular Probes®, lifeTechnologies, Grand Island, NY,USA), a substance that is oxidized by ROS to become ethidium and to emit red fluorescence (Rothe et al. 1990). After 15 min incubation, cells were washed in PBS and analyzed on flow cytometer (FACScalibur®).

Detection of cell surface markers and intracellular ERK and phosphorylated-ERK (pERK) by flow cytometry

After 3 or 12 hours of co-culture, cells were recovered, centrifuged and resuspended with PBS-SVF 2% for staining of cell surface markers. Cells were incubated at 4°C for 30 min in a V-bottom plate (100 µL/well) (Costar, Corning Incorporated) with antigen specific mouse monoclonal antibodies coupled to a fluochrome or with the corresponding control antibody: anti-CD69-FITC and anti-CD62L-APC (BD Pharmingen™) to evaluate activation and anti-

CD63-FITC and anti-CD107a-FITC to measure degranulation for eosinophils and NK cells respectively (BD Pharmingen™). The expression of the different markers was analyzed on live cells defined as AnnexinV⁻-PE 7-aminoactinomycin D (7AAD)⁻ (BD Pharmingen™). After two washes with PBS-SVF2%, cells were resuspended for reading on flow cytometer (FACScalibur®). The results were expressed as the percentage of labeled living cells after subtraction of the percentage obtained with the corresponding control antibody.

For ERK and pERK identification, cells were recovered after 3 hours of co-culture and stained with AnnexinV antibody (BD Pharmingen). After fixation with 4% paraformaldehyde (PFA) and permeabilization with 90% methanol, cells were stained with anti-ERK, anti-pERK or the appropriate control antibody according to the manufacturer protocol (Cell Signaling Technology, MA, USA). Staining was evaluated on AnnexinV⁻ cells using flow cytometer (FACScalibur®).

Statistical analysis

When appropriate, D'Agostino and Pearson normality test was performed and values were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons were performed with the Wilcoxon test or the one- or two-way ANOVA tests followed by Bonferroni, Tukey, Dunn or Sidak post tests using the software Graph Pad Prism 6 (Graph Pad software, USA) as mentioned in figure legends. The results were considered significant for $p < 0.05$.

Results

NK cells induce eosinophil activation and degranulation

The effect of human NK cells on eosinophil activation was analyzed *in vitro* after purification of both cell types from fresh blood of the same donor. Because cytokine priming occurs *in vivo* in a variety of allergic, parasitic and other hypereosinophilic disorders (Rothenberg et al. 2006), and because eosinophils die rapidly without survival factors, cultures were performed in the presence of IL-5. Eosinophil activation was evaluated after 3 and 12h at different ratios of NK cells:eosinophils (0:1, 1:1, 5:1 and 10:1) by the measurement of cell surface expression of CD62L and the early activation marker CD69 (figure 1C-D). In order to evaluate if eosinophil degranulation comes along with activation, CD63 surface expression (Mahmudi-Azer et al. 2002) was measured after 3 hours of co-culture. Live eosinophils were defined as annexin V⁻7AAD⁻ cells with high side scatter parameter (figure 1A). Results showed that eosinophils co-cultured with autologous NK cells significantly and dose-dependently decreased CD62L (figure 1C) and increased CD69 (figure 1D) expression at 3 and 12h, which is consistent with eosinophil activation. Similarly, eosinophils expressed higher CD63 surface expression when co-cultured with increasing numbers of NK cells (figure 1B), suggesting degranulation. Eosinophil degranulation was confirmed by the detection of ECP (figure 2A) and EDN (figure 2B) in co-culture supernatants, detectable both at 3 and 12 hours. No ECP/EDN levels were detected in supernatant culture of NK cells alone. ECP and EDN release increased with quantities of NK cells and time.

NK cells induce eosinophil apoptosis

We evaluated whether resting NK cells were also able to modify eosinophil apoptosis in the same culture conditions. Eosinophil apoptosis was detected by annexin V and propidium iodide (PI) staining after 3 and 12h incubation with different ratios of NK cells. The culture with NK cells significantly and dose dependently increased eosinophil apoptosis at 3 and 12 hours

(figure 3). Eosinophil apoptosis also increased with time. Because delayed eosinophil apoptosis has been observed in several eosinophil-associated diseases including allergic asthma and rhinitis (Wedi et al. 1997), we compared the effect of NK cells on the apoptosis of autologous eosinophil from allergic (asthma or rhinitis) and non allergic donors. Eosinophils were similarly sensitive to NK cells whatever the allergic status, and no significant difference except the apoptosis levels of eosinophils alone was observed (data not shown). Finally eosinophils did not modify NK cell apoptosis (data not shown).

Cellular interaction and soluble mediators are involved in NK cell-induced eosinophil degranulation and apoptosis

To analyze if cell contacts or soluble mediators were involved in eosinophil activation, degranulation and apoptosis, eosinophils were cultured alone or with NK cells (10:1 ratio), either separated by a permeable membrane (Transwell[®]) or fixed with paraformaldehyde (PFA), respectively. The presence of a Transwell[®] membrane between cells completely abrogated the increased surface expression of CD63 on eosinophils compared to direct contact, suggesting the involvement of surface molecule interactions (Figure 4A). Similarly, NK cells separated from eosinophils by the membrane did not modify the apoptosis of eosinophils after a co-culture of 3h (Figure 4C) or 12h (data not shown), suggesting that a direct contact is necessary to induce eosinophil apoptosis. We tested the involvement of adhesion molecules (DNAM-1, LFA-1 and CD54), NK cell cytotoxic activating receptors (NKP30, NKP46, NKG2D), co-receptor (2B4), members of the TNF family ligands (FasL, TRAIL, CD40L) or membrane TNF- α by the use of blocking antibodies in co-culture experiments. None of the neutralizing antibody impaired CD63 increased expression and apoptosis induced by NK cells (data not shown), suggesting the involvement of molecules different from the ones classically implicated in the interaction of NK cells with their target cells.

In order to avoid the participation of soluble mediators produced by NK cells (such as perforins, granzymes, IFN- γ and TNF- α) on eosinophil degranulation and apoptosis, NK cells were fixed with paraformaldehyde (PFA) prior to co-culture. Indeed, human peripheral blood NK cells fixed with PFA were previously shown to retain cytotoxic properties attributable to the constitutive expression on their surface of cytotoxic molecules like FasL or membrane TNF- α (Vujanovic et al. 1996), suggesting that NK cell surface molecules remain functional. Fixation of NK cells significantly decreased the percentage of CD63 positive eosinophils (Figure 4B), suggesting that soluble factors may be involved. To analyze the role of IFN- γ , co-cultures were performed in the presence of neutralizing antibodies. No modifications in the percentage of CD63 positive eosinophils were seen (data not shown), suggesting that IFN- γ is not implicated in NK cell-induced eosinophil degranulation. Similarly, NK cell fixation significantly decreased eosinophil apoptosis (Figure 4D), suggesting the involvement of soluble factors in this function. However, concanamycin A, which inhibits perforin-based cytotoxic activity (Kataoka et al. 1996), did not inhibit eosinophil apoptosis after 3h and 12h of co-culture (data not shown). We also observed that NK cell in co-culture with eosinophils did not modify their CD107a surface expression (data not shown), a marker of NK cell degranulation (Alter et al. 2004). These results suggest that NK did not induce eosinophil apoptosis through natural cytotoxicity.

MAP kinases participate in eosinophil degranulation induced by NK cells

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (including extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun Nterminal kinase (JNK), and p38 MAPK) as well as the Akt cascade involving the production of phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates (PtdIns(3,4,5)P₃) by phosphoinositide 3-kinase (PI3K) have been shown to play a role in eosinophil degranulation induced by various stimuli (Adachi et al. 2000; Carlson et al. 2011). Eosinophils in co-culture with NK cells exhibited increased phosphorylated ERK (pERK) compared to

eosinophils alone (figure 5A). Similarly, NK cells from the co-culture increased their expression of pERK compared to NK cells alone (figure 5B), suggesting that NK cells are activated in the presence of eosinophils. To study the importance of MAP kinases and PI3K pathways in NK cell-induced eosinophil degranulation, we added SB202190 (a p38 inhibitor), PD98059 (a MAP/ERK kinase inhibitor), SP600125 (an inhibitor of the three JNK enzymes) or LY294002 (a PI3K inhibitor) to co-cultures of NK cells and eosinophils. Corresponding quantities of DMSO were used for control conditions. ERK and JNK inhibitors significantly decreased the percentage of CD63 positive eosinophils (figure 5C), suggesting that these pathways are, at least partly, involved in NK cell-induced eosinophil degranulation. No significant effect was measured on NK cell-induced eosinophil apoptosis. Moreover, none of the inhibitors decreased spontaneous eosinophil degranulation and apoptosis (data not shown).

Depletion of the mitochondrial respiratory chain prevents NK cell-induced eosinophil apoptosis

We followed superoxide production in eosinophils by staining with the superoxide sensitive probe dihydroethidium (HE). NK cells dose-dependently increased the percentage of HE-positive eosinophils (figure 6A), suggesting that eosinophils generated higher levels of reactive oxygen species (ROS) following co-culture with NK cells. Rotenone suppresses the release of superoxide from mitochondria by binding to the ubiquinol binding site in respiratory complex I, thereby blocking the flow of electrons from complex I to complex III (Goodwin et al. 2010), whereas antimycin prevents electron flow in the mitochondrial respiratory chain, acting on complex III (Chen et al. 2003a). Optimal non toxic inhibitory concentration of rotenone and antimycin were first determined on eosinophils at 25 μ M and 45 μ M, respectively (data not shown). Both mitochondrial inhibitors partially but significantly blocked NK cell-induced eosinophil apoptosis (figure 6B), suggesting the involvement of mitochondrial ROS. Rotenone

also significantly decreased spontaneous apoptosis of eosinophils cultured in the presence of IL-5 only (data not shown).

To evaluate if caspase activation may signal for NK cell-induced eosinophil apoptosis, co-cultures were performed in the presence of general caspase inhibitor (ZVAD-FMK). ZVAD-FMK slightly but significantly (Wilcoxon test, $p < 0.05$) decreased the apoptosis of eosinophils in co-culture with NK cells at the ratio 10:1 (median for ZVAD: 63.45%; interquartile range: 54.18%, 76.10%; median for control: 70%; interquartile range: 59.63%, 78.70%), but not for eosinophils alone. This result implicates a minor role of caspases.

Discussion

In this study, we showed that resting NK cells induce dose-dependent *in vitro* activation of autologous eosinophils after 3 and 12 hours of co-culture. Activated eosinophils degranulated as showed by the increased surface expression of CD63 on live eosinophils and ECP and EDN release in culture supernatants. CD63 has been involved in eosinophil activation and piecemeal degranulation of eosinophils (Mahmudi-Azer et al. 2002). Activation and cytotoxic protein release increased with time. When separated from NK cells by a permeable filter, eosinophils did not degranulate anymore, suggesting the need for cell interactions. None of the cell surface molecule tested was found to be involved. In particular, NKp30 which plays a key role in NK cell interactions with dendritic cell (Ferlazzo et al. 2002; Vitale et al. 2005), was not implicated. Neutralization of other activating receptors like NKp46 and NKG2D failed to inhibit NK cell-induced eosinophil activation. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation (Sivori et al. 2000). Its ligand CD48 is widely expressed by hematopoietic cells, and more particularly by eosinophils. Cross-linking CD48 on human eosinophils was demonstrated to trigger release of eosinophil granule proteins (Munitz et al. 2006). However 2B4/CD48 interaction was not involved in NK cell-induced eosinophil degranulation. Finally, co-cultures were performed in the presence of anti-DNAM-1 antibody. DNAM-1 is expressed by NK cell and interacts with CD112, expressed by eosinophils and involved in eosinophil activation (Pende et al. 2005; Bachelet et al. 2006). Anti-DNAM-1 antibody did not inhibit the expression of CD63 on eosinophils. We then co-cultured eosinophils with fixed NK cells to allow cellular interactions while blocking the release of soluble mediators. Eosinophils did not degranulate in this experimental setting, suggesting the involvement of soluble mediators. IFN- γ , which induce eosinophil degranulation (Mahmudi-Azer et al. 2002) did not play a role in NK cell-induced degranulation. Because NK cells may produce high mobility group B1 (HMGB1) (Semino et al. 2005), and HMGB1 induces eosinophil degranulation (MBP and EPO release)

(Lotfi et al. 2009), we tested the neutralization of HMGB1 in NK cell/eosinophil co-culture and found no effect.

We then investigated the signaling pathway involved in NK cell-induced eosinophil degranulation. Inhibitors for ERK1/2 and JNK pathways added to the co-cultures significantly decreased eosinophil degranulation assessed by CD63 surface expression, suggesting their involvement in NK cell-induced eosinophil degranulation. ERK1/2, p38 MAPK, PI3K were shown to play a role in eosinophil degranulation induced by various stimuli (Adachi et al. 2000; Carlson et al. 2011), but are also implicated in NK functions (cytokine production or cytotoxicity) (Trotta et al. 2000; Li et al. 2008a; Kumar et al. 2009; Gumbleton et al. 2013). pERK was increased in NK cells cocultured with eosinophils. Therefore, we cannot separate the inhibitory action of SB202190, PD98059, SP600125 and LY294002 on eosinophils from the effect on NK cells.

In parallel, we showed that resting NK cells in co-culture with eosinophils induced their apoptosis, with no differences in apoptotic rates in allergic versus non allergic donors. This is in accordance with previously published results, where only NK cells from severe asthmatics display lower NK cell-induced apoptosis, whereas NK cells from mild asthmatics and healthy subjects had similar levels of apoptosis (Barnig et al. 2013). Kinetic experiments revealed that increased eosinophil apoptosis was detected as early as one minute after co-culture, and paralleled activation/degranulation of live eosinophils (data not shown). This observation suggests that eosinophil apoptosis is directly induced by NK cells and is not naturally occurring as a consequence of eosinophil activation. This is also suggested by the absence of inhibitory effects of MAPK and PI3K inhibitors on eosinophil apoptosis, while they decreased eosinophil degranulation in the presence of NK cells (data not shown).

In the current study, NK cell-induced eosinophil apoptosis was shown to be dependent upon contact by the transwell experiment and on soluble mediators. This is concordant with the

formation of the NK-cell immunological synapse, which begins with contact with a target cell and culminates either in the directed delivery of lytic granule contents to lyse the target cell (Orange 2008), or in the release of soluble mediators to activate immune cells (Semino et al. 2007). However, we found none of the cytotoxic receptor (NKp30, NKp46, and NKG2D) or coreceptor (2B4) or adhesion molecule (DNAM-1, LFA-1, and ICAM-1) to be involved. This is concordant with the absence of apoptosis inhibition observed using concanamycin, an inhibitor of perforin-induced degranulation. Similarly to the Barnig et al study (Barnig et al. 2013), we did not evidence the expression of CD107a and CD107b, indicative of NK cell degranulation (Alter et al. 2004). FAS-L, TRAIL and membrane TNF- α were not implicated either, as showed by neutralizing antibodies treatment. Our results suggest that eosinophil apoptosis is not induced by NK cell classical cytotoxic functions, in contrast to dendritic cells and neutrophil apoptosis (Ferlazzo et al. 2002; Thoren et al. 2012). NK cells induced increased ROS detection in eosinophils, while mitochondrial inhibitors partially inhibited NK cell-induced eosinophil apoptosis. The conjunction of both results suggests the involvement of mitochondrial ROS in NK cell-induced eosinophil apoptosis. Eosinophil apoptosis may be dependent or independent of caspases, depending on the stimuli. For example, Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils is caspase independent but involves reactive oxygen species and MEK/ERK activation (Kano et al. 2013). In our experiments, a pan-caspase inhibitor only slightly decreased eosinophil apoptosis, suggesting that the apoptosis pathway is mainly caspase independent.

Interestingly, our results showed that resting NK cells *in vitro* modulate eosinophil activation and apoptosis, with no need for other stimuli. Eosinophils may have stimulated NK cells like dendritic cells do (Piccioli et al. 2002). We did not evidence NK cell activation by CD62L and CD69 staining (data not shown) but increased percentage of NK cells expressed pERK when co-cultured with eosinophils. Resting NK cells were previously shown to trigger apoptosis of both eosinophils and neutrophils (Barnig et al. 2013). Nevertheless, most studies co-cultured

activated NK cells with hematopoietic cells. For example, short-term IL-12-activated NK cells induced significant apoptosis in neutrophils (Thoren et al. 2012), whereas NK cells activated with IL-2, IL-15, IL-21, IL-12, or IL-18 during the co-culture decreased their apoptosis (Bhatnagar et al. 2010). Also, supernatants of IL-15-activated NK cells recruited eosinophils (El-Shazly et al. 2011). We suspect a crosstalk between NK cells and eosinophils, leading to NK cell activation sufficient for eosinophil activation and/or apoptosis.

Our *in vitro* results are in agreement with studies in murine models of asthma. Indeed, NK cell-induced eosinophil degranulation may participate to allergic eosinophilia. Depletion of NK cells prior to allergen challenge, using anti NK1.1 or anti-AsialoGM-1 antibodies decreased eosinophilia in bronchoalveolar lavage (Korsgren et al. 1999; Ple et al. 2010). In parallel, we showed that NK cells induced eosinophil apoptosis after co-culture. This correlates with delayed clearance of airway eosinophils after depletion of NK cells with anti-AsialoGM-1 antibodies performed after allergen challenge (Haworth et al. 2011). Therefore, time of depletion may reveal different functions of NK cells: they may up- and down-regulate eosinophilic inflammation by activating eosinophils or inducing their apoptosis, respectively.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM, UCB Institute of Allergy and Société Française d'Allergologie. AA was supported by a grant from Ministère de l'Éducation et de la Recherche. MB was supported by Région Nord-pas-de Calais and Agence Nationale de la Recherche SEST. We thank Dr Emeric Deruy of the BICeL facility for access to systems and technical advice, and Dr Corine Glineur for critically reviewing the manuscript.

Legends

Figure 1: Activation of Eosinophils by NK cells. Autologous NK cells and eosinophils were cultured at the ratio NK cells: eosinophils (NK: Eos ratio) 0:1, 1:1, 5:1 and 10:1 in the presence of interleukin-5 for 3 hours and 12 hours. (A) Gating strategy: live eosinophils were identified firstly on the basis of their size difference (FSC) and granularity (SSC) and secondly as Annexin V⁻ 7AAD⁻ cells. CD63 expression (black histogram) is shown on a representative experiment for the ratio NK cells: eosinophils (NK: Eos ratio) 0:1 and 10:1. Isotypic control antibody is represented in dashed grey. Eosinophils were stained for CD63 (B), CD62L (C) and CD69 (D) expression. Results are shown for each donor and mean is indicated with the black line. One-way Anova (Friedman) tests were performed, followed by Dunn's post tests. *p<0.05; ***p<0.001.

Figure 2: NK cells induce eosinophil release of ECP and EDN. Levels of eosinophil cationic protein (ECP) (A) and eosinophil derived neurotoxin (EDN) (B) were measured in co-culture supernatants after 3 and 12 hours for the NK:Eos ratios 1:0, 0:1; 1:1; 5:1; 10:1. Results are expressed as molecule quantity in ng/ml for 2×10^5 cells for each donor and mean is indicated with the black line. One-way Anova (Friedman) tests were performed, followed by Dunn's post tests. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 3: NK cells induce eosinophil apoptosis. After purification, NK cells and eosinophils were cultured in the presence of IL-5 for 3 and 12h at different NK:Eos ratios: 0:1; 1:1; 5:1; 10:1. Eosinophils were identified on the basis of their size difference (FSC) and granularity (SSC). Apoptosis and death of eosinophils was evaluated by Annexin/PI labeling. Dead eosinophils were defined as AnnexinV⁺ cells. Results are expressed as mean percentage of AnnexinV⁺ cells amongst the eosinophil population \pm SEM. n=16 (3 hours) or 18 (12 hours). Gaussian distributions were verified using D'Agostino and Pearson test, and One-way Anova tests were performed, followed by Bonferroni's post tests. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 4: Eosinophil degranulation and apoptosis are both abrogated after PFA-induced fixation of NK cells and separation of cell types by transwell. After purification, NK cells and eosinophils were cultured in the presence of IL-5 for 3 hours at the NK:Eos ratios: 0:1 and 10:1. (A) Percentage of CD63 positive eosinophils cultured alone, with live NK cells or with PFA-fixed NK cells for the 10:1 NK:Eos ratio. (B) Percentage of CD63 positive eosinophils cultured with NK cells at the 0:1 or 10:1 NK:Eos ratios in the same culture well (direct contact) or in Transwell[®] (separated with 3µm filter). (C) Percentage of AnnexinV⁺ eosinophils cultured alone, with live NK cells or with PFA-fixed NK cells for the 10:1 NK:Eos ratio. (D) Percentage of AnnexinV⁺ eosinophils cultured with NK cells at the 0:1 or 10:1 NK:Eos ratios in the same culture well (direct contact) or in Transwell[®] (separated with 3µm filter). Results are shown for each donor and mean is indicated with the black line. One-way Anova (Friedman) tests were performed, followed by Dunn's post tests. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

Figure 5: ERK and JNK pathways are involved in eosinophil degranulation. AnnexinV⁻ eosinophils (A) and NK cells (B), cultured alone or together at the 10:1 NK:Eos ratio, were stained with anti-ERK or anti-phosphorylated ERK (pERK) antibodies. Eosinophils and NK cells were identified on the basis of their size difference (FSC) and granularity (SSC). Live eosinophils were defined as AnnexinV⁻ cells. Gray full lines and black dotted lines represent control antibody staining for each cell type alone or in co-culture, respectively. Gray plain histograms and black full lines represent staining with antibody of interest for each cell type alone or in co-culture, respectively. One representative experiment out of three is shown. (C) Eosinophils were pre-incubated with DMSO as control or with inhibitors of signaling pathways for 5 min at 37C°: PD 98059 25µM an inhibitor of ERK pathway, SB 203580 1µM an inhibitor of P38 MAPK, SP 600125 20µM an inhibitor of JNK pathway and LY 294002 10µM an inhibitor of PI3K pathway for the NK:Eos ratio 10:1. Results show percentage of CD63⁺

eosinophils for each donor and mean is indicated with the black line. One-way Anova (Friedman) tests were performed, followed by Dunn's post tests. * $p < 0.05$.

Figure 6. NK cell-induced eosinophil apoptosis involves mitochondrial reactive oxygen species (ROS). (A) After purification, NK cells and eosinophils were cultured in the presence of IL-5 for 12 hours at different NK:Eos ratios: 0:1; 1:1; 5:1; 10:1. Eosinophils were identified on the basis of their size difference (FSC) and granularity (SSC). ROS staining was achieved using dihydroethidium (HE). Results are expressed as mean percentage of HE⁺ cells amongst the eosinophil population \pm SEM. $n=12$. Gaussian distributions were verified using D'Agostino and Pearson test, and One-way Anova test was performed, followed by Bonferroni's post test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. (B) Eosinophils were incubated with inhibitors of mitochondrial electron transport: rotenone and antimycin for 30 min at 37°C before 12h co-culture with NK cells at the NK:Eos ratio of 10:1. Results for each donor are shown and mean is indicated with the black line. Wilcoxon tests were performed. * $p < 0.05$.

References

1. Sanderson CJ (1992) Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79: 3101-3109.
2. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, et al. (2008) Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38: 709-750.
3. Gleich GJ, Adolphson CR (1986) The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 39: 177-253.
4. Mahmudi-Azer S, Downey GP, Moqbel R (2002) Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release. *Blood* 99: 4039-4047.
5. Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112: 461-469.
6. Gregoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, et al. (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220: 169-182.
7. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-274.
8. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, et al. (2001) Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19: 197-223.
9. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, et al. (1996) DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4: 573-581.
10. Barber DF, Faure M, Long EO (2004) LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 173: 3653-3659.
11. Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3: 361-370.
12. Arase H, Arase N, Saito T (1995) Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 181: 1235-1238.

13. Kashii Y, Giorda R, Herberman RB, Whiteside TL, Vujanovic NL (1999) Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. *J Immunol* 163: 5358-5366.
14. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, et al. (2004) Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173: 3716-3724.
15. Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR (2001) Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J Immunol* 167: 6132-6139.
16. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA (2004) NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 25: 47-52.
17. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJ, Lee YC, McMichael AJ, et al. (2004) CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173: 6418-6426.
18. Thoren FB, Riise RE, Ousback J, Della Chiesa M, Alsterholm M, et al. (2012) Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J Immunol* 188: 1668-1674.
19. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, et al. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195: 343-351.
20. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, et al. (2005) NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106: 566-571.
21. Korsgren M, Persson CG, Sundler F, Bjerke T, Hansson T, et al. (1999) Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 189: 553-562.

22. Ple C, Barrier M, Amniai L, Marquillies P, Bertout J, et al. (2010) Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma. *Scand J Immunol* 72: 118-127.
23. Haworth O, Cernadas M, Levy BD (2011) NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation. *J Immunol* 186: 6129-6135.
24. Barnig C, Cernadas M, Dutile S, Liu X, Perrella MA, et al. (2013) Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. *Sci Transl Med* 5: 174ra126.
25. El-Shazly AE, Lefebvre PP (2011) Modulation of NK cell autocrine-induced eosinophil chemotaxis by interleukin-15 and vitamin D(3): a possible NK-eosinophil crosstalk via IL-8 in the pathophysiology of allergic rhinitis. *Mediators Inflamm* 2011: 373589.
26. Rothe G, Valet G (1990) Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J Leukoc Biol* 47: 440-448.
27. Rothenberg ME, Hogan SP (2006) The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24: 147-174.
28. Wedi B, Raap U, Lewrick H, Kapp A (1997) Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 100: 536-543.
29. Vujanovic NL, Nagashima S, Herberman RB, Whiteside TL (1996) Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol* 157: 1117-1126.
30. Kataoka T, Shinohara N, Takayama H, Takaku K, Kondo S, et al. (1996) Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 156: 3678-3686.
31. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294: 15-22.
32. Carlson M, Venge P, Lampinen M (2011) C3b-induced eosinophil degranulation involves PI3-kinases and is inhibited by protein kinase C activity. *Apmis* 119: 119-126.

33. Adachi T, Choudhury BK, Stafford S, Sur S, Alam R (2000) The differential role of extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase in eosinophil functions. *J Immunol* 165: 2198-2204.
34. Goodwin W, McCabe D, Sauter E, Reese E, Walter M, et al. (2010) Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death. *J Orthop Res* 28: 1057-1063.
35. Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278: 36027-36031.
36. Sivori S, Parolini S, Falco M, Marcenaro E, Biassoni R, et al. (2000) 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 30: 787-793.
37. Munitz A, Bachelet I, Eliashar R, Khodoun M, Finkelman FD, et al. (2006) CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils. *J Immunol* 177: 77-83.
38. Bachelet I, Munitz A, Mankutad D, Levi-Schaffer F (2006) Mast cell costimulation by CD226/CD112 (DNAM-1/Nectin-2): a novel interface in the allergic process. *J Biol Chem* 281: 27190-27196.
39. Pende D, Bottino C, Castriconi R, Cantoni C, Marcenaro S, et al. (2005) PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol* 42: 463-469.
40. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A (2005) NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106: 609-616.
41. Lotfi R, Herzog GI, DeMarco RA, Beer-Stolz D, Lee JJ, et al. (2009) Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells. *J Immunol* 183: 5023-5031.

42. Kumar D, Hosse J, von Toerne C, Noessner E, Nelson PJ (2009) JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1. *J Immunol* 182: 1011-1020.
43. Li C, Ge B, Nicotra M, Stern JN, Kopcow HD, et al. (2008) JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 3017-3022.
44. Trotta R, Fettucciari K, Azzoni L, Abebe B, Puorro KA, et al. (2000) Differential role of p38 and c-Jun N-terminal kinase 1 mitogen-activated protein kinases in NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 165: 1782-1789.
45. Gumbleton M, Kerr WG (2013) Role of inositol phospholipid signaling in natural killer cell biology. *Front Immunol* 4: 47.
46. Orange JS (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8: 713-725.
47. Semino C, Ceccarelli J, Lotti LV, Torrisi MR, Angelini G, et al. (2007) The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 81: 92-99.
48. Kano G, Almanan M, Bochner BS, Zimmermann N (2013) Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation. *J Allergy Clin Immunol* 132: 437-445.
49. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM (2002) Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195: 335-341.
50. Bhatnagar N, Hong HS, Krishnaswamy JK, Haghikia A, Behrens GM, et al. (2010) Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity. *Blood* 116: 1308-1316.

Figures

Figure 1:

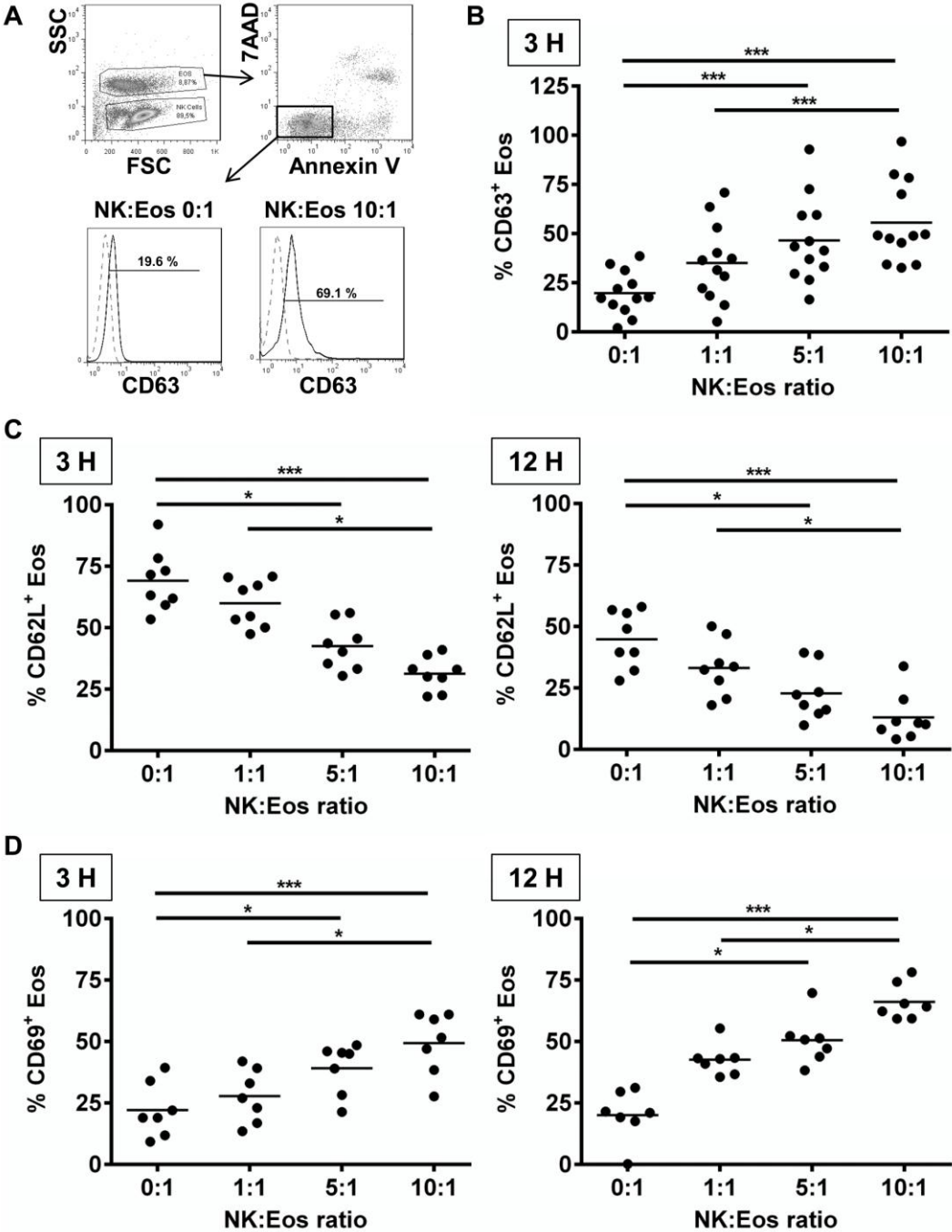


Figure 2:

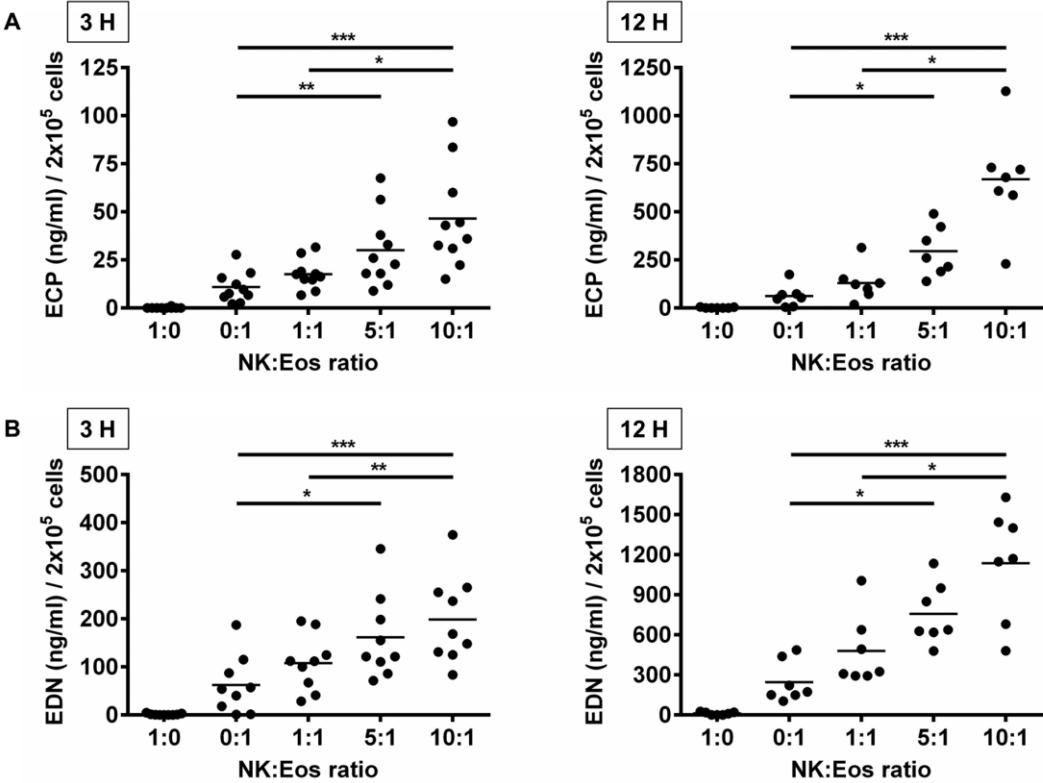


Figure 3:

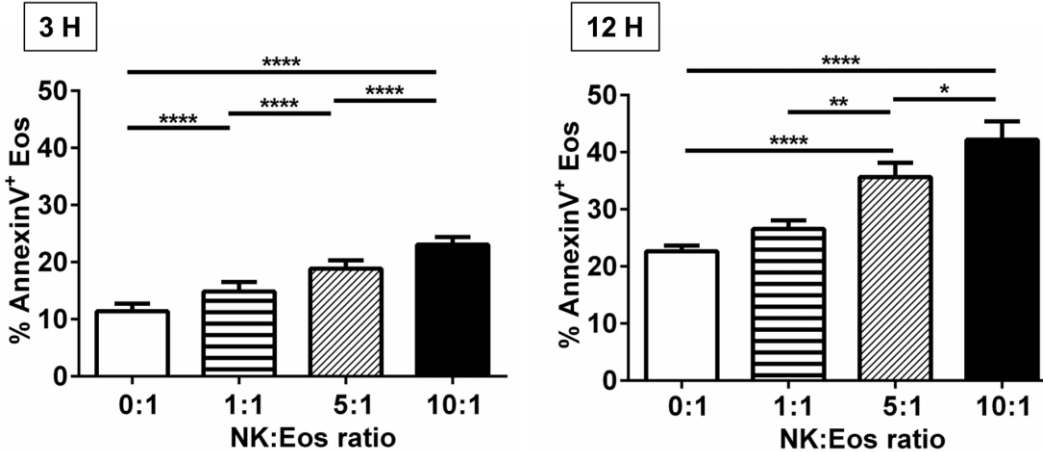


Figure 4:

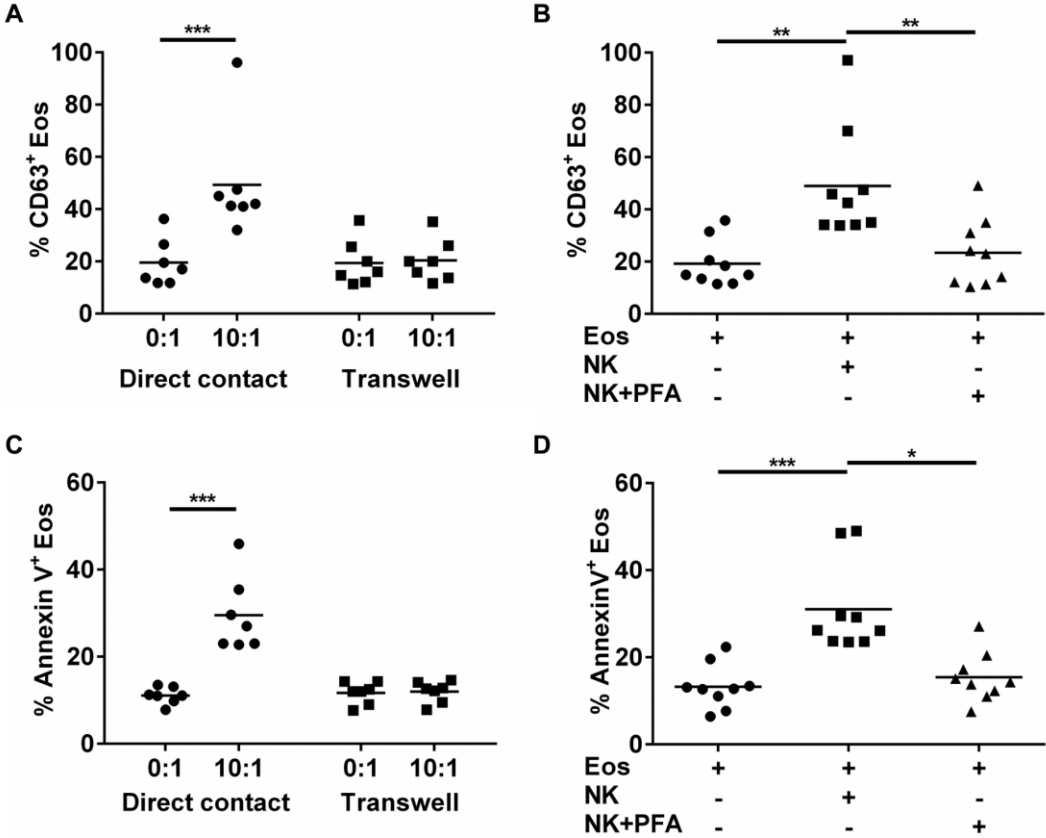


Figure 5:

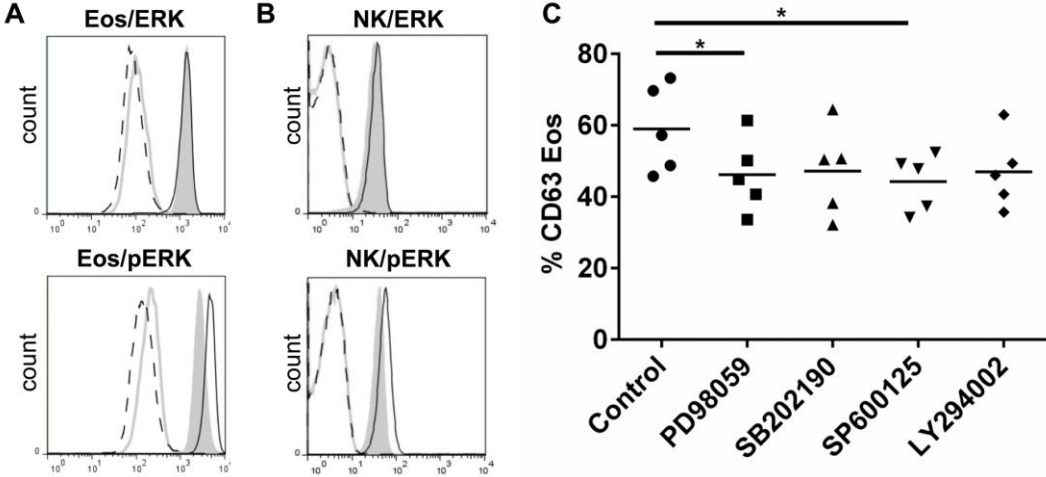
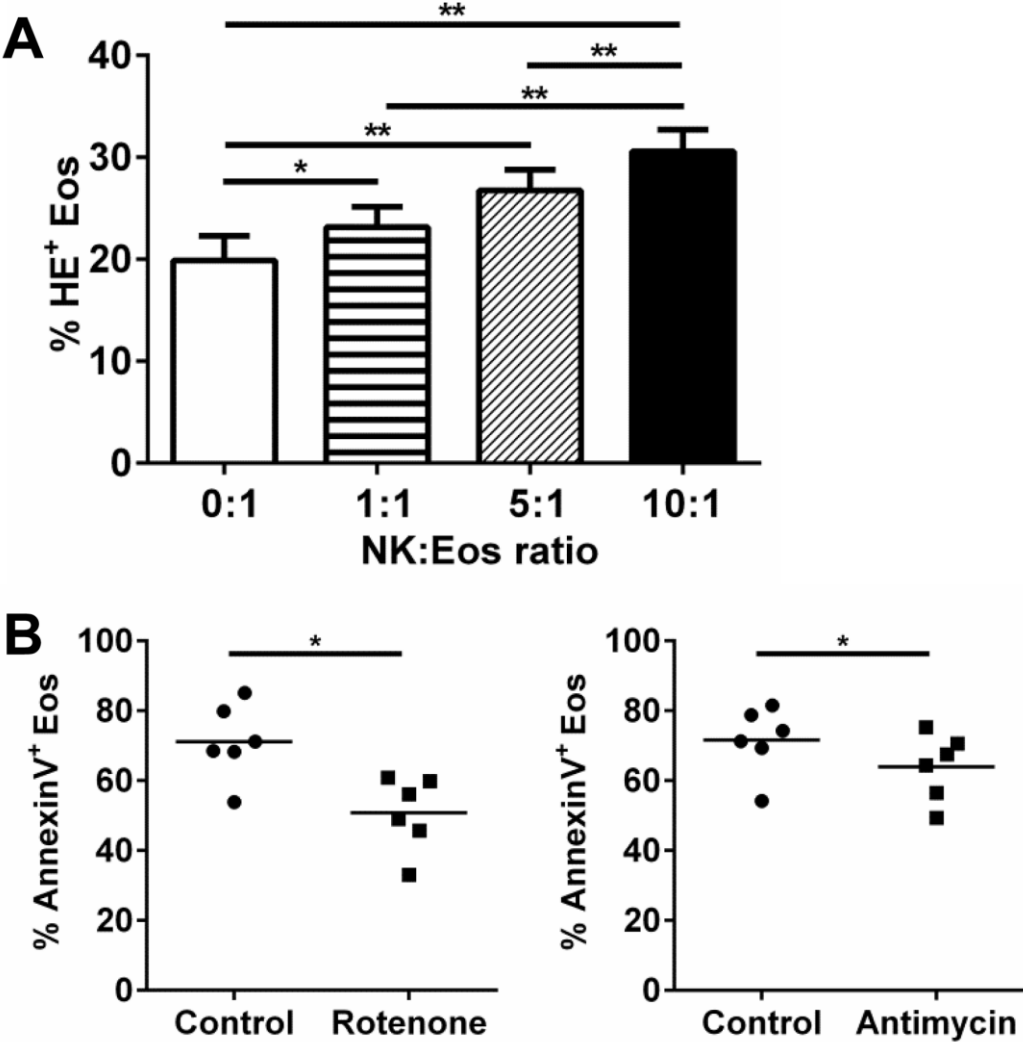


Figure 6:



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le but de mon travail de thèse était d'étudier le rôle potentiel des cellules NK dans la réaction inflammatoire allergique pulmonaire. Nous nous sommes intéressés à deux aspects, d'une part la réponse des cellules NK à la chimiokine CCL18 impliquée dans l'asthme allergique et d'autre part l'interaction entre les NK et les éosinophiles impliqués dans l'inflammation allergique.

Réponse des cellules NK à la chimiokine CCL18

Dans la première partie de mon travail de thèse, nous avons analysé la réponse des cellules NK vis-à-vis de la chimiokine CCL18 chez des patients allergiques et des sujets sains. Nous avons montré pour la première fois que CCL18 est capable de se fixer à la surface des cellules NK quelque soit le statut du donneur, mais seules les cellules NK de sujets sains sont capables de répondre à la chimiokine. Ensuite, nous avons montré, via l'inhibition par la toxine pertussique, que les cellules NK des sujets sains sont capables de répondre au CCL18 d'une façon dépendante de la protéine G, ce qui est en accord avec les études précédentes qui montrent que le récepteur de CCL18 est couplé à la protéine G α i (Lindhout et al. 2001; Atamas et al. 2003). De plus, nous avons montré chez les sujets sains, que CCL18 induisait l'activité cytotoxique des cellules NK non préalablement stimulées.

Cet effet différent entre les patients allergiques et les donneurs sains a déjà été observé sur d'autres types cellulaires notamment sur les cellules dendritiques où CCL18 induit une réponse tolérogène uniquement chez les sujets non allergiques (Azzaoui et al. 2011). L'absence de réponse observée chez les patients allergiques pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression du récepteur. En effet, les taux sériques de CCL18 chez les patients allergiques sont plus élevés que chez les sujets sains (de Nadai et al. 2006) ce qui pourrait entraîner l'internalisation du récepteur par désensibilisation. Cependant, la mise en culture des cellules NK pendant 24h à 48h, qui favorise la réexpression du récepteur en surface, ne permet pas la migration et l'activation des cellules NK des patients allergiques. Ceci suggère que le défaut de réponse n'est pas dû à une internalisation du récepteur, ce qui est conforté par les expériences de liaison du CCL18-biotinylé sur les cellules NK, où aucune différence n'est observée selon le statut du donneur.

Les différences observées au niveau de la migration et la cytotoxicité pourraient être expliquées par une mutation du récepteur de CCL18 induisant un défaut de transduction du signal mais pas de liaison, comme il a été déjà montré pour le CXCR2 récepteur du CXCL8

(Limatola et al. 2005). Une autre explication pourrait être suggérée par une publication récente montrant une majeure interaction entre le CCL18 et les glycosaminoglycanes (GAGs). Cependant, si un CCL18 muté est incapable de se fixer sur les GAGs, il est encore apte à induire une réponse chimiotactique (Krohn et al. 2013b), ce qui suggère l'existence d'un autre récepteur fonctionnel permettant la chimiotaxie vis-à-vis de CCL18. Tout récemment, il a été montré que CCL18 se fixe sur le CCR8 (Islam et al. 2013). Cependant, le CCR8 est indétectable à la surface des cellules NK fraîchement isolées (Ebert et al. 2006) ou restreint à 0.7% des cellules NK CD56^{bright} (Soler et al. 2006), ce qui suggère qu'un récepteur différent pourrait être impliqué dans la chimiotaxie des cellules NK induite par CCL18.

Au vu de l'ensemble de nos résultats, nous émettons l'hypothèse d'une déficience du crosstalk entre les cellules NK et les cellules dendritiques (cellule fortement productrice de CCL18) chez les patients allergiques, aboutissant ainsi à une perte de la fonction des cellules NK.

Le dysfonctionnement des cellules NK chez les patients allergiques a été montré dans d'autres cas. Les cellules NK qui interagissent avec les cellules dendritiques ont la capacité de favoriser une polarisation de type Th1. Chez le sujet allergique, cette interaction est perturbée favorisant ainsi une polarisation de type Th2 (Scordamaglia et al. 2008). Les patients atteints d'une rhinite allergique ou un asthme intermittent, présentent une diminution du pourcentage des cellules NK CD56^{High} (sous population fortement productrice d'IFN- γ), entraînant une diminution de la production d'IFN- γ , favorisant ainsi un profil plutôt Th2 que Th1. De plus, les cellules NK de ces patients sont moins efficaces dans l'induction de la maturation et/ou la mort des cellules dendritiques immatures (Scordamaglia et al. 2008). Chez les patients atteints de la dermatite atopique, il a été observé des changements qualitatifs et quantitatifs des cellules NK circulantes. En particulier, la cytotoxicité des cellules NK circulantes ainsi que la production d'IFN- γ sont diminuées (Luci et al. 2011). Une prédominance des cellules NK2 circulantes productrices d'IL-4 a été observée chez les patients asthmatiques favorisant ainsi un profil Th2 (Wei et al. 2005). L'ensemble de ces résultats montre que les cellules NK des patients allergiques possèdent un dysfonctionnement comparativement aux sujets sains, aboutissant ainsi à un crosstalk déficient avec les cellules dendritiques, favorisant ensuite un profil Th2 aboutissant à une exacerbation de la réaction allergique.

Dans les perspectives de cette première partie de thèse, l'effet de CCL18 sur des cellules NK activées permettra de confirmer l'effet régulateur de cette chimiokine sur les cellules NK. Pour cela des cellules NK seront activées par un cocktail cytokinique (IL-12+IL-

15+IL-18) ou en présence des cellules cibles telles que les K562 et ou les Jurkat et de CCL18. L'IFN- γ sera ensuite dosé par ELISA.

Lors des expériences de cytotoxicité, nous avons utilisé comme cellules cibles les cellules Jurkat qui expriment constitutivement Fas. Ainsi, après interaction entre Fas et Fas-ligand exprimée à la surface des cellules NK, les cellules Jurkat meurent par apoptose. Les cellules NK sont également capables de lyser les cellules cibles dépourvues de CMH I via la libération de granules cytotoxiques contenant notamment la perforine et les granzymes. Cette dégranulation aboutit également à l'apoptose de leur cible. Cette modalité de cytotoxicité est utilisée par les cellules NK notamment vis-à-vis des cellules K562. Plusieurs chimiokines sont capables d'induire la dégranulation des cellules NK (Taub et al. 1995; Loetscher et al. 1996; Taub et al. 1996; Yoneda et al. 2000), ainsi l'analyse de la lyse des cellules K562 après l'ajout de CCL18 en présence du cocktail cytokinique (IL-12+IL-15+IL-18), au moment de la mise en culture des cellules NK et des cellules cibles permettra d'évaluer si cette chimiokine est capable de potentialiser la dégranulation et donc la cytotoxicité des cellules NK.

De plus, pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'absence de réponse des cellules NK des patients allergiques au CCL18, les modifications de niveaux de calcium intracellulaire et d'AMP cyclique seront évaluées. La réponse des cellules NK des patients allergiques sera comparée à celle des cellules NK des donneurs non allergiques en présence de chimiokines contrôles (CXCL10, CXCL12, CCL25) et de chimiokines présentes dans la pathologie de l'asthme (CCL22, CCL5, CCL3 et CCL4).

Interaction entre les cellules NK et les éosinophiles

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons montré que les cellules NK quiescentes stimulent les éosinophiles comme en témoignent l'augmentation du CD69 et la diminution de l'expression du CD62L, et induisent leur dégranulation (expression du CD63 membranaire et libération de l'ECP et de l'EDN). Nous avons montré qu'un contact cellulaire était nécessaire à l'activation et l'apoptose des éosinophiles par les cellules NK. En perspective de ce travail, nous envisageons d'analyser l'interaction entre les cellules NK et les éosinophiles en temps réel par la microscopie confocale.

Les interactions entre les molécules de surface restent encore à déterminer. Nous avons montré que FasL, TRAIL et TNFmb ne sont pas impliquées dans l'apoptose des éosinophiles. D'autre part, l'utilisation des anticorps inhibiteurs contre NKp30, DNAM-1, NKp46, 2B4, NKG2D, LFA-1a, CD30L à la surface des cellules NK et des anticorps anti-CD54 et anti-

CD40 à la surface des éosinophiles n'ont pas diminué l'apoptose et l'activation des éosinophiles par les cellules NK. Siglec 8 est une molécule de surface impliquée dans l'apoptose des éosinophiles. Son activation fait intervenir la voie des caspases et la production des ROS aboutissant à des dommages mitochondriaux (Kiwamoto et al. 2012). Les 6-sulfo sialyl Lewis X sont des ligands de Siglec 8 présents à la surface des cellules NK (Mitsuoka et al. 1999). L'apoptose induite par Siglec 8 est présente même en présence d'IL-5, puisque Kiwamoto et al, ont montré qu'en présence du ligand de Siglec 8, l'apoptose des éosinophiles est amplifiée en présence d'IL-5 de façon fortement dépendante de la voie mitochondriale, ce qui est en accord avec nos résultats. Nous émettons l'hypothèse que siglec-8 pourrait être impliquée dans l'induction de l'apoptose des éosinophiles par les cellules NK. L'obtention d'un anticorps bloquant dirigé contre siglec-8 permettrait de le vérifier.

Nous avons également montré que les molécules solubles comme IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , MIP1 α , IL17A, HMGB-1, IFN- γ et TGF- β ne sont pas impliquées dans l'apoptose et l'activation des éosinophiles induites par les cellules NK. Les voies de signalisation p38MAPkinase (mitogen-activated protein kinases), ERK (Extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinases) et PI₃kinase (Phosphatidylinositide 3-kinases) interviennent dans l'activation des éosinophiles. Concernant l'apoptose des éosinophiles induite par les cellules NK, la voie mitochondriale est davantage impliquée que la voie des caspases.

Durant nos études de cinétique, nous avons observé que l'activation et l'apoptose des éosinophiles sont deux mécanismes indépendants qui se déroulent parallèlement dès la première minute avec un pourcentage d'éosinophiles activés plus importants que le pourcentage d'éosinophiles morts. De plus, pendant notre analyse de cytométrie en flux, nous avons observé que les cellules vivantes ainsi que les cellules apoptotiques exprimaient de la même façon les marqueurs d'activation et de dégranulation (CD69 et CD63) en présence de cellules NK. Ceci a déjà été observé avec les cellules dendritiques où les cellules NK induisent l'activation des DC matures et l'apoptose des DC immatures (Ferlazzo et al. 2002; Vitale et al. 2005).

Nous envisageons de poursuivre ce travail de caractérisation *in vitro* et d'évaluer *in vivo* le rôle des cellules NK dans un modèle murin d'asthme allergique.

Dans notre étude aucune différence entre les patients allergiques et les sujets non allergiques n'a été mise en évidence. Nous nous posons la question de savoir si l'environnement des cellules NK pourrait modifier leur effet sur les éosinophiles. L'interaction des cellules NK et des éosinophiles humains sera caractérisée *in vitro*, en évaluant l'effet d'un environnement proinflammatoire dans l'interaction des cellules NK et des éosinophiles (activation et apoptose). En utilisant des cellules NK, l'effet d'une coculture de cellules NK et d'éosinophiles provenant du même donneur sera analysé en activant les cellules NK par l'IL-4, chef de file des cytokines Th2 ou en présence d'un cocktail cytokinique activateur des cellules NK (IL-12 + IL-15 + IL-18). Lors d'expériences préliminaires, nous avons identifié la provenance et la concentration de ces cytokines permettant une activation optimale des cellules NK, mesurée par l'expression du CD69 membranaire, de l'IFN- γ et de CCL5 intracellulaire, et de la libération d'IFN- γ . De plus l'incubation de cellules NK des sujets non allergiques avec du CCL18 permettra ainsi d'évaluer une possible diminution de l'apoptose et/ou l'activation des éosinophiles par les cellules NK. L'effet sur l'activation (expression du CD63, CD69, CD62L), la dégranulation (ECP et EDN) ainsi que l'expression et la sécrétion des cytokines (IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-5, IL-13, IL-8 et GM-CSF) et l'apoptose des éosinophiles seront évalués.

Les cellules NK et les éosinophiles sont présents dans différents organes communs comme le sang circulant, les tissus lymphoïdes et les poumons. Une colocalisation et une interaction directe *in vivo* n'ont jamais été décrites. Cependant il a été montré que la déplétion des cellules NK avant ou après la provocation allergénique, pouvait avoir un effet négatif ou positif sur l'inflammation éosinophilique (Korsgren et al. 1999; Ple et al. 2010; Haworth et al. 2011; Farhadi et al. 2013; Ghadially et al. 2013). Chez les patients atteints de pneumonie éosinophilique, une corrélation positive entre le pourcentage des éosinophiles et des cellules NK dans les LBA a été observée (Papakosta et al. 2009). Il a également été montré chez les patients atteints de la rhinite allergique que les cellules NK sont capables de recruter les éosinophiles par le biais de l'IL-8 (El-Shazly et al. 2011). Récemment, Barnig et al ont montré que les cellules NK de patients asthmatiques sévères sont suractivées et associées à une éosinophilie périphérique (Barnig et al. 2013). Les éosinophiles sont présents dans différentes maladies comme l'Aspergillose broncho-pulmonaire allergique, la rhinite allergique, l'asthme, la dermatite allergique, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Rosenberg et al. 2012). De plus, comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules NK sont impliquées dans les mêmes pathologies notamment la rhinite allergique, l'asthme, la dermatite atopique, l'aspergillose (Mueller-Loebnitz et al. 2013) et les MICI (Yadav et al. 2011) mais aussi dans les infections virales (Diefenbach et al. 2003) et les cancers (Trinchieri

1989). La présence de ces deux types cellulaires dans les mêmes pathologies, suggère une possibilité de colocalisation et d'interaction de façon à moduler l'inflammation et réduire les dommages tissulaires dans le cas où les cellules NK induisent l'activation des éosinophiles.

In vivo, l'implication des cellules NK sur l'inflammation éosinophilique pulmonaire allergique sera identifiée. D'une part, afin d'évaluer si l'interaction entre cellules NK et éosinophiles pourraient se produire chez la souris, nous analyserons la localisation des cellules NK et des éosinophiles dans un modèle murin d'asthme expérimental. La localisation des cellules NK a été analysée chez l'homme (Barnig et al. 2013). Comme le nombre et l'activation des cellules NK et des éosinophiles sont modifiés dans les ganglions médiastinaux (drainant les poumons) au cours de l'asthme expérimental (Ple et al. 2010), les cellules NK et les éosinophiles seront détectés dans ces tissus lymphoïdes ainsi que dans les poumons. Nous utiliserons un modèle de sensibilisation chronique de souris C57BL/6 à l'allergène *Dermatophagoides farinae* (Df), acarien de la poussière de maison administré localement par voie intranasale, sans adjuvant, ainsi qu'un modèle d'asthme chronique. Des immunohistochimies (anticorps anti-NKp46 pour les cellules NK et anti-Major Basic Protein pour les éosinophiles) seront réalisées sur des sections de poumons et de ganglions médiastinaux de souris sensibilisées ou non sensibilisées et analysées par microscopie confocale.

D'autre part, afin d'identifier le rôle des cellules NK dans l'asthme aigu, nous utiliserons les souris NKp46-iCRE (Narni-Mancinelli et al. 2011a) (collaboration : E Vivier, Marseille ; B Lambrecht & H Hammad, Gent, Belgique) croisées avec des souris *Rosa26*^{lsl-DTR/lsl-DTR} (Buch et al. 2005). Les souris *NKp46*^{iCre/wt}*Rosa26*^{lsl-DTR/wt} ainsi obtenues exprimeront le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle de régions régulatrices du NKp46, molécule exprimée spécifiquement sur les cellules NK. Des injections de toxine diphtérique (DT) conduiront à une déplétion sélective des cellules NK. L'utilisation de telles souris déficientes conditionnelles permettra d'étudier le rôle des cellules NK à différentes étapes clé de la réaction asthmatique allergique : la phase d'initiation ou de polarisation Th2, la phase inflammatoire. Le modèle asthmatique chronique consiste à réaliser des sensibilisations avec du Df en intranasal : une fois par jour, cinq fois par semaine pendant au moins 4 semaines. Les cellules NK seront déplétées suite à une injection de la toxine diphtérique une semaine avant l'analyse. Le développement et la résolution de la réaction asthmatique seront évalués. L'inflammation pulmonaire (éosinophilie dans le lavage bronchoalvéolaire et le tissu, production de cytokines dans les poumons), des coupes histologiques (colorations histologiques pour analyser le

remodelage bronchique), l'hyperréactivité bronchique mesurée par le Flexivent[®], le dosage des immunoglobulines sériques totales (IgE, IgG1 et IgG2a) dans le sérum et la polarisation cellulaire T dans les ganglions lymphatiques seront analysés.

Au cours de ce travail, nous avons montré un dysfonctionnement des cellules NK chez l'allergique dans leur réponse à CCL18. Ceci pourrait avoir comme conséquence un déficit du dialogue entre cellules NK et cellules dendritiques et participer à l'aggravation et au retard de la résolution de la réaction allergique inflammatoire. Notre étude ajoute aussi un argument en faveur d'une réponse déficitaire vis-à-vis de CCL18 dans l'allergie. En outre la mise en évidence du rôle double des cellules NK sur les éosinophiles (activation et apoptose) suggère une fonction des cellules NK dans la régulation de la réaction inflammatoire allergique. Seules des explorations *in vivo* permettront de distinguer l'importance des cellules NK sur l'éosinophilie pulmonaire allergique. Les deux mécanismes sont-ils impliqués à différentes cinétiques de la réaction allergique, ou l'un est-il prépondérant dans l'environnement allergique?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aaby, P., S. O. Shaheen, C. B. Heyes, A. Goudiaby, A. J. Hall, A. W. Shiell, H. Jensen and A. Marchant (2000). "Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau." *Clin Exp Allergy* **30**(5): 644-50.
- Adachi, T., B. K. Choudhury, S. Stafford, S. Sur and R. Alam (2000). "The differential role of extracellular signal-regulated kinases and p38 mitogen-activated protein kinase in eosinophil functions." *J Immunol* **165**(4): 2198-204.
- Adam, C., S. King, T. Allgeier, H. Braumuller, C. Luking, J. Mysliwietz, A. Kriegeskorte, D. H. Busch, M. Rocken and R. Mocikat (2005). "DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction." *Blood* **106**(1): 338-44.
- Adamkiewicz, T. V., C. McSherry, F. H. Bach and J. P. Houchins (1994). "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins." *Immunogenetics* **39**(3): 218.
- Adema, G. J., F. Hartgers, R. Verstraten, E. de Vries, G. Marland, S. Menon, J. Foster, Y. Xu, P. Nooyen, T. McClanahan, K. B. Bacon and C. G. Figdor (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." *Nature* **387**(6634): 713-7.
- Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2003a). "Mucosal tolerance and immunity: regulating the development of allergic disease and asthma." *Int Arch Allergy Immunol* **130**(2): 108-18.
- Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Grusby, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2003b). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." *Nat Med* **9**(5): 582-8.
- Akdis, C. A., A. Joss, M. Akdis, A. Faith and K. Blaser (2000). "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* **14**(12): 1666-8.
- Akdis, M., J. Verhagen, A. Taylor, F. Karamloo, C. Karagiannidis, R. Cramer, S. Thunberg, G. Deniz, R. Valenta, H. Fiebig, C. Kegel, R. Disch, C. B. Schmidt-Weber, K. Blaser and C. A. Akdis (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." *J Exp Med* **199**(11): 1567-75.
- Al-Shami, A., R. Spolski, J. Kelly, A. Keane-Myers and W. J. Leonard (2005). "A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model." *J Exp Med* **202**(6): 829-39.
- Alam, R., S. Stafford, P. Forsythe, R. Harrison, D. Faubion, M. A. Lett-Brown and J. A. Grant (1993). "RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils." *J Immunol* **150**(8 Pt 1): 3442-8.
- Allan, D. S., M. Colonna, L. L. Lanier, T. D. Churakova, J. S. Abrams, S. A. Ellis, A. J. McMichael and V. M. Braud (1999). "Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells." *J Exp Med* **189**(7): 1149-56.
- Allavena, P., L. Piemonti, D. Longoni, S. Bernasconi, A. Stoppacciaro, L. Ruco and A. Mantovani (1997). "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* **417**: 323-7.
- Alter, G., J. M. Malenfant and M. Altfeld (2004). "CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity." *J Immunol Methods* **294**(1-2): 15-22.
- Amin, K. (2012). "The role of mast cells in allergic inflammation." *Respir Med* **106**(1): 9-14.
- Amin, K., C. Janson, G. Boman and P. Venge (2005). "The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma." *Allergy* **60**(10): 1241-7.
- Amin, K., D. Ludviksdottir, C. Janson, O. Nettelbladt, E. Bjornsson, G. M. Roomans, G. Boman, L. Seveus and P. Venge (2000). "Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(6): 2295-301.

- Andoniou, C. E., D. M. Andrews and M. A. Degli-Esposti (2006). "Natural killer cells in viral infection: more than just killers." *Immunol Rev* **214**: 239-50.
- Andrews, R. P., M. B. Ericksen, C. M. Cunningham, M. O. Daines and G. K. Hershey (2002). "Analysis of the life cycle of stat6. Continuous cycling of STAT6 is required for IL-4 signaling." *J Biol Chem* **277**(39): 36563-9.
- Angkasekwinai, P., H. Park, Y. H. Wang, S. H. Chang, D. B. Corry, Y. J. Liu, Z. Zhu and C. Dong (2007). "Interleukin 25 promotes the initiation of proallergic type 2 responses." *J Exp Med* **204**(7): 1509-17.
- Aoudjehane, L., A. Pissaia, Jr., O. Scatton, P. Podevin, P. P. Massault, S. Chouzenoux, O. Soubrane, Y. Calmus and F. Conti (2008). "Interleukin-4 induces the activation and collagen production of cultured human intrahepatic fibroblasts via the STAT-6 pathway." *Lab Invest* **88**(9): 973-85.
- Arase, H., N. Arase and T. Saito (1995). "Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells." *J Exp Med* **181**(3): 1235-8.
- Arase, H., E. S. Mocarski, A. E. Campbell, A. B. Hill and L. L. Lanier (2002). "Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors." *Science* **296**(5571): 1323-6.
- Arm, J. P., C. Nwankwo and K. F. Austen (1997). "Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor." *J Immunol* **159**(5): 2342-9.
- Arnon, T. I., H. Achdout, O. Levi, G. Markel, N. Saleh, G. Katz, R. Gazit, T. Gonen-Gross, J. Hanna, E. Nahari, A. Porgador, A. Honigman, B. Plachter, D. Mevorach, D. G. Wolf and O. Mandelboim (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." *Nat Immunol* **6**(5): 515-23.
- Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador and O. Mandelboim (2001). "Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30." *Eur J Immunol* **31**(9): 2680-9.
- Arock, M., C. Zuanzy-Amorim, M. Singer, M. Benhamou and M. Pretolani (1996). "Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells." *Eur J Immunol* **26**(1): 166-70.
- Atamas, S. P., I. G. Luzina, J. Choi, N. Tsybalyuk, N. H. Carbonetti, I. S. Singh, M. Trojanowska, S. A. Jimenez and B. White (2003). "Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts." *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**(6): 743-9.
- Azzaoui, I., S. A. Yahia, Y. Chang, H. Vorng, O. Morales, Y. Fan, N. Delhem, C. Ple, A. B. Tonnel, B. Wallaert and A. Tscopoulos (2011). "CCL18 differentiates dendritic cells in tolerogenic cells able to prime regulatory T cells in healthy subjects." *Blood* **118**(13): 3549-58.

B

- Babina, M., S. Guhl, A. Starke, L. Kirchhof, T. Zuberbier and B. M. Henz (2004). "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* **75**(2): 244-52.
- Bachelet, I., A. Munitz, D. Mankutad and F. Levi-Schaffer (2006). "Mast cell costimulation by CD226/CD112 (DNAM-1/Nectin-2): a novel interface in the allergic process." *J Biol Chem* **281**(37): 27190-6.
- Baena-Cagnani, C. E., R. M. Gomez, R. Baena-Cagnani and G. W. Canonica (2009). "Impact of environmental tobacco smoke and active tobacco smoking on the development and outcomes of asthma and rhinitis." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **9**(2): 136-40.
- Bajenoff, M., B. Breart, A. Y. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V. M. Braud, R. N. Germain and N. Glaichenhaus (2006). "Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging." *J Exp Med* **203**(3): 619-31.
- Balicer, R. D., I. Grotto, M. Mimouni and D. Mimouni (2007). "Is childhood vaccination associated with asthma? A meta-analysis of observational studies." *Pediatrics* **120**(5): e1269-77.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran and K. Palucka (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Bandeira-Melo, C., P. T. Bozza and P. F. Weller (2002). "The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function." *J Allergy Clin Immunol* **109**(3): 393-400.

- Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L. J. Woods and P. F. Weller (2001). "Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils." J Immunol **166**(8): 4813-7.
- Barber, D. F., M. Faure and E. O. Long (2004). "LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity." J Immunol **173**(6): 3653-9.
- Barczyk, A., W. Pierzchala and E. Sozanska (2003). "Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine." Respir Med **97**(6): 726-33.
- Barlow, J. L., A. Bellosi, C. S. Hardman, L. F. Drynan, S. H. Wong, J. P. Cruickshank and A. N. McKenzie (2012). "Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity." J Allergy Clin Immunol **129**(1): 191-8 e1-4.
- Barnes, P. J. (2008a). "Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease." Nat Rev Immunol **8**(3): 183-92.
- Barnes, P. J. (2008b). "Role of GATA-3 in allergic diseases." Curr Mol Med **8**(5): 330-4.
- Barnes, P. J., K. F. Chung and C. P. Page (1998). "Inflammatory mediators of asthma: an update." Pharmacol Rev **50**(4): 515-96.
- Barnig, C., M. Cernadas, S. Dutilleul, X. Liu, M. A. Perrella, S. Kazani, M. E. Wechsler, E. Israel and B. D. Levy (2013). "Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma." Sci Transl Med **5**(174): 174ra26.
- Barrett, N. A. and K. F. Austen (2009a). "Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation." Immunity **31**(3): 425-37.
- Barrett, N. A., A. Maekawa, O. M. Rahman, K. F. Austen and Y. Kanaoka (2009b). "Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells." J Immunol **182**(2): 1119-28.
- Bartemes, K. R., K. Iijima, T. Kobayashi, G. M. Kephart, A. N. McKenzie and H. Kita (2012). "IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs." J Immunol **188**(3): 1503-13.
- Bartemes, K. R., S. McKinney, G. J. Gleich and H. Kita (1999). "Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG." J Immunol **162**(5): 2982-9.
- Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik and T. J. Schall (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-4.
- Becker, I., N. Salaiza, M. Aguirre, J. Delgado, N. Carrillo-Carrasco, L. G. Kobeh, A. Ruiz, R. Cervantes, A. P. Torres, N. Cabrera, A. Gonzalez, C. Maldonado and A. Isibasi (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 65-74.
- Bellinghausen, I., S. Reuter, H. Martin, J. Maxeiner, U. Luxemburger, O. Tureci, S. Grabbe, C. Taube and J. Saloga (2012). "Enhanced production of CCL18 by tolerogenic dendritic cells is associated with inhibition of allergic airway reactivity." J Allergy Clin Immunol **130**(6): 1384-93.
- Berahovich, R. D., N. L. Lai, Z. Wei, L. L. Lanier and T. J. Schall (2006). "Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression." J Immunol **177**(11): 7833-40.
- Besnard, A. G., R. Sabat, L. Dumoutier, J. C. Renaud, M. Willart, B. Lambrecht, M. M. Teixeira, S. Charron, L. Fick, F. Erard, K. Warszawska, K. Wolk, V. Quesniaux, B. Ryffel and D. Togbe "Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A." Am J Respir Crit Care Med **183**(9): 1153-63.
- Besnard, A. G., R. Sabat, L. Dumoutier, J. C. Renaud, M. Willart, B. Lambrecht, M. M. Teixeira, S. Charron, L. Fick, F. Erard, K. Warszawska, K. Wolk, V. Quesniaux, B. Ryffel and D. Togbe (2011). "Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A." Am J Respir Crit Care Med **183**(9): 1153-63.
- Beuther, D. A., S. T. Weiss and E. R. Sutherland (2006). "Obesity and asthma." Am J Respir Crit Care Med **174**(2): 112-9.

- Bhatnagar, N., H. S. Hong, J. K. Krishnaswamy, A. Haghikia, G. M. Behrens, R. E. Schmidt and R. Jacobs (2010). "Cytokine-activated NK cells inhibit PMN apoptosis and preserve their functional capacity." *Blood* **116**(8): 1308-16.
- Biassoni, R., C. Cantoni, M. Falco, S. Verdiani, C. Bottino, M. Vitale, R. Conte, A. Poggi, A. Moretta and L. Moretta (1996). "The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions." *J Exp Med* **183**(2): 645-50.
- Biassoni, R., A. Pessino, C. Bottino, D. Pende, L. Moretta and A. Moretta (1999). "The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity." *Eur J Immunol* **29**(3): 1014-20.
- Biassoni, R., A. Pessino, A. Malaspina, C. Cantoni, C. Bottino, S. Sivori, L. Moretta and A. Moretta (1997). "Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules." *Eur J Immunol* **27**(12): 3095-9.
- Bieber, T., H. de la Salle, A. Wollenberg, J. Hakimi, R. Chizzonite, J. Ring, D. Hanau and C. de la Salle (1992). "Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI)." *J Exp Med* **175**(5): 1285-90.
- Bimczok, D., A. Post, T. Tschernig and H. J. Rothkötter (2006). "Phenotype and distribution of dendritic cells in the porcine small intestinal and tracheal mucosa and their spatial relationship to epithelial cells." *Cell Tissue Res* **325**(3): 461-8.
- Binstadt, B. A., K. M. Brumbaugh, C. J. Dick, A. M. Scharenberg, B. L. Williams, M. Colonna, L. L. Lanier, J. P. Kinet, R. T. Abraham and P. J. Leibson (1996). "Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation." *Immunity* **5**(6): 629-38.
- Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens and T. P. Salazar-Mather (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." *Annu Rev Immunol* **17**: 189-220.
- Blanca, I. R., E. W. Bere, H. A. Young and J. R. Ortaldo (2001). "Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells." *J Immunol* **167**(11): 6132-9.
- Blanchard, C., S. Durual, M. Estienne, S. Emami, S. Vasseur and J. C. Cuber (2005). "Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(12): 2559-73.
- Bleck, B., D. B. Tse, I. Jaspers, M. A. Curotto de Lafaille and J. Reibman (2006). "Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation." *J Immunol* **176**(12): 7431-7.
- Bloushtain, N., U. Qimron, A. Bar-Ilan, O. Hershkovitz, R. Gazit, E. Fima, M. Korc, I. Vlodavsky, N. V. Bovin and A. Porgador (2004). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46." *J Immunol* **173**(4): 2392-401.
- Bochner, B. S., D. A. Klunk, S. A. Sterbinsky, R. L. Coffman and R. P. Schleimer (1995). "IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells." *J Immunol* **154**(2): 799-803.
- Bolitho, P., I. Voskoboinik, J. A. Trapani and M. J. Smyth (2007). "Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin." *Curr Opin Immunol* **19**(3): 339-47.
- Bolton, S. J., C. A. McNulty, R. J. Thomas, C. R. Hewitt and A. J. Wardlaw (2003). "Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils." *J Leukoc Biol* **74**(1): 60-8.
- Borg, C., A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard and L. Zitvogel (2004). "NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs." *Blood* **104**(10): 3267-75.

- Borges, L., M. L. Hsu, N. Fanger, M. Kubin and D. Cosman (1997). "A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules." *J Immunol* **159**(11): 5192-6.
- Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." *Blood* **89**(10): 3503-21.
- Borrego, F., M. Ulbrecht, E. H. Weiss, J. E. Coligan and A. G. Brooks (1998). "Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis." *J Exp Med* **187**(5): 813-8.
- Brandt, C. S., M. Baratin, E. C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C. D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier and S. D. Levin (2009). "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans." *J Exp Med* **206**(7): 1495-503.
- Braud, V., E. Y. Jones and A. McMichael (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9." *Eur J Immunol* **27**(5): 1164-9.
- Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier and A. J. McMichael (1998a). "HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C." *Nature* **391**(6669): 795-9.
- Braud, V. M., D. S. Allan, D. Wilson and A. J. McMichael (1998b). "TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide." *Curr Biol* **8**(1): 1-10.
- Brilot, F., T. Strowig, S. M. Roberts, F. Arrey and C. Munz (2007). "NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15Ralpha." *J Clin Invest* **117**(11): 3316-29.
- Broide, D. H., M. M. Paine and G. S. Firestein (1992). "Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics." *J Clin Invest* **90**(4): 1414-24.
- Brooks, A. G., P. E. Posch, C. J. Scorzelli, F. Borrego and J. E. Coligan (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor." *J Exp Med* **185**(4): 795-800.
- Broxmeyer, H. E., C. H. Kim, S. H. Cooper, G. Hangoc, R. Hromas and L. M. Pelus (1999). "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* **872**: 142-62; discussion 163.
- Bryce, P. J., C. B. Mathias, K. L. Harrison, T. Watanabe, R. S. Geha and H. C. Oettgen (2006). "The H1 histamine receptor regulates allergic lung responses." *J Clin Invest* **116**(6): 1624-32.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren and E. O. Long (2006). "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells." *Immunol Rev* **214**: 73-91.
- Buentke, E., L. C. Heffler, J. L. Wilson, R. P. Wallin, C. Lofman, B. J. Chambers, H. G. Ljunggren and A. Scheynius (2002). "Natural killer and dendritic cell contact in lesional atopic dermatitis skin--Malassezia-influenced cell interaction." *J Invest Dermatol* **119**(4): 850-7.
- Bullens, D. M., E. Truyen, L. Coteur, E. Dilissen, P. W. Hellings, L. J. Dupont and J. L. Ceuppens (2006). "IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?" *Respir Res* **7**: 135.
- Burkett, P. R., R. Koka, M. Chien, S. Chai, D. L. Boone and A. Ma (2004). "Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15Ralpha and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis." *J Exp Med* **200**(7): 825-34.
- Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." *Lancet* **1**(7501): 1171-4.
- Burshtyn, D. N., A. M. Scharenberg, N. Wagtmann, S. Rajagopalan, K. Berrada, T. Yi, J. P. Kinet and E. O. Long (1996). "Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor." *Immunity* **4**(1): 77-85.

C

- Caligiuri, M. A. (2008). "Human natural killer cells." *Blood* **112**(3): 461-9.

- Caligiuri, M. A., C. Murray, M. J. Robertson, E. Wang, K. Cochran, C. Cameron, P. Schow, M. E. Ross, T. R. Klumpp, R. J. Soiffer and et al. (1993). "Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2." J Clin Invest **91**(1): 123-32.
- Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith and J. Ritz (1990). "Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors." J Exp Med **171**(5): 1509-26.
- Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta and R. Biassoni (1999). "Nkp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." J Exp Med **189**(5): 787-96.
- Cantoni, C., S. Verdiani, M. Falco, A. Pessino, M. Cilli, R. Conte, D. Pende, M. Ponte, M. S. Mikaelsson, L. Moretta and R. Biassoni (1998). "p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily." Eur J Immunol **28**(6): 1980-90.
- Carlson, M., P. Venge and M. Lampinen (2011). "C3b-induced eosinophil degranulation involves PI3-kinases and is inhibited by protein kinase C activity." Apmis **119**(2): 119-26.
- Carlsson, F., F. Hjelm, D. H. Conrad and B. Heyman (2007). "IgE enhances specific antibody and T-cell responses in mice overexpressing CD23." Scand J Immunol **66**(2-3): 261-70.
- Carlsten, M., H. Norell, Y. T. Bryceson, I. Poschke, K. Schedvins, H. G. Ljunggren, R. Kiessling and K. J. Malmberg (2009). "Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells." J Immunol **183**(8): 4921-30.
- Carreras, E., E. Boix, H. F. Rosenberg, C. M. Cuchillo and M. V. Nogues (2003). "Both aromatic and cationic residues contribute to the membrane-lytic and bactericidal activity of eosinophil cationic protein." Biochemistry **42**(22): 6636-44.
- Carretero, M., C. Cantoni, T. Bellon, C. Bottino, R. Biassoni, A. Rodriguez, J. J. Perez-Villar, L. Moretta, A. Moretta and M. Lopez-Botet (1997). "The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules." Eur J Immunol **27**(2): 563-7.
- Carson, W. E., S. Haldar, R. A. Baiocchi, C. M. Croce and M. A. Caligiuri (1994). "The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7553-7.
- Carson, W. F. t., L. A. Guernsey, A. Singh, A. T. Vella, C. M. Schramm and R. S. Thrall (2008). "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 **145**(3): 231-43.
- Cates, E. C., R. Fattouh, J. Wattie, M. D. Inman, S. Goncharova, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos and M. Jordana (2004). "Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism." J Immunol **173**(10): 6384-92.
- Catusse, J., M. Leick, M. Groch, D. J. Clark, M. V. Buchner, K. Zirlik and M. Burger "Role of the atypical chemoattractant receptor CRAM in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Mol Cancer **9**: 297.
- Cella, M., C. Dohring, J. Samaridis, M. Dessing, M. Brockhaus, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1997). "A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing." J Exp Med **185**(10): 1743-51.
- Cella, M., A. Fuchs, W. Vermi, F. Facchetti, K. Otero, J. K. Lennerz, J. M. Doherty, J. C. Mills and M. Colonna (2009). "A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity." Nature **457**(7230): 722-5.
- Chalifour, A., P. Jeannin, J. F. Gauchat, A. Blaecke, M. Malissard, T. N'Guyen, N. Thieblemont and Y. Delneste (2004). "Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production." Blood **104**(6): 1778-83.

- Chan, A., D. L. Hong, A. Atzberger, S. Kollnberger, A. D. Filer, C. D. Buckley, A. McMichael, T. Enver and P. Bowness (2007). "CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts." *J Immunol* **179**(1): 89-94.
- Chan, C. J., D. M. Andrews, N. M. McLaughlin, H. Yagita, S. Gilfillan, M. Colonna and M. J. Smyth (2009). "DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases." *J Immunol* **184**(2): 902-11.
- Chang, C., A. Rodriguez, M. Carretero, M. Lopez-Botet, J. H. Phillips and L. L. Lanier (1995). "Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily." *Eur J Immunol* **25**(9): 2433-7.
- Chang, H. C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A. N. Ahyi, L. Han, E. T. Nguyen, M. J. Robertson, N. B. Perumal, R. S. Tepper, S. L. Nutt and M. H. Kaplan (2010a). "The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation." *Nat Immunol* **11**(6): 527-34.
- Chang, Y., P. de Nadai, I. Azzaoui, O. Morales, N. Delhem, H. Vorng, S. Tomavo, S. Ait Yahia, G. Zhang, B. Wallaert, C. Chenivresse and A. Tsicopoulos (2010b). "The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects." *Faseb J* **24**(12): 5063-72.
- Charbonnier, A. S., H. Hammad, P. Gosset, G. A. Stewart, S. Alkan, A. B. Tonnel and J. Pestel (2003). "Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response." *J Leukoc Biol* **73**(1): 91-9.
- Cheent, K. and S. I. Khakoo (2011). "Natural killer cells and hepatitis C: action and reaction." *Gut* **60**(2): 268-78.
- Chen, J., Y. Yao, C. Gong, F. Yu, S. Su, B. Liu, H. Deng, F. Wang, L. Lin, H. Yao, F. Su, K. S. Anderson, Q. Liu, M. E. Ewen, X. Yao and E. Song "CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3." *Cancer Cell* **19**(4): 541-55.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel and E. J. Lesnfsky (2003a). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." *J Biol Chem* **278**(38): 36027-31.
- Chen, X. Q., J. Yang, S. P. Hu, H. X. Nie, G. Y. Mao and H. B. Chen (2006). "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* **73**(1): 34-40.
- Chen, Y., P. Thai, Y. H. Zhao, Y. S. Ho, M. M. DeSouza and R. Wu (2003b). "Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop." *J Biol Chem* **278**(19): 17036-43.
- Chenivresse, C., Y. Chang, I. Azzaoui, S. Ait Yahia, O. Morales, C. Ple, A. Foussat, A. B. Tonnel, N. Delhem, H. Yssel, H. Vorng, B. Wallaert and A. Tsicopoulos (2012). "Pulmonary CCL18 recruits human regulatory T cells." *J Immunol* **189**(1): 128-37.
- Cherry, W. B., J. Yoon, K. R. Bartemes, K. Iijima and H. Kita (2008). "A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils." *J Allergy Clin Immunol* **121**(6): 1484-90.
- Chetta, A., A. K. Rehman, J. Moxham, D. H. Carr and M. I. Polkey (2005). "Chest radiography cannot predict diaphragm function." *Respir Med* **99**(1): 39-44.
- Cheung, P. F., C. K. Wong and C. W. Lam (2008). "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* **180**(8): 5625-35.
- Chewning, J. H., C. N. Gudme, K. C. Hsu, A. Selvakumar and B. Dupont (2007). "KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro." *J Immunol* **179**(2): 854-68.
- Chiossone, L., J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier and T. Walzer (2009). "Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program." *Blood* **113**(22): 5488-96.
- Choi, J. P., Y. S. Kim, Y. M. Tae, E. J. Choi, B. S. Hong, S. G. Jeon, Y. S. Gho, Z. Zhu and Y. K. Kim (2010). "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): 1322-30.
- Chung, K. F. (2006). "Intrinsic differences of the airway epithelium in childhood allergic asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **174**(10): 1066-7.

- Coffman, R. L., B. W. Seymour, S. Hudak, J. Jackson and D. Rennick (1989). "Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice." Science **245**(4915): 308-10.
- Cole, K. E., C. A. Strick, T. J. Paradis, K. T. Osborne, M. Loetscher, R. P. Gladue, W. Lin, J. G. Boyd, B. Moser, D. E. Wood, B. G. Sahagan and K. Neote (1998). "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 **187**(12): 2009-21.
- Collins, P. D., S. Marleau, D. A. Griffiths-Johnson, P. J. Jose and T. J. Williams (1995). "Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo." J Exp Med **182**(4): 1169-74.
- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-9.
- Colonna, M., H. Nakajima, F. Navarro and M. Lopez-Botet (1999). "A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells." J Leukoc Biol **66**(3): 375-81.
- Colonna, M., F. Navarro, T. Bellon, M. Llano, P. Garcia, J. Samaridis, L. Angman, M. Cella and M. Lopez-Botet (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." J Exp Med **186**(11): 1809-18.
- Colonna, M., J. Samaridis, M. Cella, L. Angman, R. L. Allen, C. A. O'Callaghan, R. Dunbar, G. S. Ogg, V. Cerundolo and A. Rolink (1998). "Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules." J Immunol **160**(7): 3096-100.
- Colucci, F., M. A. Caligiuri and J. P. Di Santo (2003). "What does it take to make a natural killer?" Nat Rev Immunol **3**(5): 413-25.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna and M. A. Caligiuri (2004). "NK cell and DC interactions." Trends Immunol **25**(1): 47-52.
- Correia, M. P., E. M. Cardoso, C. F. Pereira, R. Neves, M. Uhrberg and F. A. Arosa (2009). "Hepatocytes and IL-15: a favorable microenvironment for T cell survival and CD8+ T cell differentiation." J Immunol **182**(10): 6149-59.
- Corrigan, C. J., W. Wang, Q. Meng, C. Fang, G. Eid, M. R. Caballero, Z. Lv, Y. An, Y. H. Wang, Y. J. Liu, A. B. Kay, T. H. Lee and S. Ying (2011a). "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): 116-24.
- Corrigan, C. J., W. Wang, Q. Meng, C. Fang, H. Wu, V. Reay, Z. Lv, Y. Fan, Y. An, Y. H. Wang, Y. J. Liu, T. H. Lee and S. Ying (2011b). "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): 1579-84.
- Cosman, D., N. Fanger, L. Borges, M. Kubin, W. Chin, L. Peterson and M. L. Hsu (1997). "A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules." Immunity **7**(2): 273-82.
- Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin and N. J. Chalupny (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." Immunity **14**(2): 123-33.
- Costantini, C., A. Micheletti, F. Calzetti, O. Perbellini, G. Pizzolo and M. A. Cassatella (2010). "Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells." Int Immunol **22**(10): 827-38.
- Costello, R. W., B. H. Schofield, G. M. Kephart, G. J. Gleich, D. B. Jacoby and A. D. Fryer (1997). "Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function." Am J Physiol **273**(1 Pt 1): L93-103.
- Cowden, J. M., J. P. Riley, J. Y. Ma, R. L. Thurmond and P. J. Dunford "Histamine H4 receptor antagonism diminishes existing airway inflammation and dysfunction via modulation of Th2 cytokines." Respir Res **11**: 86.

Cullen, S. P. and S. J. Martin (2008). "Mechanisms of granule-dependent killing." Cell Death Differ **15**(2): 251-62.

D

Daffern, P. J., P. H. Pfeifer, J. A. Ember and T. E. Hugli (1995). "C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation." J Exp Med **181**(6): 2119-27.

Dalbeth, N., R. Gundle, R. J. Davies, Y. C. Lee, A. J. McMichael and M. F. Callan (2004). "CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation." J Immunol **173**(10): 6418-26.

Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "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 **9**(12): 1347-55.

Davies, R. J., J. H. Wang, C. J. Trigg and J. L. Devalia (1995). "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 **107**(1-3): 428-9.

Davis, D. M., I. Chiu, M. Fassett, G. B. Cohen, O. Mandelboim and J. L. Strominger (1999). "The human natural killer cell immune synapse." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15062-7.

de Andres, B., V. del Pozo, E. Martin, P. Palomino and C. Lahoz (1990). "Release of O₂⁻ and LTC₄ by murine eosinophils: role of intra- and extracellular calcium." Immunology **69**(2): 271-6.

de Nadai, P., A. S. Charbonnier, C. Chenivesse, S. Senechal, C. Fournier, J. Gilet, H. Vorng, Y. Chang, P. Gosset, B. Wallaert, A. B. Tonnel, P. Lassalle and A. Tsicopoulos (2006). "Involvement of CCL18 in allergic asthma." J Immunol **176**(10): 6286-93.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enyoloji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-65.

Delespesse, G., Y. Ohshima, L. P. Yang, C. Demeure and M. Sarfati (1999). "OX40-Mediated cosignal enhances the maturation of naive human CD4+ T cells into high IL-4-producing effectors." Int Arch Allergy Immunol **118**(2-4): 384-6.

Della Chiesa, M., M. Vitale, S. Carlomagno, G. Ferlazzo, L. Moretta and A. Moretta (2003). "The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors." Eur J Immunol **33**(6): 1657-66.

Denburg, J. A., M. Woolley, B. Leber, M. Linden and P. O'Byrne (1994). "Basophil and eosinophil differentiation in allergic reactions." J Allergy Clin Immunol **94**(6 Pt 2): 1135-41.

Deng, A., S. Chen, Q. Li, S. C. Lyu, C. Clayberger and A. M. Krensky (2005). "Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator." J Immunol **174**(9): 5243-8.

Denzler, K. L., M. T. Borchers, J. R. Crosby, G. Cieslewicz, E. M. Hines, J. P. Justice, S. A. Cormier, K. A. Lindenberger, W. Song, W. Wu, S. L. Hazen, G. J. Gleich, J. J. Lee and N. A. Lee (2001). "Extensive eosinophil degranulation and peroxidase-mediated oxidation of airway proteins do not occur in a mouse ovalbumin-challenge model of pulmonary inflammation." J Immunol **167**(3): 1672-82.

Denzler, K. L., S. C. Farmer, J. R. Crosby, M. Borchers, G. Cieslewicz, K. A. Larson, S. Cormier-Regard, N. A. Lee and J. J. Lee (2000). "Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma." J Immunol **165**(10): 5509-17.

Deo, D. D., A. P. Rao, S. S. Bose, A. Ouhitit, S. B. Baliga, S. A. Rao, B. J. Trock, R. Thouta, M. H. Raj and P. N. Rao (2008). "Differential effects of leptin on the invasive potential of androgen-dependent and -independent prostate carcinoma cells." J Biomed Biotechnol **2008**: 163902.

- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz and G. Schuler (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." *J Exp Med* **196**(2): 247-53.
- Diefenbach, A., J. K. Hsia, M. Y. Hsiung and D. H. Raulet (2003). "A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity." *Eur J Immunol* **33**(2): 381-91.
- Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri and D. H. Raulet (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." *Nat Immunol* **1**(2): 119-26.
- Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson and D. H. Raulet (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *Nature* **413**(6852): 165-71.
- DiScipio, R. G., P. J. Daffern, M. A. Jagels, D. H. Broide and P. Sriramarao (1999). "A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo." *J Immunol* **162**(2): 1127-36.
- Dubois, S., J. Mariner, T. A. Waldmann and Y. Tagaya (2002). "IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells." *Immunity* **17**(5): 537-47.
- Dubucquoi, S., P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, A. Capron and M. Capron (1994). "Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion." *J Exp Med* **179**(2): 703-8.
- Duez, C., A. Dakhama, A. Tomkinson, P. Marquillies, A. Balhorn, A. B. Tonnel, D. L. Bratton and E. W. Gelfand (2004). "Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge." *J Allergy Clin Immunol* **114**(4): 820-5.
- Duhen, T., R. Geiger, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2009). "Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells." *Nat Immunol* **10**(8): 857-63.
- Dunford, P. J., N. O'Donnell, J. P. Riley, K. N. Williams, L. Karlsson and R. L. Thurmond (2006). "The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells." *J Immunol* **176**(11): 7062-70.
- Dvorak, A. M. and P. F. Weller (2000). "Ultrastructural analysis of human eosinophils." *Chem Immunol* **76**: 1-28.

E

- Eagle, R. A., J. A. Traherne, J. R. Hair, I. Jafferji and J. Trowsdale (2009). "ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand." *Eur J Immunol* **39**(11): 3207-16.
- Ebert, L. M., S. Meuter and B. Moser (2006). "Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance." *J Immunol* **176**(7): 4331-6.
- Egesten, A., P. F. Weller and I. Olsson (1994). "Arylsulfatase B is present in crystalloid-containing granules of human eosinophil granulocytes." *Int Arch Allergy Immunol* **104**(2): 207-10.
- El-Shazly, A. E. and P. P. Lefebvre (2011). "Modulation of NK cell autocrine-induced eosinophil chemotaxis by interleukin-15 and vitamin D(3): a possible NK-eosinophil crosstalk via IL-8 in the pathophysiology of allergic rhinitis." *Mediators Inflamm* **2011**: 373589.
- Elia, A. R., P. Cappello, M. Puppo, T. Fraone, C. Vanni, A. Eva, T. Musso, F. Novelli, L. Varesio and M. Giovarelli (2008). "Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile." *J Leukoc Biol* **84**(6): 1472-82.
- Elsner, J., H. Petering, C. Kluthe, D. Kimmig, R. Smolarski, P. Ponath and A. Kapp (1998). "Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils." *Eur J Immunol* **28**(7): 2152-8.
- Eriksson, J., C. Woschnagg, E. Fernvik and P. Venge (2007). "A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophil cationic protein." *J Leukoc Biol* **82**(6): 1491-500.
- Erpenbeck, V. J., J. M. Hohlfeld, M. Discher, H. Krentel, A. Hagenberg, A. Braun and N. Krug (2003). "Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics." *Chest* **123**(3 Suppl): 370S.

- Esin, S., G. Batoni, C. Counoupas, A. Stringaro, F. L. Brancatisano, M. Colone, G. Maisetta, W. Florio, G. Arancia and M. Campa (2008). "Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor Nkp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria." Infect Immun **76**(4): 1719-27.
- Eum, S. Y., K. Maghni, B. Tolloczko, D. H. Eidelman and J. G. Martin (2005). "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 **288**(3): L576-84.
- Eyerich, S., K. Eyerich, D. Pennino, T. Carbone, F. Nasorri, S. Pallotta, F. Cianfarani, T. Odorisio, C. Traidl-Hoffmann, H. Behrendt, S. R. Durham, C. B. Schmidt-Weber and A. Cavani (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." J Clin Invest **119**(12): 3573-85.

F

- Falcone, F. H., D. Zillikens and B. F. Gibbs (2006). "The 21st century renaissance of the basophil? Current insights into its role in allergic responses and innate immunity." Exp Dermatol **15**(11): 855-64.
- Fanger, N. A., D. Cosman, L. Peterson, S. C. Braddy, C. R. Maliszewski and L. Borges (1998). "The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes." Eur J Immunol **28**(11): 3423-34.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**(2): 541-8.
- Farhadi, N., L. Lambert, C. Triulzi, P. J. Openshaw, N. Guerra and F. J. Culley (2013). "Natural killer cell NKG2D and granzyme B are critical for allergic pulmonary inflammation." J Allergy Clin Immunol.
- Fauci, A. S., D. Mavilio and S. Kottlil (2005). "NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush." Nat Rev Immunol **5**(11): 835-43.
- Faure, M. and E. O. Long (2002). "KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential." J Immunol **168**(12): 6208-14.
- Fehniger, T. A., M. A. Cooper, G. J. Nuovo, M. Cella, F. Facchetti, M. Colonna and M. A. Caligiuri (2003). "CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." Blood **101**(8): 3052-7.
- Fehniger, T. A., K. Suzuki, A. Ponnappan, J. B. VanDeusen, M. A. Cooper, S. M. Florea, A. G. Freud, M. L. Robinson, J. Durbin and M. A. Caligiuri (2001). "Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells." J Exp Med **193**(2): 219-31.
- Feili-Hariri, M., D. H. Falkner and P. A. Morel (2005). "Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy." J Leukoc Biol **78**(3): 656-64.
- Fellows, E., S. Gil-Parrado, D. E. Jenne and F. C. Kurschus (2007). "Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program." Blood **110**(2): 544-52.
- Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta and C. Munz (2004a). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(47): 16606-11.
- Ferlazzo, G., D. Thomas, S. L. Lin, K. Goodman, B. Morandi, W. A. Muller, A. Moretta and C. Munz (2004b). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic." J Immunol **172**(3): 1455-62.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman and C. Munz (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells." J Exp Med **195**(3): 343-51.

- Ferrara, G., B. Bleck, L. Richeldi, J. Reibman, L. M. Fabbri, W. N. Rom and R. Condos (2008). "Mycobacterium tuberculosis induces CCL18 expression in human macrophages." Scand J Immunol **68**(6): 668-74.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond and T. R. Mosmann (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-95.
- Flood-Page, P., A. Menzies-Gow, S. Phipps, S. Ying, A. Wangoo, M. S. Ludwig, N. Barnes, D. Robinson and A. B. Kay (2003). "Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics." J Clin Invest **112**(7): 1029-36.
- Foley, B., D. De Santis, L. Lathbury, F. Christiansen and C. Witt (2008). "KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals." Int Immunol **20**(4): 555-63.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-6.
- Ford-Hutchinson, A. W., M. A. Bray, M. V. Doig, M. E. Shipley and M. J. Smith (1980). "Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes." Nature **286**(5770): 264-5.
- Forssmann, U., M. Uguccioni, P. Loetscher, C. A. Dahinden, H. Langen, M. Thelen and M. Baggiolini (1997). "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 **185**(12): 2171-6.
- Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M. Gorman and D. M. Rennick (2001). "IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo." Immunity **15**(6): 985-95.
- Freud, A. G., B. Becknell, S. Roychowdhury, H. C. Mao, A. K. Ferketich, G. J. Nuovo, T. L. Hughes, T. B. Marburger, J. Sung, R. A. Baiocchi, M. Guimond and M. A. Caligiuri (2005). "A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells." Immunity **22**(3): 295-304.
- Freud, A. G. and M. A. Caligiuri (2006a). "Human natural killer cell development." Immunol Rev **214**: 56-72.
- Freud, A. G., A. Yokohama, B. Becknell, M. T. Lee, H. C. Mao, A. K. Ferketich and M. A. Caligiuri (2006b). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." J Exp Med **203**(4): 1033-43.
- Fujisawa, T., Y. Kato, H. Nagase, J. Atsuta, A. Terada, K. Iguchi, H. Kamiya, Y. Morita, M. Kitaura, H. Kawasaki, O. Yoshie and K. Hirai (2000). "Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3." J Allergy Clin Immunol **106**(3): 507-13.
- Fujisawa, T., Y. Kato, A. Terada, K. Iguchi and H. Kamiya (1999). "Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils." Int Arch Allergy Immunol **120 Suppl 1**: 65-9.
- Fujisawa, T., H. Katsumata and Y. Kato (2008). "House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils." Allergol Int **57**(2): 141-6.
- Fujishima, H., K. Fukagawa, N. Okada, Y. Takano, K. Tsubota, H. Hirai, K. Nagata, K. Matsumoto and H. Saito (2005). "Prostaglandin D2 induces chemotaxis in eosinophils via its receptor CRTH2 and eosinophils may cause severe ocular inflammation in patients with allergic conjunctivitis." Cornea **24**(8 Suppl): S66-S70.
- Fujita, H., K. E. Nogales, T. Kikuchi, J. Gonzalez, J. A. Carucci and J. G. Krueger (2009). "Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(51): 21795-800.
- Fulkerson, P. C., C. A. Fischetti, M. L. McBride, L. M. Hassman, S. P. Hogan and M. E. Rothenberg (2006). "A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16418-23.

G

- Galli, S. J., M. Tsai and A. M. Piliponsky (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-54.
- Gengrinovitch, S., S. M. Greenberg, T. Cohen, H. Gitay-Goren, P. Rockwell, T. E. Maione, B. Z. Levi and G. Neufeld (1995). "Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms." J Biol Chem **270**(25): 15059-65.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra and G. Trinchieri (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-33.
- Gerosa, F., A. Gobbi, P. Zorzi, S. Burg, F. Briere, G. Carra and G. Trinchieri (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." J Immunol **174**(2): 727-34.
- Ghadially, H., A. Horani, A. Glasner, M. Elboim, R. Gazit, D. Shoseyov and O. Mandelboim (2013). "NKp46 regulates allergic responses." Eur J Immunol **43**(11): 3006-16.
- Gibson, P. G., J. L. Simpson and N. Saltos (2001). "Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8." Chest **119**(5): 1329-36.
- Giembycz, M. A. and M. A. Lindsay (1999). "Pharmacology of the eosinophil." Pharmacol Rev **51**(2): 213-340.
- Gleich, G. J. and C. R. Adolphson (1986). "The eosinophilic leukocyte: structure and function." Adv Immunol **39**: 177-253.
- Goldstein, I. M., C. L. Malmsten, H. Kindahl, H. B. Kaplan, O. Radmark, B. Samuelsson and G. Weissmann (1978). "Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes." J Exp Med **148**(3): 787-92.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-6.
- Goodwin, W., D. McCabe, E. Sauter, E. Reese, M. Walter, J. A. Buckwalter and J. A. Martin (2010). "Rotenone prevents impact-induced chondrocyte death." J Orthop Res **28**(8): 1057-63.
- Gould, H. J. and B. J. Sutton (2008). "IgE in allergy and asthma today." Nat Rev Immunol **8**(3): 205-17.
- Gounni, A. S., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet and M. Capron (1994). "High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites." Nature **367**(6459): 183-6.
- Gregoire, C., L. Chasson, C. Luci, E. Tomasello, F. Geissmann, E. Vivier and T. Walzer (2007). "The trafficking of natural killer cells." Immunol Rev **220**: 169-82.
- Grindebacke, H., K. Wing, A. C. Andersson, E. Suri-Payer, S. Rak and A. Rudin (2004). "Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season." Clin Exp Allergy **34**(9): 1364-72.
- Groom, J. R. and A. D. Luster (2011). "CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions." Immunol Cell Biol **89**(2): 207-15.
- Grossman, W. J., J. W. Verbsky, B. L. Tollefsen, C. Kemper, J. P. Atkinson and T. J. Ley (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-8.
- Grunig, G., D. B. Corry, M. W. Leach, B. W. Seymour, V. P. Kurup and D. M. Rennick (1997). "Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in a murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis." J Exp Med **185**(6): 1089-99.
- Guan, P., A. H. Burghes, A. Cunningham, P. Lira, W. H. Brissette, K. Neote and S. R. McColl (1999). "Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18." Genomics **56**(3): 296-302.
- Guerra, N., Y. X. Tan, N. T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblaugh, D. Cado, N. M. Greenberg and D. H. Raulet (2008). "NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy." Immunity **28**(4): 571-80.

- Guimond, M., A. G. Freud, H. C. Mao, J. Yu, B. W. Blaser, J. W. Leong, J. B. Vandeusen, A. Dorrance, J. Zhang, C. L. Mackall and M. A. Caligiuri (2010). "In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis." *J Immunol* **184**(6): 2769-75.
- Gumbleton, M. and W. G. Kerr (2013). "Role of inositol phospholipid signaling in natural killer cell biology." *Front Immunol* **4**: 47.
- Gunther, C., C. Bello-Fernandez, T. Kopp, J. Kund, N. Carballido-Perrig, S. Hinteregger, S. Fassl, C. Schwarzler, G. Lametschwandtner, G. Stingl, T. Biedermann and J. M. Carballido (2005). "CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells." *J Immunol* **174**(3): 1723-8.

H

- Haggerty, C. L., R. B. Ness, S. Kelsey and G. W. Waterer (2003). "The impact of estrogen and progesterone on asthma." *Ann Allergy Asthma Immunol* **90**(3): 284-91; quiz 291-3, 347.
- Halim, T. Y., R. H. Krauss, A. C. Sun and F. Takei (2012). "Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation." *Immunity* **36**(3): 451-63.
- Hammad, H., A. S. Charbonnier, C. Duez, A. Jacquet, G. A. Stewart, A. B. Tonnel and J. Pestel (2001). "Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors." *Blood* **98**(4): 1135-41.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M. A. Willart, R. N. Germain and B. N. Lambrecht (2009). "House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells." *Nat Med* **15**(4): 410-6.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2007). "Lung dendritic cell migration." *Adv Immunol* **93**: 265-78.
- Hammad, H. and B. N. Lambrecht (2008). "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma." *Nat Rev Immunol* **8**(3): 193-204.
- Hammad, H., M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M. A. Willart, M. Kool, F. Muskens and B. N. Lambrecht "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): 2097-111.
- Hammad, H., M. Plantinga, K. Deswarte, P. Pouliot, M. A. Willart, M. Kool, F. Muskens and B. N. Lambrecht (2010). "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): 2097-111.
- Hammad, H., H. H. Smits, C. Ratajczak, A. Nithiananthan, E. A. Wierenga, G. A. Stewart, A. Jacquet, A. B. Tonnel and J. Pestel (2003). "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* **14**(4): 219-28.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle and C. C. Winterbourn (1998). "Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing." *Blood* **92**(9): 3007-17.
- Handzel, Z. T., W. W. Busse, J. B. Sedgwick, R. Vrtis, W. M. Lee, E. A. Kelly and J. E. Gern (1998). "Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells." *J Immunol* **160**(3): 1279-84.
- Hansel, T. T., J. B. Braunstein, C. Walker, K. Blaser, P. L. Bruijnzeel, J. C. Virchow, Jr. and C. Virchow, Sr. (1991). "Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR." *Clin Exp Immunol* **86**(2): 271-7.
- Hansel, T. T., I. J. De Vries, J. M. Carballido, R. K. Braun, N. Carballido-Perrig, S. Rihs, K. Blaser and C. Walker (1992). "Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR." *J Immunol* **149**(6): 2130-6.
- Hansen, G., G. Berry, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (1999). "Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation." *J Clin Invest* **103**(2): 175-83.
- Happel, K. I., E. A. Lockhart, C. M. Mason, E. Porretta, E. Keoshkerian, A. R. Odden, S. Nelson and A. J. Ramsay (2005). "Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local T-cell immunity and controls growth of Mycobacterium tuberculosis in the lungs." *Infect Immun* **73**(9): 5782-8.

- Harlin, H., M. Hanson, C. C. Johansson, D. Sakurai, I. Poschke, H. Norell, K. J. Malmberg and R. Kiessling (2007). "The CD16⁻ CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16⁺ CD56(dim) subset." *J Immunol* **179**(7): 4513-9.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-32.
- Hartnell, A., A. B. Kay and A. J. Wardlaw (1992). "IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils." *J Immunol* **148**(5): 1471-8.
- Hashimoto, K., J. E. Durbin, W. Zhou, R. D. Collins, S. B. Ho, J. K. Kolls, P. J. Dubin, J. R. Sheller, K. Goleniewska, J. F. O'Neal, S. J. Olson, D. Mitchell, B. S. Graham and R. S. Peebles, Jr. (2005). "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* **116**(3): 550-7.
- Haworth, O., M. Cernadas and B. D. Levy (2011). "NK cells are effectors for resolvin E1 in the timely resolution of allergic airway inflammation." *J Immunol* **186**(11): 6129-35.
- Hayani, K. C., S. C. Verral and D. L. Pitrak (1999). "Impaired phagocyte oxidative capacity in human immunodeficiency virus-infected children." *J Infect Dis* **179**(3): 584-9.
- Heaton, T., J. Rowe, S. Turner, R. C. Aalberse, N. de Klerk, D. Suriyaarachchi, M. Serralha, B. J. Holt, E. Hollams, S. Yerkovich, K. Holt, P. D. Sly, J. Goldblatt, P. Le Souef and P. G. Holt (2005). "An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in-vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children." *Lancet* **365**(9454): 142-9.
- Hecht, M. L., B. Rosental, T. Horlacher, O. Hershkovitz, J. L. De Paz, C. Noti, S. Schauer, A. Porgador and P. H. Seeberger (2009). "Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences." *J Proteome Res* **8**(2): 712-20.
- Henderson, W. R., J. B. Harley and A. S. Fauci (1984). "Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome human eosinophils: generation of leukotrienes B₄, C₄, D₄ and 15-lipoxygenase products." *Immunology* **51**(4): 679-86.
- Hershkovitz, O., S. Jivov, N. Bloushtain, A. Zilka, G. Landau, A. Bar-Ilan, R. G. Lichtenstein, K. S. Campbell, T. H. van Kuppevelt and A. Porgador (2007). "Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44." *Biochemistry* **46**(25): 7426-36.
- Hershkovitz, O., B. Rosental, L. A. Rosenberg, M. E. Navarro-Sanchez, S. Jivov, A. Zilka, O. Gershoni-Yahalom, E. Brient-Litzler, H. Bedouelle, J. W. Ho, K. S. Campbell, B. Rager-Zisman, P. Despres and A. Porgador (2009). "NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells." *J Immunol* **183**(4): 2610-21.
- Herz, U., P. Lacy, H. Renz and K. Erb (2000). "The influence of infections on the development and severity of allergic disorders." *Curr Opin Immunol* **12**(6): 632-40.
- Hieshima, K., T. Imai, M. Baba, K. Shoudai, K. Ishizuka, T. Nakagawa, J. Tsuruta, M. Takeya, Y. Sakaki, K. Takatsuki, R. Miura, G. Opendakker, J. Van Damme, O. Yoshie and H. Nomiyama (1997). "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* **159**(3): 1140-9.
- Hirota, K., H. Yoshitomi, M. Hashimoto, S. Maeda, S. Teradaira, N. Sugimoto, T. Yamaguchi, T. Nomura, H. Ito, T. Nakamura, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (2007). "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model." *J Exp Med* **204**(12): 2803-12.
- Ho, J. W., O. Hershkovitz, M. Peiris, A. Zilka, A. Bar-Ilan, B. Nal, K. Chu, M. Kudelko, Y. W. Kam, H. Achdout, M. Mandelboim, R. Altmeyer, O. Mandelboim, R. Bruzzone and A. Porgador (2008). "H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44." *J Virol* **82**(4): 2028-32.
- Hochweller, K., J. Striegler, G. J. Hammerling and N. Garbi (2008). "A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells." *Eur J Immunol* **38**(10): 2776-83.

- Hogan, S. P., H. F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P. S. Foster, P. Lacy, A. B. Kay and M. E. Rothenberg (2008). "Eosinophils: biological properties and role in health and disease." Clin Exp Allergy **38**(5): 709-50.
- Hohl, T. M., A. Rivera and E. G. Pamer (2006). "Immunity to fungi." Curr Opin Immunol **18**(4): 465-72.
- Holgate, S. T. (2008). "The airway epithelium is central to the pathogenesis of asthma." Allergol Int **57**(1): 1-10.
- Holgate, S. T. (2011). "The sentinel role of the airway epithelium in asthma pathogenesis." Immunol Rev **242**(1): 205-19.
- Holgate, S. T. and R. Polosa (2006). "The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults." Lancet **368**(9537): 780-93.
- Holgate, S. T. and R. Polosa (2008). "Treatment strategies for allergy and asthma." Nat Rev Immunol **8**(3): 218-30.
- Hopfenspirger, M. T. and D. K. Agrawal (2002). "Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice." J Immunol **168**(5): 2516-22.
- Hori, S., T. Nomura and S. Sakaguchi (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Hossain, M., Y. Okubo, S. Horie and M. Sekiguchi (1996). "Analysis of recombinant human tumour necrosis factor-alpha-induced CD4 expression on human eosinophils." Immunology **88**(2): 301-7.
- Hou, Q., T. Zhao, H. Zhang, H. Lu, Q. Zhang, L. Sun and Z. Fan (2008). "Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage." Mol Immunol **45**(4): 1044-55.
- Houchins, J. P., T. Yabe, C. McSherry and F. H. Bach (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." J Exp Med **173**(4): 1017-20.
- Hua, G., Q. Zhang and Z. Fan (2007). "Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis." J Biol Chem **282**(28): 20553-60.
- Huang, H. and J. Xiang (2004). "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 **109**(6): 817-25.
- Hughes, T., B. Becknell, S. McClory, E. Briercheck, A. G. Freud, X. Zhang, H. Mao, G. Nuovo, J. Yu and M. A. Caligiuri (2009). "Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22." Blood **113**(17): 4008-10.
- Humbles, A. A., C. M. Lloyd, S. J. McMillan, D. S. Friend, G. Xanthou, E. E. McKenna, S. Ghiran, N. P. Gerard, C. Yu, S. H. Orkin and C. Gerard (2004). "A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling." Science **305**(5691): 1776-9.
- Humrich, J. Y., J. H. Humrich, M. Averbeck, P. Thumann, C. Termeer, E. Kampgen, G. Schuler and L. Jenne (2006). "Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration." Immunology **117**(2): 238-47.
- Huntington, N. D., N. Legrand, N. L. Alves, B. Jaron, K. Weijer, A. Plet, E. Corcuff, E. Mortier, Y. Jacques, H. Spits and J. P. Di Santo (2009). "IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo." J Exp Med **206**(1): 25-34.
- Huntington, N. D., H. Puthalakath, P. Gunn, E. Naik, E. M. Michalak, M. J. Smyth, H. Tabarias, M. A. Degli-Esposti, G. Dewson, S. N. Willis, N. Motoyama, D. C. Huang, S. L. Nutt, D. M. Tarlinton and A. Strasser (2007). "Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1." Nat Immunol **8**(8): 856-63.
- Hviid, A. and M. Melbye (2008). "Measles-mumps-rubella vaccination and asthma-like disease in early childhood." Am J Epidemiol **168**(11): 1277-83.

I

- Ikeda, K., H. Nakajima, K. Suzuki, S. Kagami, K. Hirose, A. Suto, Y. Saito and I. Iwamoto (2003). "Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation." Blood **101**(9): 3594-6.
- Ikutani, M., T. Yanagibashi, M. Ogasawara, K. Tsuneyama, S. Yamamoto, Y. Hattori, T. Kouro, A. Itakura, Y. Nagai, S. Takaki and K. Takatsu (2012). "Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity." J Immunol **188**(2): 703-13.
- Imai, K., S. Matsuyama, S. Miyake, K. Suga and K. Nakachi (2000). "Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population." Lancet **356**(9244): 1795-9.
- Imai, T., T. Yoshida, M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki and O. Yoshie (1996). "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 **271**(35): 21514-21.
- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, M. C. Byrne and T. Kamradt (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." J Immunol **165**(11): 6107-15.
- Inngjerdengen, M., B. Damaj and A. A. Maghazachi (2000). "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 **164**(8): 4048-54.
- Inoue, Y., Y. Matsuwaki, S. H. Shin, J. U. Ponikau and H. Kita (2005). "Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils." J Immunol **175**(8): 5439-47.
- Irani, A. M., T. R. Bradford, C. L. Kepley, N. M. Schechter and L. B. Schwartz (1989). "Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies." J Histochem Cytochem **37**(10): 1509-15.
- Ishigami, S., S. Natsugoe, K. Tokuda, A. Nakajo, C. Xiangming, H. Iwashige, K. Aridome, S. Hokita and T. Aikou (2000). "Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer." Cancer Lett **159**(1): 103-8.
- Islam, S. A., M. F. Ling, J. Leung, W. G. Shreffler and A. D. Luster (2013). "Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor." J Exp Med **210**(10): 1889-98.
- Ito, T., Y. H. Wang, O. Duramad, T. Hori, G. J. Delespesse, N. Watanabe, F. X. Qin, Z. Yao, W. Cao and Y. J. Liu (2005). "TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand." J Exp Med **202**(9): 1213-23.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-33.
- Iwamoto, S., M. Ishida, K. Takahashi, K. Takeda and A. Miyazaki (2005). "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 **78**(2): 383-92.

J

- Jackson, D. J. and S. L. Johnston (2010). "The role of viruses in acute exacerbations of asthma." J Allergy Clin Immunol **125**(6): 1178-87; quiz 1188-9.
- Jacobs, R., G. Hintzen, A. Kemper, K. Beul, S. Kempf, G. Behrens, K. W. Sykora and R. E. Schmidt (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." Eur J Immunol **31**(10): 3121-7.
- Jacobs, R., M. Stoll, G. Stratmann, R. Leo, H. Link and R. E. Schmidt (1992). "CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation." Blood **79**(12): 3239-44.
- Jacobsen, E. A., S. I. Ochkur, N. A. Lee and J. J. Lee (2007). "Eosinophils and asthma." Curr Allergy Asthma Rep **7**(1): 18-26.
- Jacobsen, E. A., S. I. Ochkur, R. S. Pero, A. G. Taranova, C. A. Protheroe, D. C. Colbert, N. A. Lee and J. J. Lee (2008). "Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells." J Exp Med **205**(3): 699-710.

- Jacobsen, E. A., K. R. Zellner, D. Colbert, N. A. Lee and J. J. Lee "Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation." J Immunol **187**(11): 6059-68.
- Jacobsen, E. A., K. R. Zellner, D. Colbert, N. A. Lee and J. J. Lee (2011). "Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation." J Immunol **187**(11): 6059-68.
- Jacoby, D. B., R. M. Costello and A. D. Fryer (2001). "Eosinophil recruitment to the airway nerves." J Allergy Clin Immunol **107**(2): 211-8.
- Jaeger, B. N., J. Donadieu, C. Cagnet, C. Bernat, D. Ordonez-Rueda, V. Barlogis, N. Mahlaoui, A. Fenis, E. Narni-Mancinelli, B. Beaupain, C. Bellanne-Chantelot, M. Bajenoff, B. Malissen, M. Malissen, E. Vivier and S. Ugolini (2012). "Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis." J Exp Med **209**(3): 565-80.
- Jahnsen, F. L., D. H. Strickland, J. A. Thomas, I. T. Tobagus, S. Napoli, G. R. Zosky, D. J. Turner, P. D. Sly, P. A. Stumbles and P. G. Holt (2006). "Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus." J Immunol **177**(9): 5861-7.
- James, A. L., L. J. Palmer, E. Kicic, P. S. Maxwell, S. E. Lagan, G. F. Ryan and A. W. Musk (2005). "Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking." Am J Respir Crit Care Med **171**(2): 109-14.
- Jamieson, A. M., P. Isnard, J. R. Dorfman, M. C. Coles and D. H. Raulet (2004). "Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions." J Immunol **172**(2): 864-70.
- Jeffery, P. K. and T. Haahtela (2006). "Allergic rhinitis and asthma: inflammation in a one-airway condition." BMC Pulm Med **6 Suppl 1**: S5.
- Jonjic, S., M. Babic, B. Polic and A. Krmpotic (2008). "Immune evasion of natural killer cells by viruses." Curr Opin Immunol **20**(1): 30-8.
- Jonsson, F., D. A. Mancardi, Y. Kita, H. Karasuyama, B. Iannascoli, N. Van Rooijen, T. Shimizu, M. Daeron and P. Bruhns "Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis." J Clin Invest **121**(4): 1484-96.
- Jonsson, F., D. A. Mancardi, Y. Kita, H. Karasuyama, B. Iannascoli, N. Van Rooijen, T. Shimizu, M. Daeron and P. Bruhns (2011). "Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis." J Clin Invest **121**(4): 1484-96.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop and A. H. Enk (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.
- Jouault, T., M. El Abed-El Behi, M. Martinez-Esparza, L. Breuilh, P. A. Trinel, M. Chamailard, F. Trottein and D. Poulain (2006). "Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling." J Immunol **177**(7): 4679-87.
- Juelke, K., M. Killig, M. Luetke-Eversloh, E. Parente, J. Gruen, B. Morandi, G. Ferlazzo, A. Thiel, I. Schmitt-Knosalla and C. Romagnani (2010). "CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells." Blood **116**(8): 1299-307.
- Jutel, M., K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "Histamine in allergic inflammation and immune modulation." Int Arch Allergy Immunol **137**(1): 82-92.

K

- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." Nature **369**(6475): 31-7.
- Kaminuma, O., F. Kitamura, N. Kitamura, M. Miyagishi, K. Taira, K. Yamamoto, O. Miura and S. Miyatake (2004). "GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements." FEBS Lett **570**(1-3): 63-8.

- Kano, G., M. Almanan, B. S. Bochner and N. Zimmermann (2013). "Mechanism of Siglec-8-mediated cell death in IL-5-activated eosinophils: role for reactive oxygen species-enhanced MEK/ERK activation." *J Allergy Clin Immunol* **132**(2): 437-45.
- Karre, K. (2008). "Natural killer cell recognition of missing self." *Nat Immunol* **9**(5): 477-80.
- Karre, K., H. G. Ljunggren, G. Piontek and R. Kiessling (1986). "Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy." *Nature* **319**(6055): 675-8.
- Kashii, Y., R. Giorda, R. B. Herberman, T. L. Whiteside and N. L. Vujanovic (1999). "Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells." *J Immunol* **163**(10): 5358-66.
- Kashyap, M., Y. Rochman, R. Spolski, L. Samsel and W. J. Leonard "Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells." *J Immunol* **187**(3): 1207-11.
- Kashyap, M., Y. Rochman, R. Spolski, L. Samsel and W. J. Leonard (2011). "Thymic stromal lymphopoietin is produced by dendritic cells." *J Immunol* **187**(3): 1207-11.
- Kaspar, A. A., S. Okada, J. Kumar, F. R. Poulain, K. A. Drouvalakis, A. Kelekar, D. A. Hanson, R. M. Kluck, Y. Hitoshi, D. E. Johnson, C. J. Froelich, C. B. Thompson, D. D. Newmeyer, A. Anel, C. Clayberger and A. M. Krensky (2001). "A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin." *J Immunol* **167**(1): 350-6.
- Kataoka, T., N. Shinohara, H. Takayama, K. Takaku, S. Kondo, S. Yonehara and K. Nagai (1996). "Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **156**(10): 3678-86.
- Kaur, D., C. Doe, L. Woodman, W. Y. Wan, A. Sutcliffe, F. Hollins and C. Brightling (2012). "Mast cell-airway smooth muscle crosstalk: the role of thymic stromal lymphopoietin." *Chest* **142**(1): 76-85.
- Kayaba, H., D. Dombrowicz, G. Woerly, J. P. Papin, S. Loiseau and M. Capron (2001). "Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon receptor activation." *J Immunol* **167**(2): 995-1003.
- Kayagaki, N., N. Yamaguchi, M. Nakayama, K. Takeda, H. Akiba, H. Tsutsui, H. Okamura, K. Nakanishi, K. Okumura and H. Yagita (1999). "Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells." *J Immunol* **163**(4): 1906-13.
- Kearley, J., J. E. Barker, D. S. Robinson and C. M. Lloyd (2005). "Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent." *J Exp Med* **202**(11): 1539-47.
- Kelly, J. M., P. K. Darcy, J. L. Markby, D. I. Godfrey, K. Takeda, H. Yagita and M. J. Smyth (2002). "Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection." *Nat Immunol* **3**(1): 83-90.
- Kelly, J. M., N. J. Waterhouse, E. Cretney, K. A. Browne, S. Ellis, J. A. Trapani and M. J. Smyth (2004). "Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death." *J Biol Chem* **279**(21): 22236-42.
- Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleyensteuber, D. A. Largaespada, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall and et al. (1994). "Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine." *Science* **266**(5189): 1395-9.
- Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce and J. J. Peschon (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." *J Exp Med* **191**(5): 771-80.
- Kikuchi-Maki, A., T. L. Catina and K. S. Campbell (2005). "Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein." *J Immunol* **174**(7): 3859-63.
- Kim, H. B., C. K. Kim, K. Iijima, T. Kobayashi and H. Kita (2009). "Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum." *Chest* **135**(2): 295-302.

- Kim, P. J., S. Y. Pai, M. Brigl, G. S. Besra, J. Gumperz and I. C. Ho (2006). "GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells." *J Immunol* **177**(10): 6650-9.
- Kim, Y. S., H. M. Ko, N. I. Kang, C. H. Song, X. Zhang, W. C. Chung, J. H. Kim, I. H. Choi, Y. M. Park, G. Y. Kim, S. Y. Im and H. K. Lee (2007). "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* **37**(4): 1107-15.
- Kiwamoto, T., N. Kawasaki, J. C. Paulson and B. S. Bochner (2012). "Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions." *Pharmacol Ther* **135**(3): 327-36.
- Klein, L. M., R. M. Lavker, W. L. Matis and G. F. Murphy (1989). "Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8972-6.
- Knight, D. A. and S. T. Holgate (2003). "The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease." *Respirology* **8**(4): 432-46.
- Kodelja, V., S. Kraft, O. Politz, N. Hakij, R. Treudler, C. E. Orfanos, T. Bieber and S. Goerdts (1998a). "Langerhans cells do not express alternative macrophage activation-associated CC chemokine (AMAC)-1." *Res Immunol* **149**(7-8): 633-7.
- Kodelja, V., C. Muller, O. Politz, N. Hakij, C. E. Orfanos and S. Goerdts (1998b). "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* **160**(3): 1411-8.
- Kollert, F., C. Probst, J. Muller-Quernheim, G. Zissel and A. Prasse (2009). "CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers." *Inflammation* **32**(3): 163-8.
- Kondo, Y., T. Yoshimoto, K. Yasuda, S. Futatsugi-Yumikura, M. Morimoto, N. Hayashi, T. Hoshino, J. Fujimoto and K. Nakanishi (2008). "Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system." *Int Immunol* **20**(6): 791-800.
- Korsgren, M., C. G. Persson, F. Sundler, T. Bjerke, T. Hansson, B. J. Chambers, S. Hong, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren and O. Korsgren (1999). "Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice." *J Exp Med* **189**(3): 553-62.
- Kouros-Mehr, H., E. M. Slorach, M. D. Sternlicht and Z. Werb (2006). "GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland." *Cell* **127**(5): 1041-55.
- Kraft, S. and J. P. Kinet (2007). "New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 365-78.
- Kroegel, C., J. C. Virchow, Jr., W. Luttmann, C. Walker and J. A. Warner (1994a). "Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I)." *Eur Respir J* **7**(3): 519-43.
- Kroegel, C., J. A. Warner, J. C. Virchow, Jr. and H. Matthys (1994b). "Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part II)." *Eur Respir J* **7**(4): 743-60.
- Krohn, S., A. Garin, C. Gabay and A. E. Proudfoot (2013a). "The Activity of CCL18 is Principally Mediated through Interaction with Glycosaminoglycans." *Front Immunol* **4**: 193.
- Krohn, S. C., P. Bonvin and A. E. Proudfoot (2013b). "CCL18 exhibits a regulatory role through inhibition of receptor and glycosaminoglycan binding." *PLoS One* **8**(8): e72321.
- Krummel, M. F., M. D. Sjaastad, C. Wulfiging and M. M. Davis (2000). "Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition." *Science* **289**(5483): 1349-52.
- Kudlacz, E., C. Whitney, C. Andresen and M. Conklyn (2002). "Functional effects of eotaxin are selectively upregulated on IL-5 transgenic mouse eosinophils." *Inflammation* **26**(3): 111-9.
- Kumar, D., J. Hosse, C. von Toerne, E. Noessner and P. J. Nelson (2009). "JNK MAPK pathway regulates constitutive transcription of CCL5 by human NK cells through SP1." *J Immunol* **182**(2): 1011-20.
- Kuritzkes, D. R. (2000). "Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor." *Clin Infect Dis* **30**(2): 256-60.

L

- Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. Velazquez, A. B. Kay and R. Moqbel (1998). "Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma." *Blood* **91**(7): 2508-16.
- Lacy, P., S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. R. Velazquez, S. F. Man and R. Moqbel (1999). "Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils." *Blood* **94**(1): 23-32.
- Lamblin, C., P. Gosset, I. Tillie-Leblond, F. Saulnier, C. H. Marquette, B. Wallaert and A. B. Tonnel (1998). "Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(2): 394-402.
- Lambrecht, B. N., M. De Veerman, A. J. Coyle, J. C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans and R. A. Pauwels (2000). "Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation." *J Clin Invest* **106**(4): 551-9.
- Lanier, L. L. (1998). "NK cell receptors." *Annu Rev Immunol* **16**: 359-93.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lanier, L. L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." *Nat Immunol* **9**(5): 495-502.
- Lanier, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong and J. H. Phillips (1998). "Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells." *Nature* **391**(6668): 703-7.
- Lanier, L. L., A. M. Le, C. I. Civin, M. R. Loken and J. H. Phillips (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* **136**(12): 4480-6.
- Latinovic-Golic, S., M. Walch, H. Sundstrom, C. Dumrese, P. Groscurth and U. Ziegler (2007). "Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes." *BMC Immunol* **8**: 9.
- Lauzon, N. M., F. Mian, R. MacKenzie and A. A. Ashkar (2006). "The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity." *Cell Immunol* **241**(2): 102-12.
- Law, R. H., N. Lukyanova, I. Voskoboinik, T. T. Caradoc-Davies, K. Baran, M. A. Dunstone, M. E. D'Angelo, E. V. Orlova, F. Coulibaly, S. Verschoor, K. A. Browne, A. Ciccone, M. J. Kuiper, P. I. Bird, J. A. Trapani, H. R. Saibil and J. C. Whisstock (2010). "The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin." *Nature* **468**(7322): 447-51.
- Lazetic, S., C. Chang, J. P. Houchins, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." *J Immunol* **157**(11): 4741-5.
- Lee, J. J., D. Dimina, M. P. Macias, S. I. Ochkur, M. P. McGarry, K. R. O'Neill, C. Protheroe, R. Pero, T. Nguyen, S. A. Cormier, E. Lenkiewicz, D. Colbert, L. Rinaldi, S. J. Ackerman, C. G. Irvin and N. A. Lee (2004). "Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils." *Science* **305**(5691): 1773-6.
- Lee, J. J., M. P. McGarry, S. C. Farmer, K. L. Denzler, K. A. Larson, P. E. Carrigan, I. E. Brenneise, M. A. Horton, A. Haczku, E. W. Gelfand, G. D. Leikauf and N. A. Lee (1997). "Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma." *J Exp Med* **185**(12): 2143-56.
- Lee, N., M. Llano, M. Carretero, A. Ishitani, F. Navarro, M. Lopez-Botet and D. E. Geraghty (1998). "HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5199-204.
- Lee, S. H., T. Miyagi and C. A. Biron (2007). "Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare." *Trends Immunol* **28**(6): 252-9.
- Leech, M. D., R. A. Benson, A. De Vries, P. M. Fitch and S. E. Howie (2007). "Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells." *J Immunol* **179**(10): 7050-8.

- Lei, L., Y. Zhang, W. Yao, M. H. Kaplan and B. Zhou (2011). "Thymic stromal lymphopoietin interferes with airway tolerance by suppressing the generation of antigen-specific regulatory T cells." J Immunol **186**(4): 2254-61.
- Leonardi-Bee, J., D. Pritchard and J. Britton (2006). "Asthma and current intestinal parasite infection: systematic review and meta-analysis." Am J Respir Crit Care Med **174**(5): 514-23.
- Leung, S. Y., S. T. Yuen, K. M. Chu, J. A. Mathy, R. Li, A. S. Chan, S. Law, J. Wong, X. Chen and S. So (2004). "Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer." Gastroenterology **127**(2): 457-69.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Kohl, Y. Belkaid and M. Wills-Karp (2005). "CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function." J Exp Med **202**(11): 1549-61.
- Li, C., B. Ge, M. Nicotra, J. N. Stern, H. D. Kopcow, X. Chen and J. L. Strominger (2008a). "JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3017-22.
- Li, X., T. Syrovets, S. Paskas, Y. Laumonnier and T. Simmet (2008b). "Mature dendritic cells express functional thrombin receptors triggering chemotaxis and CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine induction." J Immunol **181**(2): 1215-23.
- Lieberman, J. (2003). "The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal." Nat Rev Immunol **3**(5): 361-70.
- Limatola, C., S. Di Bartolomeo, M. Catalano, F. Trettel, S. Fucile, L. Castellani and F. Eusebi (2005). "Cysteine residues are critical for chemokine receptor CXCR2 functional properties." Exp Cell Res **307**(1): 65-75.
- Lindhout, E., J. L. Vissers, F. C. Hartgers, R. J. Huijbens, N. M. Scharenborg, C. G. Figdor and G. J. Adema (2001). "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 **166**(5): 3284-9.
- Ling, E. M., T. Smith, X. D. Nguyen, C. Pridgeon, M. Dallman, J. Arbery, V. A. Carr and D. S. Robinson (2004). "Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease." Lancet **363**(9409): 608-15.
- Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L. M. Araujo, P. Hachem, J. M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B. B. Vargaftig, A. Herbelin and M. C. Leite-de-Moraes (2003). "Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model." J Immunol **171**(4): 1637-41.
- Liu, C., Y. Lou, G. Lizee, H. Qin, S. Liu, B. Rabinovich, G. J. Kim, Y. H. Wang, Y. Ye, A. G. Sikora, W. W. Overwijk, Y. J. Liu, G. Wang and P. Hwu (2008). "Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice." J Clin Invest **118**(3): 1165-75.
- Liu, X., M. Li, Y. Wu, Y. Zhou, L. Zeng and T. Huang (2009a). "Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma." Biochem Biophys Res Commun **386**(1): 181-5.
- Liu, Y. J. (2006). "Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation." J Exp Med **203**(2): 269-73.
- Liu, Y. J. (2007). "Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **120**(2): 238-44; quiz 245-6.
- Liu, Z., L. Yang, Y. Cui, X. Wang, C. Guo, Z. Huang, Q. Kan and Y. Liu (2009b). "IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **15**(8): 1133-44.
- Llano, M., N. Lee, F. Navarro, P. Garcia, J. P. Albar, D. E. Geraghty and M. Lopez-Botet (1998). "HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer." Eur J Immunol **28**(9): 2854-63.

- Lodolce, J. P., D. L. Boone, S. Chai, R. E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin and A. Ma (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." *Immunity* **9**(5): 669-76.
- Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release." *J Immunol* **156**(1): 322-7.
- Lopez, A. F., C. G. Begley, D. J. Williamson, D. J. Warren, M. A. Vadas and C. J. Sanderson (1986). "Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells." *J Exp Med* **163**(5): 1085-99.
- Lotfi, R., G. I. Herzog, R. A. DeMarco, D. Beer-Stolz, J. J. Lee, A. Rubartelli, H. Schrezenmeier and M. T. Lotze (2009). "Eosinophils oxidize damage-associated molecular pattern molecules derived from stressed cells." *J Immunol* **183**(8): 5023-31.
- Lotzova, E., C. A. Savary and R. E. Champlin (1993). "Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33- bone marrow progenitors." *J Immunol* **150**(12): 5263-9.
- Lou, Z., D. Jevremovic, D. D. Billadeau and P. J. Leibson (2000). "A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing." *J Exp Med* **191**(2): 347-54.
- Loza, M. J. and B. Perussia (2004). "The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions." *J Immunol* **172**(1): 88-96.
- Lu, H., Q. Hou, T. Zhao, H. Zhang, Q. Zhang, L. Wu and Z. Fan (2006). "Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation." *J Immunol* **177**(2): 1171-8.
- Lu, L., K. Ikizawa, D. Hu, M. B. Werneck, K. W. Wucherpfennig and H. Cantor (2007). "Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway." *Immunity* **26**(5): 593-604.
- Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele and A. Diefenbach (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." *Immunity* **26**(4): 503-17.
- Lucey, D. R., D. I. Dorsky, A. Nicholson-Weller and P. F. Weller (1989). "Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120." *J Exp Med* **169**(1): 327-32.
- Luci, C., C. Gaudy-Marqueste, P. Rouzairre, S. Audonnet, C. Cognet, A. Hennino, J. F. Nicolas, J. J. Grob and E. Tomasello (2011). "Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis." *Br J Dermatol* **166**(4): 789-96.
- Luci, C., C. Gaudy-Marqueste, P. Rouzairre, S. Audonnet, C. Cognet, A. Hennino, J. F. Nicolas, J. J. Grob and E. Tomasello (2012). "Peripheral natural killer cells exhibit qualitative and quantitative changes in patients with psoriasis and atopic dermatitis." *Br J Dermatol* **166**(4): 789-96.
- Luci, C., A. Reynders, Ivanov, II, C. Cognet, L. Chiche, L. Chasson, J. Hardwigsen, E. Anguiano, J. Banchereau, D. Chaussabel, M. Dalod, D. R. Littman, E. Vivier and E. Tomasello (2009). "Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin." *Nat Immunol* **10**(1): 75-82.
- Luci, C. and E. Tomasello (2008). "Natural killer cells: detectors of stress." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(11): 2335-40.
- Lungarella, G., R. Menegazzi, C. Gardi, P. Spessotto, M. M. de Santi, P. Bertocin, P. Patriarca, P. Calzoni and G. Zabucchi (1992). "Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization." *Arch Biochem Biophys* **292**(1): 128-35.
- Luster, A. D. and M. E. Rothenberg (1997). "Role of the monocyte chemoattractant protein and eotaxin subfamily of chemokines in allergic inflammation." *J Leukoc Biol* **62**(5): 620-33.
- Luttmann, W., B. Knoechel, M. Foerster, H. Matthys, J. C. Virchow, Jr. and C. Kroegel (1996). "Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability." *J Immunol* **157**(4): 1678-83.

M

- Ma, Y., J. Zhao, Z. R. Han, Y. Chen, T. F. Leung and G. W. Wong (2009). "Very low prevalence of asthma and allergies in schoolchildren from rural Beijing, China." *Pediatr Pulmonol* **44**(8): 793-9.

- MacDonald, G., L. Shi, C. Vande Velde, J. Lieberman and A. H. Greenberg (1999). "Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis." J Exp Med **189**(1): 131-44.
- MacGlashan, D., Jr. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." Curr Opin Immunol **20**(6): 717-23.
- MacKenzie, J. R., J. Mattes, L. A. Dent and P. S. Foster (2001). "Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function." J Immunol **167**(6): 3146-55.
- Maddox, L. and D. A. Schwartz (2002). "The pathophysiology of asthma." Annu Rev Med **53**: 477-98.
- Maghazachi, A. A. (2010). "Role of chemokines in the biology of natural killer cells." Curr Top Microbiol Immunol **341**: 37-58.
- Maghazachi, A. A., B. S. Skalhegg, B. Rolstad and A. Al-Aoukaty (1997). "Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins." Faseb J **11**(10): 765-74.
- Mahmudi-Azer, S., G. P. Downey and R. Moqbel (2002). "Translocation of the tetraspanin CD63 in association with human eosinophil mediator release." Blood **99**(11): 4039-47.
- Mahrus, S. and C. S. Craik (2005). "Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells." Chem Biol **12**(5): 567-77.
- Mailliard, R. B., Y. I. Son, R. Redlinger, P. T. Coates, A. Giermasz, P. A. Morel, W. J. Storkus and P. Kalinski (2003). "Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function." J Immunol **171**(5): 2366-73.
- Mamessier, E., K. Botturi, D. Vervloet and A. Magnan (2005). "[T regulatory lymphocytes, atopy and asthma: a new concept in three dimensions]." Rev Mal Respir **22**(2 Pt 1): 305-11.
- Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell and A. Porgador (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells." Nature **409**(6823): 1055-60.
- Mantovani, A., R. Bonecchi and M. Locati (2006). "Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more." Nat Rev Immunol **6**(12): 907-18.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-86.
- Marone, G., M. Triggiani and A. de Paulis (2005). "Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma?" Trends Immunol **26**(1): 25-31.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." Nat Immunol **5**(12): 1260-5.
- Matos, M. E., G. S. Schnier, M. S. Beecher, L. K. Ashman, D. E. William and M. A. Caligiuri (1993). "Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells." J Exp Med **178**(3): 1079-84.
- Matsumoto, K., R. P. Schleimer, H. Saito, Y. Iikura and B. S. Bochner (1995). "Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro." Blood **86**(4): 1437-43.
- Matsumoto, K., M. Terakawa, K. Miura, S. Fukuda, T. Nakajima and H. Saito (2004). "Extremely rapid and intense induction of apoptosis in human eosinophils by anti-CD30 antibody treatment in vitro." J Immunol **172**(4): 2186-93.
- Matsumoto, N., S. Katoh, H. Mukae, T. Matsuo, K. Takatsu and S. Matsukura (2003). "Critical role of IL-5 in antigen-induced pulmonary eosinophilia, but not in lymphocyte activation." Int Arch Allergy Immunol **130**(3): 209-15.
- Mawhorter, S. D., J. W. Kazura and W. H. Boom (1994). "Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation." Immunology **81**(4): 584-91.
- Mayol, K., V. Biajoux, J. Marvel, K. Balabanian and T. Walzer (2011). "Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking." Blood **118**(18): 4863-71.

- McCreanor, J., P. Cullinan, M. J. Nieuwenhuijsen, J. Stewart-Evans, E. Malliarou, L. Jarup, R. Harrington, M. Svartengren, I. K. Han, P. Ohman-Strickland, K. F. Chung and J. Zhang (2007). "Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma." N Engl J Med **357**(23): 2348-58.
- Meerschaert, J., W. W. Busse, P. J. Bertics and D. F. Mosher (2000). "CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(6): 780-7.
- Mignot, G., E. Ullrich, M. Bonmort, C. Menard, L. Apetoh, J. Taieb, D. Bosisio, S. Sozzani, M. Ferrantini, J. Schmitz, M. Mack, B. Ryffel, S. Bulfone-Paus, L. Zitvogel and N. Chaput (2008). "The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2." J Immunol **180**(10): 6477-83.
- Miike, S. and H. Kita (2003). "Human eosinophils are activated by cysteine proteases and release inflammatory mediators." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 704-13.
- Miller, J. S. and V. McCullar (2001). "Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2." Blood **98**(3): 705-13.
- Miller, J. S., V. McCullar, M. Punzel, I. R. Lemischka and K. A. Moore (1999). "Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells." Blood **93**(1): 96-106.
- Min, B. and W. E. Paul (2008). "Basophils: in the spotlight at last." Nat Immunol **9**(3): 223-5.
- Mionnet, C., V. Buatois, A. Kanda, V. Milcent, S. Fleury, D. Lair, M. Langelot, Y. Lacoeyille, E. Hessel, R. Coffman, A. Magnan, D. Dombrowicz, N. Glaichenhaus and V. Julia "CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung." Nat Med **16**(11): 1305-12.
- Mitsuoka, C., K. Ohmori, N. Kimura, A. Kanamori, S. Komba, H. Ishida, M. Kiso and R. Kannagi (1999). "Regulation of selectin binding activity by cyclization of sialic acid moiety of carbohydrate ligands on human leukocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1597-602.
- Mjosberg, J. M., S. Trifari, N. K. Crellin, C. P. Peters, C. M. van Drunen, B. Piet, W. J. Fokkens, T. Cupedo and H. Spits "Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161." Nat Immunol **12**(11): 1055-62.
- Mjosberg, J. M., S. Trifari, N. K. Crellin, C. P. Peters, C. M. van Drunen, B. Piet, W. J. Fokkens, T. Cupedo and H. Spits (2011). "Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161." Nat Immunol **12**(11): 1055-62.
- Mocikat, R., H. Braumuller, A. Gumy, O. Egeter, H. Ziegler, U. Reusch, A. Bubeck, J. Louis, R. Mailhammer, G. Riethmuller, U. Koszinowski and M. Rocken (2003). "Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses." Immunity **19**(4): 561-9.
- Moffett-King, A. (2002). "Natural killer cells and pregnancy." Nat Rev Immunol **2**(9): 656-63.
- Moingeon, P., J. L. Lucich, D. J. McConkey, F. Letourneur, B. Malissen, J. Kochan, H. C. Chang, H. R. Rodewald and E. L. Reinherz (1992). "CD3 zeta dependence of the CD2 pathway of activation in T lymphocytes and natural killer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(4): 1492-6.
- Molet, S., Q. Hamid, F. Davoine, E. Nutku, R. Taha, N. Page, R. Olivenstein, J. Elias and J. Chakir (2001). "IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines." J Allergy Clin Immunol **108**(3): 430-8.
- Monteseirin, J., A. Vega, P. Chacon, M. J. Camacho, R. El Bekay, J. A. Asturias, A. Martinez, P. Guardia, R. Perez-Cano and J. Conde (2007). "Neutrophils as a novel source of eosinophil cationic protein in IgE-mediated processes." J Immunol **179**(4): 2634-41.
- Monticelli, L. A., G. F. Sonnenberg, M. C. Abt, T. Alenghat, C. G. Ziegler, T. A. Doering, J. M. Angelosanto, B. J. Laidlaw, C. Y. Yang, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. Turner, J. M. Diamond, A. W. Goldrath, D. L. Farber, R. G. Collman, E. J. Wherry and D. Artis "Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus." Nat Immunol **12**(11): 1045-54.
- Monticelli, L. A., G. F. Sonnenberg, M. C. Abt, T. Alenghat, C. G. Ziegler, T. A. Doering, J. M. Angelosanto, B. J. Laidlaw, C. Y. Yang, T. Sathaliyawala, M. Kubota, D. Turner, J. M. Diamond,

- A. W. Goldrath, D. L. Farber, R. G. Collman, E. J. Wherry and D. Artis (2011). "Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus." Nat Immunol **12**(11): 1045-54.
- 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): 239-43.
- Moon, P. D. and H. M. Kim (2011). "Thymic stromal lymphopoietin is expressed and produced by caspase-1/NF-kappaB pathway in mast cells." Cytokine **54**(3): 239-43.
- Morel, P. A., L. K. Ernst and D. Metes (1999). "Functional CD32 molecules on human NK cells." Leuk Lymphoma **35**(1-2): 47-56.
- Moretta, A., R. Biassoni, C. Bottino, M. C. Mingari and L. Moretta (2000). "Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity." Immunol Today **21**(5): 228-34.
- Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni and L. Moretta (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." Annu Rev Immunol **19**: 197-223.
- Moretta, A., F. Locatelli and L. Moretta (2008). "Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias." Immunol Rev **224**: 58-69.
- Moretta, A., E. Marcenaro, S. Sivori, M. Della Chiesa, M. Vitale and L. Moretta (2005). "Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues." Trends Immunol **26**(12): 668-75.
- Moretta, L., G. Ferlazzo, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, M. C. Mingari and A. Moretta (2006). "Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions." Immunol Rev **214**: 219-28.
- Moretta, L. and A. Moretta (2004). "Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors." Embo J **23**(2): 255-9.
- Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii and S. Koyasu "Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells." Nature **463**(7280): 540-4.
- Moro, K., T. Yamada, M. Tanabe, T. Takeuchi, T. Ikawa, H. Kawamoto, J. Furusawa, M. Ohtani, H. Fujii and S. Koyasu (2010). "Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells." Nature **463**(7280): 540-4.
- Morrison, B. E., S. J. Park, J. M. Mooney and B. Mehrad (2003). "Chemokine-mediated recruitment of NK cells is a critical host defense mechanism in invasive aspergillosis." J Clin Invest **112**(12): 1862-70.
- Mould, A. W., K. I. Matthaei, I. G. Young and P. S. Foster (1997). "Relationship between interleukin-5 and eotaxin in regulating blood and tissue eosinophilia in mice." J Clin Invest **99**(5): 1064-71.
- Moussion, C., N. Ortega and J. P. Girard (2008). "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 **3**(10): e3331.
- Moy, J. N., L. L. Thomas and L. C. Whisler (1993). "Eosinophil major basic protein enhances the expression of neutrophil CR3 and p150,95." J Allergy Clin Immunol **92**(4): 598-606.
- Mrozek, E., P. Anderson and M. A. Caligiuri (1996). "Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells." Blood **87**(7): 2632-40.
- Mueller-Loebnitz, C., H. Ostermann, A. Franzke, J. Loeffler, L. Uharek, M. Topp and H. Einsele (2013). "Immunological aspects of Candida and Aspergillus systemic fungal infections." Interdiscip Perspect Infect Dis **2013**: 102934.
- Munitz, A., I. Bachelet, R. Eliashar, M. Khodoun, F. D. Finkelman, M. E. Rothenberg and F. Levi-Schaffer (2006). "CD48 is an allergen and IL-3-induced activation molecule on eosinophils." J Immunol **177**(1): 77-83.

N

- Nagase, H., S. Okugawa, Y. Ota, M. Yamaguchi, H. Tomizawa, K. Matsushima, K. Ohta, K. Yamamoto and K. Hirai (2003). "Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand." *J Immunol* **171**(8): 3977-82.
- Nakae, S., L. H. Ho, M. Yu, R. Monteforte, M. Iikura, H. Suto and S. J. Galli (2007). "Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice." *J Allergy Clin Immunol* **120**(1): 48-55.
- Nakajima, H., J. Samaridis, L. Angman and M. Colonna (1999). "Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain." *J Immunol* **162**(1): 5-8.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* **194**(5): 629-44.
- Nakamura, Y., M. Azuma, Y. Okano, T. Sano, T. Takahashi, Y. Ohmoto and S. Sone (1996). "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* **15**(5): 680-7.
- Narni-Mancinelli, E., J. Chaix, A. Fenis, Y. M. Kerdiles, N. Yessaad, A. Reynders, C. Gregoire, H. Luche, S. Ugolini, E. Tomasello, T. Walzer and E. Vivier (2011a). "Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the Nkp46 cell surface receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(45): 18324-9.
- Narni-Mancinelli, E., E. Vivier and Y. M. Kerdiles (2011b). "The 'T-cell-ness' of NK cells: unexpected similarities between NK cells and T cells." *Int Immunol* **23**(7): 427-31.
- Nausch, N. and A. Cerwenka (2008). "NKG2D ligands in tumor immunity." *Oncogene* **27**(45): 5944-58.
- Nawijn, M. C., G. M. Dingjan, R. Ferreira, B. N. Lambrecht, A. Karis, F. Grosveld, H. Savelkoul and R. W. Hendriks (2001). "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* **167**(2): 724-32.
- Nedvetzki, S., S. Sowinski, R. A. Eagle, J. Harris, F. Vely, D. Pende, J. Trowsdale, E. Vivier, S. Gordon and D. M. Davis (2007). "Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses." *Blood* **109**(9): 3776-85.
- Neel, N. F., E. Schutysse, J. Sai, G. H. Fan and A. Richmond (2005). "Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking." *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(6): 637-58.
- Neill, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin and A. N. McKenzie "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* **464**(7293): 1367-70.
- Neill, D. R., S. H. Wong, A. Bellosi, R. J. Flynn, M. Daly, T. K. Langford, C. Bucks, C. M. Kane, P. G. Fallon, R. Pannell, H. E. Jolin and A. N. McKenzie (2010). "Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity." *Nature* **464**(7293): 1367-70.
- Nguyen, K. D., A. Fohner, J. D. Booker, C. Dong, A. M. Krensky and K. C. Nadeau (2008). "XCL1 enhances regulatory activities of CD4+ CD25(high) CD127(low/-) T cells in human allergic asthma." *J Immunol* **181**(8): 5386-95.
- Nguyen, K. D., C. Vanichsarn and K. C. Nadeau (2009). "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* **180**(9): 823-33.
- Nibbs, R. J., T. W. Salcedo, J. D. Campbell, X. T. Yao, Y. Li, B. Nardelli, H. S. Olsen, T. S. Morris, A. E. Proudfoot, V. P. Patel and G. J. Graham (2000). "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* **164**(3): 1488-97.
- Nielsen, L. P., C. G. Peterson and R. Dahl (2009). "Serum eosinophil granule proteins predict asthma risk in allergic rhinitis." *Allergy* **64**(5): 733-7.

- Nieto, M., F. Navarro, J. J. Perez-Villar, M. A. del Pozo, R. Gonzalez-Amaro, M. Mellado, J. M. Frade, A. C. Martinez, M. Lopez-Botet and F. Sanchez-Madrid (1998). "Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions." *J Immunol* **161**(7): 3330-9.
- Nogralles, K. E., L. C. Zaba, A. Shemer, J. Fuentes-Duculan, I. Cardinale, T. Kikuchi, M. Ramon, R. Bergman, J. G. Krueger and E. Guttman-Yassky (2009). "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* **123**(6): 1244-52 e2.
- Noso, N., P. Proost, J. Van Damme and J. M. Schroder (1994). "Human monocyte chemotactic proteins-2 and 3 (MCP-2 and MCP-3) attract human eosinophils and desensitize the chemotactic responses towards RANTES." *Biochem Biophys Res Commun* **200**(3): 1470-6.

O

- Oh, C. K. (2005). "Mast cell mediators in airway remodeling." *Chem Immunol Allergy* **87**: 85-100.
- Ohkawara, Y., K. G. Lim, Z. Xing, M. Glibetic, K. Nakano, J. Dolovich, K. Croitoru, P. F. Weller and M. Jordana (1996). "CD40 expression by human peripheral blood eosinophils." *J Clin Invest* **97**(7): 1761-6.
- Olcese, L., A. Cambiaggi, G. Semenzato, C. Bottino, A. Moretta and E. Vivier (1997). "Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells." *J Immunol* **158**(11): 5083-6.
- Omori, M. and S. Ziegler (2007). "Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin." *J Immunol* **178**(3): 1396-404.
- Orange, J. S. (2002). "Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection." *Microbes Infect* **4**(15): 1545-58.
- Orange, J. S. (2006). "Human natural killer cell deficiencies." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **6**(6): 399-409.
- Orange, J. S. (2008). "Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **8**(9): 713-25.
- Orange, J. S. and C. A. Biron (1996a). "An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections." *J Immunol* **156**(3): 1138-42.
- Orange, J. S. and C. A. Biron (1996b). "Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection." *J Immunol* **156**(12): 4746-56.
- Orange, J. S., B. Wang, C. Terhorst and C. A. Biron (1995). "Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration." *J Exp Med* **182**(4): 1045-56.
- Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, T. B. Oriss, B. Dixon-McCarthy, L. Yang, B. T. Ameredes, T. E. Corcoran and A. Ray (2004). "Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF- β and FOXP3." *J Clin Invest* **114**(1): 28-38.
- Otero, K., A. Vecchi, E. Hirsch, J. Kearley, W. Vermi, A. Del Prete, S. Gonzalvo-Feo, C. Garlanda, O. Azzolino, L. Salogni, C. M. Lloyd, F. Facchetti, A. Mantovani and S. Sozzani "Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking." *Blood* **116**(16): 2942-9.

P

- Page, S. M., G. J. Gleich, K. A. Roebuck and L. L. Thomas (1999). "Stimulation of neutrophil interleukin-8 production by eosinophil granule major basic protein." *Am J Respir Cell Mol Biol* **21**(2): 230-7.
- Palframan, R. T., P. D. Collins, T. J. Williams and S. M. Rankin (1998). "Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow." *Blood* **91**(7): 2240-8.
- Pallandre, J. R., K. Krzewski, R. Bedel, B. Ryffel, A. Caignard, P. S. Rohrlich, X. Pivot, P. Tiberghien, L. Zitvogel, J. L. Strominger and C. Borg (2008). "Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation." *Blood* **112**(12): 4420-4.

- Papakosta, D., K. Manika, G. Kyriazis, T. Kontakiotis, D. Gioulekas, T. Polyzoni, D. Bouros and D. Patakas (2009). "Bronchoalveolar lavage fluid eosinophils are correlated to natural killer cells in eosinophilic pneumonias." *Respiration* **78**(2): 177-84.
- Pardo, J., J. I. Aguilo, A. Anel, P. Martin, L. Joeckel, C. Borner, R. Wallich, A. Mullbacher, C. J. Froelich and M. M. Simon (2009). "The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation." *Microbes Infect* **11**(4): 452-9.
- Park, H. S., S. H. Kim and C. S. Park (2006). "The role of novel genes in modifying airway responses in asthma." *Curr Allergy Asthma Rep* **6**(2): 112-6.
- Parolini, S., A. Santoro, E. Marcenaro, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, D. Communi, M. Parmentier, A. Majorana, M. Sironi, G. Tabellini, A. Moretta and S. Sozzani (2007). "The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues." *Blood* **109**(9): 3625-32.
- Pease, J. E. (2006). "Asthma, allergy and chemokines." *Curr Drug Targets* **7**(1): 3-12.
- Peden, D. and C. E. Reed (2010). "Environmental and occupational allergies." *J Allergy Clin Immunol* **125**(2 Suppl 2): S150-60.
- Pelosi, U., G. Porcedda, F. Tiddia, S. Tripodi, A. E. Tozzi, V. Panetta, C. Pintor and P. M. Matricardi (2005). "The inverse association of salmonellosis in infancy with allergic rhinoconjunctivitis and asthma at school-age: a longitudinal study." *Allergy* **60**(5): 626-30.
- Pende, D., C. Bottino, R. Castriconi, C. Cantoni, S. Marcenaro, P. Rivera, G. M. Spaggiari, A. Dondero, B. Carnemolla, N. Reymond, M. C. Mingari, M. Lopez, L. Moretta and A. Moretta (2005). "PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis." *Mol Immunol* **42**(4): 463-9.
- Pende, D., R. Castriconi, P. Romagnani, G. M. Spaggiari, S. Marcenaro, A. Dondero, E. Lazzeri, L. Lasagni, S. Martini, P. Rivera, A. Capobianco, L. Moretta, A. Moretta and C. Bottino (2006). "Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction." *Blood* **107**(5): 2030-6.
- Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." *J Exp Med* **190**(10): 1505-16.
- Pene, J., S. Chevalier, L. Preisser, E. Venereau, M. H. Guilleux, S. Ghannam, J. P. Moles, Y. Danger, E. Ravon, S. Lesaux, H. Yssel and H. Gascan (2008). "Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes." *J Immunol* **180**(11): 7423-30.
- Perrigoue, J. G., S. A. Saenz, M. C. Siracusa, E. J. Allenspach, B. C. Taylor, P. R. Giacomin, M. G. Nair, Y. Du, C. Zaph, N. van Rooijen, M. R. Comeau, E. J. Pearce, T. M. Laufer and D. Artis (2009). "MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity." *Nat Immunol* **10**(7): 697-705.
- Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni and A. Moretta (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." *J Exp Med* **188**(5): 953-60.
- Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri and N. M. Valiante (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." *J Exp Med* **195**(3): 335-41.
- Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara and E. M. Shevach (2002). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness." *J Exp Med* **196**(2): 237-46.
- Piliponsky, A. M., G. J. Gleich, A. Nagler, I. Bar and F. Levi-Schaffer (2003). "Non-IgE-dependent activation of human lung- and cord blood-derived mast cells is induced by eosinophil major basic protein and modulated by the membrane form of stem cell factor." *Blood* **101**(5): 1898-904.
- Plager, D. A., D. A. Loegering, J. L. Checkel, J. Tang, G. M. Kephart, P. L. Caffes, C. R. Adolphson, L. E. Ohnuki and G. J. Gleich (2006). "Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker." *J Immunol* **177**(10): 7340-5.

- Ple, C., M. Barrier, L. Amniai, P. Marquillies, J. Bertout, A. Tsicopoulos, T. Walzer, P. Lassalle and C. Duez (2010). "Natural killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma." Scand J Immunol **72**(2): 118-27.
- Plotz, S. G., A. Lentschat, H. Behrendt, W. Plotz, L. Hamann, J. Ring, E. T. Rietschel, H. D. Flad and A. J. Ulmer (2001). "The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent." Blood **97**(1): 235-41.
- Plougastel, B., T. Jones and J. Trowsdale (1996). "Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene." Immunogenetics **44**(4): 286-91.
- Plougastel, B. and J. Trowsdale (1997). "Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes." Eur J Immunol **27**(11): 2835-9.
- Plumas, J., V. Gruart, D. Aldebert, M. J. Truong, M. Capron, A. Capron and L. Prin (1991). "Human eosinophils from hypereosinophilic patients spontaneously express the p55 but not the p75 interleukin 2 receptor subunit." Eur J Immunol **21**(5): 1265-70.
- Podack, E. R., J. D. Young and Z. A. Cohn (1985). "Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(24): 8629-33.
- Polosa, R., J. D. Knoke, C. Russo, G. Piccillo, P. Caponnetto, M. Sarva, L. Proietti and W. K. Al-Delaimy (2008). "Cigarette smoking is associated with a greater risk of incident asthma in allergic rhinitis." J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1428-34.
- Ponath, P. D., S. Qin, D. J. Ringler, I. Clark-Lewis, J. Wang, N. Kassam, H. Smith, X. Shi, J. A. Gonzalo, W. Newman, J. C. Gutierrez-Ramos and C. R. Mackay (1996). "Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils." J Clin Invest **97**(3): 604-12.
- Ponte, M., C. Cantoni, R. Biassoni, A. Tradori-Cappai, G. Bentivoglio, C. Vitale, S. Bertone, A. Moretta, L. Moretta and M. C. Mingari (1999). "Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5674-9.
- Pope, S. M., E. B. Brandt, A. Mishra, S. P. Hogan, N. Zimmermann, K. I. Matthaei, P. S. Foster and M. E. Rothenberg (2001). "IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism." J Allergy Clin Immunol **108**(4): 594-601.
- Prefontaine, D., J. Nadigel, F. Chouiali, S. Audusseau, A. Semlali, J. Chakir, J. G. Martin and Q. Hamid "Increased IL-33 expression by epithelial cells in bronchial asthma." J Allergy Clin Immunol **125**(3): 752-4.
- Presser, K., D. Schwinge, M. Wegmann, S. Huber, S. Schmitt, A. Quaas, J. H. Maxeiner, S. Finotto, A. W. Lohse, M. Blessing and C. Schramm (2008). "Coexpression of TGF-beta1 and IL-10 enables regulatory T cells to completely suppress airway hyperreactivity." J Immunol **181**(11): 7751-8.
- Price, A. E., H. E. Liang, B. M. Sullivan, R. L. Reinhardt, C. J. Eisley, D. J. Erle and R. M. Locksley "Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11489-94.
- Price, A. E., H. E. Liang, B. M. Sullivan, R. L. Reinhardt, C. J. Eisley, D. J. Erle and R. M. Locksley (2010). "Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(25): 11489-94.
- Prod'homme, V., C. Griffin, R. J. Aicheler, E. C. Wang, B. P. McSharry, C. R. Rickards, R. J. Stanton, L. K. Borysiewicz, M. Lopez-Botet, G. W. Wilkinson and P. Tomasec (2007). "The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells." J Immunol **178**(7): 4473-81.
- Provoost, S., T. Maes, Y. M. van Durme, P. Gevaert, C. Bachert, C. B. Schmidt-Weber, G. G. Brusselle, G. F. Joos and K. G. Tournoy (2009). "Decreased FOXP3 protein expression in patients with asthma." Allergy **64**(10): 1539-46.
- Prussin, C. and D. D. Metcalfe (2006). "5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils." J Allergy Clin Immunol **117**(2 Suppl Mini-Primer): S450-6.

R

- Rabinovich, B. A., J. Li, J. Shannon, R. Hurren, J. Chalupny, D. Cosman and R. G. Miller (2003). "Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells." *J Immunol* **170**(7): 3572-6.
- Radosavljevic, M., B. Cuillerier, M. J. Wilson, O. Clement, S. Wicker, S. Gilfillan, S. Beck, J. Trowsdale and S. Bahram (2002). "A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3." *Genomics* **79**(1): 114-23.
- Rajagopalan, S., J. Fu and E. O. Long (2001). "Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells." *J Immunol* **167**(4): 1877-81.
- Raulet, D. H., R. E. Vance and C. W. McMahon (2001). "Regulation of the natural killer cell receptor repertoire." *Annu Rev Immunol* **19**: 291-330.
- Rees, M. D., T. N. McNiven and M. J. Davies (2007). "Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid." *Biochem J* **401**(2): 587-96.
- Reich, K., A. Heine, S. Hugo, V. Blaschke, P. Middel, A. Kaser, H. Tilg, S. Blaschke, C. Gutgesell and C. Neumann (2001). "Engagement of the Fc epsilon RI stimulates the production of IL-16 in Langerhans cell-like dendritic cells." *J Immunol* **167**(11): 6321-9.
- Rimaniol, A. C., S. J. Till, G. Garcia, F. Capel, V. Godot, K. Balabanian, I. Durand-Gasselin, E. M. Varga, G. Simonneau, D. Emilie, S. R. Durham and M. Humbert (2003). "The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis." *J Allergy Clin Immunol* **112**(6): 1139-46.
- Robinson, D. S. (2009). "Regulatory T cells and asthma." *Clin Exp Allergy* **39**(9): 1314-23.
- Rook, G. A. (2009). "Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis." *Immunology* **126**(1): 3-11.
- Rosen, D. B., M. Araki, J. A. Hamerman, T. Chen, T. Yamamura and L. L. Lanier (2004). "A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D." *J Immunol* **173**(4): 2470-8.
- Rosenberg, H. F. (1998). "The eosinophil ribonucleases." *Cell Mol Life Sci* **54**(8): 795-803.
- Rosenberg, H. F., K. D. Dyer and P. S. Foster (2012). "Eosinophils: changing perspectives in health and disease." *Nat Rev Immunol* **13**(1): 9-22.
- Rosenberg, H. F., S. Phipps and P. S. Foster (2007). "Eosinophil trafficking in allergy and asthma." *J Allergy Clin Immunol* **119**(6): 1303-10; quiz 1311-2.
- Rossi, A. G., C. Haslett, N. Hirani, A. P. Greening, I. Rahman, C. N. Metz, R. Bucala and S. C. Donnelly (1998). "Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma." *J Clin Invest* **101**(12): 2869-74.
- Rothe, G. and G. Valet (1990). "Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein." *J Leukoc Biol* **47**(5): 440-8.
- Rothenberg, M. E. (1998). "Eosinophilia." *N Engl J Med* **338**(22): 1592-600.
- Rothenberg, M. E. and S. P. Hogan (2006). "The eosinophil." *Annu Rev Immunol* **24**: 147-74.
- Rothenberg, M. E., W. F. Owen, Jr., D. S. Silberstein, R. J. Soberman, K. F. Austen and R. L. Stevens (1987). "Eosinophils cocultured with endothelial cells have increased survival and functional properties." *Science* **237**(4815): 645-7.
- Rubinstein, M. P., M. Kovar, J. F. Purton, J. H. Cho, O. Boyman, C. D. Surh and J. Sprent (2006). "Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(24): 9166-71.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller and A. Y. Rudensky (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." *Immunity* **28**(4): 546-58.
- Runswick, S., T. Mitchell, P. Davies, C. Robinson and D. R. Garrod (2007). "Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions." *Respirology* **12**(6): 834-42.

S

- Saenz, S. A., M. C. Siracusa, J. G. Perrigoue, S. P. Spencer, J. F. Urban, Jr., J. E. Tocker, A. L. Budelsky, M. A. Kleinschek, R. A. Kastelein, T. Kambayashi, A. Bhandoola and D. Artis "IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses." Nature **464**(7293): 1362-6.
- Saenz, S. A., M. C. Siracusa, J. G. Perrigoue, S. P. Spencer, J. F. Urban, Jr., J. E. Tocker, A. L. Budelsky, M. A. Kleinschek, R. A. Kastelein, T. Kambayashi, A. Bhandoola and D. Artis (2010). "IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses." Nature **464**(7293): 1362-6.
- Saito, H., K. Matsumoto, A. E. Denburg, L. Crawford, R. Ellis, M. D. Inman, R. Sehmi, K. Takatsu, K. I. Matthaei and J. A. Denburg (2002). "Pathogenesis of murine experimental allergic rhinitis: a study of local and systemic consequences of IL-5 deficiency." J Immunol **168**(6): 3017-23.
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi and T. Nomura (2006). "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." Immunol Rev **212**: 8-27.
- Sallusto, F., B. Palermo, D. Lenig, M. Miettinen, S. Matikainen, I. Julkunen, R. Forster, R. Burgstahler, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." Eur J Immunol **29**(5): 1617-25.
- Salmen, S., G. Teran, L. Borges, L. Goncalves, B. Albarran, H. Urdaneta, H. Montes and L. Berrueta (2004). "Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients." Clin Exp Immunol **137**(1): 166-72.
- Samaridis, J. and M. Colonna (1997). "Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways." Eur J Immunol **27**(3): 660-5.
- Sanderson, C. J. (1992). "Interleukin-5, eosinophils, and disease." Blood **79**(12): 3101-9.
- Sanos, S. L., V. L. Bui, A. Mortha, K. Oberle, C. Heners, C. Johner and A. Diefenbach (2009). "RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells." Nat Immunol **10**(1): 83-91.
- Sapozhnikov, A., J. A. Fischer, T. Zaft, R. Krauthgamer, A. Dzionek and S. Jung (2007). "Organ-dependent in vivo priming of naive CD4+, but not CD8+, T cells by plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **204**(8): 1923-33.
- Satoh-Takayama, N., L. Dumoutier, S. Lesjean-Pottier, V. S. Ribeiro, O. Mandelboim, J. C. Renauld, C. A. Vosshenrich and J. P. Di Santo (2009). "The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*." J Immunol **183**(10): 6579-87.
- Satoh-Takayama, N., C. A. Vosshenrich, S. Lesjean-Pottier, S. Sawa, M. Lochner, F. Rattis, J. J. Mention, K. Thiam, N. Cerf-Bensussan, O. Mandelboim, G. Eberl and J. P. Di Santo (2008). "Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense." Immunity **29**(6): 958-70.
- Sawaguchi, M., S. Tanaka, Y. Nakatani, Y. Harada, K. Mukai, Y. Matsunaga, K. Ishiwata, K. Oboki, T. Kambayashi, N. Watanabe, H. Karasuyama, S. Nakae, H. Inoue and M. Kubo "Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness." J Immunol **188**(4): 1809-18.
- Sawaguchi, M., S. Tanaka, Y. Nakatani, Y. Harada, K. Mukai, Y. Matsunaga, K. Ishiwata, K. Oboki, T. Kambayashi, N. Watanabe, H. Karasuyama, S. Nakae, H. Inoue and M. Kubo (2012). "Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness." J Immunol **188**(4): 1809-18.
- Schatz, M. (1999). "Interrelationships between asthma and pregnancy: a literature review." J Allergy Clin Immunol **103**(2 Pt 2): S330-6.
- Schlaepfer, E. and R. F. Speck (2008). "Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering." PLoS One **3**(4): e1999.

- Schleinitz, N., F. Vely, J. R. Harle and E. Vivier (2010). "Natural killer cells in human autoimmune diseases." *Immunology* **131**(4): 451-8.
- Schmidt, P., H. Krook, M. Goto and O. Korsgren (2004). "MyD88-dependent toll-like receptor signalling is not a requirement for fetal islet xenograft rejection in mice." *Xenotransplantation* **11**(4): 347-52.
- Schmitt, E., R. Van Brandwijk, J. Van Snick, B. Siebold and E. Rude (1989). "TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor." *Eur J Immunol* **19**(11): 2167-70.
- Schneider, E., A. F. Petit-Bertron, R. Bricard, M. Levasseur, A. Ramadan, J. P. Girard, A. Herbelin and M. Dy (2009). "IL-33 activates unprimed murine basophils directly in vitro and induces their in vivo expansion indirectly by promoting hematopoietic growth factor production." *J Immunol* **183**(6): 3591-7.
- Schneider, E., N. Thieblemont, M. L. De Moraes and M. Dy "Basophils: new players in the cytokine network." *Eur Cytokine Netw* **21**(3): 142-53.
- Schneider, E., N. Thieblemont, M. L. De Moraes and M. Dy (2010). "Basophils: new players in the cytokine network." *Eur Cytokine Netw* **21**(3): 142-53.
- Schnyder-Candrian, S., D. Togbe, I. Couillin, I. Mercier, F. Brombacher, V. Quesniaux, F. Fossiez, B. Ryffel and B. Schnyder (2006). "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma." *J Exp Med* **203**(12): 2715-25.
- Schnyder, B., C. Lima and S. Schnyder-Candrian "Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response." *Cytokine* **50**(2): 220-7.
- Schnyder, B., C. Lima and S. Schnyder-Candrian (2010). "Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response." *Cytokine* **50**(2): 220-7.
- Schrumbach, S., M. Ardizzone, V. Leymarie, J. Sibilio and S. Bahram (2007). "In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer." *PLoS One* **2**(6): e518.
- Schraufstatter, I., H. Takamori, L. Sikora, P. Sriramarao and R. G. DiScipio (2004). "Eosinophils and monocytes produce pulmonary and activation-regulated chemokine, which activates cultured monocytes/macrophages." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**(3): L494-501.
- Schroeder, J. T. (2009). "Basophils beyond effector cells of allergic inflammation." *Adv Immunol* **101**: 123-61.
- Schutysse, E., S. Struyf, A. Wuyts, W. Put, K. Geboes, B. Grillet, G. Opdenakker and J. Van Damme (2001). "Selective induction of CCL18/PARC by staphylococcal enterotoxins in mononuclear cells and enhanced levels in septic and rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* **31**(12): 3755-62.
- Schwab, S. R. and J. G. Cyster (2007). "Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs." *Nat Immunol* **8**(12): 1295-301.
- Scordamaglia, F., M. Balsamo, A. Scordamaglia, A. Moretta, M. C. Mingari, G. W. Canonica, L. Moretta and M. Vitale (2008). "Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol* **121**(2): 479-85.
- Seaman, W. E., T. D. Gindhart, M. A. Blackman, B. Dalal, N. Talal and Z. Werb (1982). "Suppression of natural killing in vitro by monocytes and polymorphonuclear leukocytes: requirement for reactive metabolites of oxygen." *J Clin Invest* **69**(4): 876-88.
- Sehmi, R., A. J. Baatjes and J. A. Denburg (2003a). "Hemopoietic progenitor cells and hemopoietic factors: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases." *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **2**(4): 271-8.
- Sehmi, R., S. Dorman, A. Baatjes, R. Watson, R. Foley, S. Ying, D. S. Robinson, A. B. Kay, P. M. O'Byrne and J. A. Denburg (2003b). "Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation." *Immunology* **109**(4): 536-46.
- Semino, C., G. Angelini, A. Poggi and A. Rubartelli (2005). "NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1." *Blood* **106**(2): 609-16.

- Semino, C., J. Ceccarelli, L. V. Lotti, M. R. Torrisi, G. Angelini and A. Rubartelli (2007). "The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion." *J Leukoc Biol* **81**(1): 92-9.
- Shalit, M., S. Sekhsaria and H. L. Malech (1995). "Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors." *Cell Immunol* **160**(1): 50-7.
- Sheehy, M. E., A. B. McDermott, S. N. Furlan, P. Klenerman and D. F. Nixon (2001). "A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis." *J Immunol Methods* **249**(1-2): 99-110.
- Shi, H. Z. (2004). "Eosinophils function as antigen-presenting cells." *J Leukoc Biol* **76**(3): 520-7.
- Shi, H. Z., A. Humbles, C. Gerard, Z. Jin and P. F. Weller (2000). "Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils." *J Clin Invest* **105**(7): 945-53.
- Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G. R. Sutherland, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1996). "DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes." *Immunity* **4**(6): 573-81.
- Shilling, H. G., K. L. McQueen, N. W. Cheng, J. A. Shizuru, R. S. Negrin and P. Parham (2003). "Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation." *Blood* **101**(9): 3730-40.
- Shilling, H. G., N. Young, L. A. Guethlein, N. W. Cheng, C. M. Gardiner, D. Tyan and P. Parham (2002). "Genetic control of human NK cell repertoire." *J Immunol* **169**(1): 239-47.
- Shirakawa, T., T. Enomoto, S. Shimazu and J. M. Hopkin (1997). "The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder." *Science* **275**(5296): 77-9.
- Shreffler, W. G., R. R. Castro, Z. Y. Kucuk, Z. Charlop-Powers, G. Grishina, S. Yoo, A. W. Burks and H. A. Sampson (2006). "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* **177**(6): 3677-85.
- Shtreichman, R. and C. E. Samuel (2001). "The role of gamma interferon in antimicrobial immunity." *Curr Opin Microbiol* **4**(3): 251-9.
- Siegle, J. S., N. Hansbro, C. Dong, P. Angkasekwinai, P. S. Foster and R. K. Kumar "Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma." *Clin Exp Immunol* **165**(1): 19-28.
- Siegle, J. S., N. Hansbro, C. Dong, P. Angkasekwinai, P. S. Foster and R. K. Kumar (2011). "Blocking induction of T helper type 2 responses prevents development of disease in a model of childhood asthma." *Clin Exp Immunol* **165**(1): 19-28.
- Simon, H. U. (2000). "Eosinophil apoptosis--pathophysiologic and therapeutic implications." *Allergy* **55**(10): 910-5.
- Simpson, A. and A. Custovic (2005). "Pets and the development of allergic sensitization." *Curr Allergy Asthma Rep* **5**(3): 212-20.
- 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): 326-32.
- Simpson, T. R., S. A. Quezada and J. P. Allison (2010). "Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS)." *Curr Opin Immunol* **22**(3): 326-32.
- Simson, L. and P. S. Foster (2000). "Chemokine and cytokine cooperativity: eosinophil migration in the asthmatic response." *Immunol Cell Biol* **78**(4): 415-22.
- Sitkauskienė, B., M. Radinger, A. Bossios, A. K. Johansson, R. Sakalauskas and J. Lotvall (2005). "Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9." *Respir Res* **6**: 33.
- Sivori, S., C. Cantoni, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Conte, L. Moretta and A. Moretta (2003). "IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors." *Eur J Immunol* **33**(12): 3439-47.
- Sivori, S., M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta and A. Moretta (2004). "CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10116-21.

- Sivori, S., S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta and A. Moretta (2000). "2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation." *Eur J Immunol* **30**(3): 787-93.
- Sleeman, M. A., J. K. Fraser, J. G. Murison, S. L. Kelly, R. L. Prestidge, D. J. Palmer, J. D. Watson and K. D. Kumble (2000). "B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine." *Int Immunol* **12**(5): 677-89.
- Smith, D. E. "IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma." *Clin Exp Allergy* **40**(2): 200-8.
- Smithgall, M. D., M. R. Comeau, B. R. Yoon, D. Kaufman, R. Armitage and D. E. Smith (2008). "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* **20**(8): 1019-30.
- Smyth, M. J., E. Cretney, K. Takeda, R. H. Wiltrout, L. M. Sedger, N. Kayagaki, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis." *J Exp Med* **193**(6): 661-70.
- Soderquest, K., N. Powell, C. Luci, N. van Rooijen, A. Hidalgo, F. Geissmann, T. Walzer, G. M. Lord and A. Martin-Fontecha (2011a). "Monocytes control natural killer cell differentiation to effector phenotypes." *Blood* **117**(17): 4511-8.
- Soderquest, K., T. Walzer, B. Zafirova, L. S. Klavinskis, B. Polic, E. Vivier, G. M. Lord and A. Martin-Fontecha (2011b). "Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses." *J Immunol* **186**(6): 3304-8.
- Sokol, C. L., N. Q. Chu, S. Yu, S. A. Nish, T. M. Laufer and R. Medzhitov (2009). "Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response." *Nat Immunol* **10**(7): 713-20.
- Soler, D., T. R. Chapman, L. R. Poisson, L. Wang, J. Cote-Sierra, M. Ryan, A. McDonald, S. Badola, E. Fedyk, A. J. Coyle, M. R. Hodge and R. Kolbeck (2006). "CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes." *J Immunol* **177**(10): 6940-51.
- Soumelis, V. and Y. J. Liu (2006). "From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation." *Eur J Immunol* **36**(9): 2286-92.
- Spaggiari, G. M., R. Carosio, D. Pende, S. Marcenaro, P. Rivera, M. R. Zocchi, L. Moretta and A. Poggi (2001). "NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46." *Eur J Immunol* **31**(6): 1656-65.
- Spits, H. and T. Cupedo "Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function." *Annu Rev Immunol* **30**: 647-75.
- Spits, H. and T. Cupedo (2012). "Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function." *Annu Rev Immunol* **30**: 647-75.
- Sporik, R., S. T. Holgate, T. A. Platts-Mills and J. J. Cogswell (1990). "Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study." *N Engl J Med* **323**(8): 502-7.
- Sporik, R., S. P. Squillace, J. M. Ingram, G. Rakes, R. W. Honsinger and T. A. Platts-Mills (1999). "Mite, cat, and cockroach exposure, allergen sensitisation, and asthma in children: a case-control study of three schools." *Thorax* **54**(8): 675-80.
- Sporri, R., N. Joller, H. Hilbi and A. Oxenius (2008). "A novel role for neutrophils as critical activators of NK cells." *J Immunol* **181**(10): 7121-30.
- Stampfli, M. R., R. E. Wiley, G. S. Neigh, B. U. Gajewska, X. F. Lei, D. P. Snider, Z. Xing and M. Jordana (1998). "GM-CSF transgene expression in the airway allows aerosolized ovalbumin to induce allergic sensitization in mice." *J Clin Invest* **102**(9): 1704-14.
- Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt and T. Bopp (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." *Immunity* **33**(2): 192-202.

- Steinle, A., P. Li, D. L. Morris, V. Groh, L. L. Lanier, R. K. Strong and T. Spies (2001). "Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family." Immunogenetics **53**(4): 279-87.
- Steinman, R. M. (2003). "The control of immunity and tolerance by dendritic cell." Pathol Biol (Paris) **51**(2): 59-60.
- Stene, L. C. and P. Nafstad (2001). "Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma." Lancet **357**(9256): 607-8.
- Stetson, D. B., M. Mohrs, R. L. Reinhardt, J. L. Baron, Z. E. Wang, L. Gapin, M. Kronenberg and R. M. Locksley (2003). "Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function." J Exp Med **198**(7): 1069-76.
- Stewart, C. A., F. Laugier-Anfossi, F. Vely, X. Saulquin, J. Riedmuller, A. Tisserant, L. Gauthier, F. Romagne, G. Ferracci, F. A. Arosa, A. Moretta, P. D. Sun, S. Ugolini and E. Vivier (2005). "Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13224-9.
- Stewart, C. A., E. Vivier and M. Colonna (2006). "Strategies of natural killer cell recognition and signaling." Curr Top Microbiol Immunol **298**: 1-21.
- Stock, P., V. Lombardi, V. Kohlrantz and O. Akbari (2009). "Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB." J Immunol **182**(8): 5116-22.
- Street, S. E., E. Cretney and M. J. Smyth (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-7.
- Strickland, D. H., P. A. Stumbles, G. R. Zosky, L. S. Subrata, J. A. Thomas, D. J. Turner, P. D. Sly and P. G. Holt (2006). "Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells." J Exp Med **203**(12): 2649-60.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott and et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." J Biol Chem **270**(45): 27348-57.
- Struyf, S., E. Schutyser, M. Gouwy, K. Gijssbers, P. Proost, Y. Benoit, G. Opdenakker, J. Van Damme and G. Laureys (2003). "PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia." Am J Pathol **163**(5): 2065-75.
- Subbarao, P., P. J. Mandhane and M. R. Sears (2009). "Asthma: epidemiology, etiology and risk factors." CMAJ **181**(9): E181-90.
- Sugimoto, K., M. Kudo, A. Sundaram, X. Ren, K. Huang, X. Bernstein, Y. Wang, W. W. Raymond, D. J. Erle, M. Abrink, G. H. Caughey, X. Huang and D. Sheppard "The alphavbeta6 integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells." J Clin Invest.
- Sugimoto, K., M. Kudo, A. Sundaram, X. Ren, K. Huang, X. Bernstein, Y. Wang, W. W. Raymond, D. J. Erle, M. Abrink, G. H. Caughey, X. Huang and D. Sheppard (2012). "The alphavbeta6 integrin modulates airway hyperresponsiveness in mice by regulating intraepithelial mast cells." J Clin Invest **122**(2): 748-58.
- Sun, J., B. Wong, M. Cundall, S. Goncharova, M. Conway, A. Dalrymple, A. J. Coyle, S. Wasserman and M. Jordana (2007). "Immunoreactivity profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with ragweed-induced allergic rhinitis." Clin Exp Allergy **37**(6): 901-8.
- Svensson, L., E. Redvall, C. Bjorn, J. Karlsson, A. M. Bergin, M. J. Rabet, C. Dahlgren and C. Wenneras (2007). "House dust mite allergen activates human eosinophils via formyl peptide receptor and formyl peptide receptor-like 1." Eur J Immunol **37**(7): 1966-77.
- Svensson, L. and C. Wenneras (2005). "Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups." Microbes Infect **7**(4): 720-8.

T

- Tahara-Hanaoka, S., K. Shibuya, Y. Onoda, H. Zhang, S. Yamazaki, A. Miyamoto, S. Honda, L. L. Lanier and A. Shibuya (2004). "Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112)." Int Immunol **16**(4): 533-8.

- Takafuji, S., K. Tadokoro, K. Ito and C. A. Dahinden (1994). "Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a." Int Arch Allergy Immunol **104 Suppl 1**(1): 27-9.
- Takafuji, S., K. Tadokoro, K. Ito and T. Nakagawa (1998). "Release of granule proteins from human eosinophils stimulated with mast-cell mediators." Allergy **53**(10): 951-6.
- Takanaski, S., R. Nonaka, Z. Xing, P. O'Byrne, J. Dolovich and M. Jordana (1994). "Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils." J Exp Med **180**(2): 711-5.
- Takeda, K., M. J. Smyth, E. Cretney, Y. Hayakawa, N. Yamaguchi, H. Yagita and K. Okumura (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth." Cell Immunol **214**(2): 194-200.
- Tanaka, H., C. E. Demeure, M. Rubio, G. Delespesse and M. Sarfati (2000). "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 **192**(3): 405-12.
- Taner, S. B., B. Onfelt, N. J. Pirinen, F. E. McCann, A. I. Magee and D. M. Davis (2004). "Control of immune responses by trafficking cell surface proteins, vesicles and lipid rafts to and from the immunological synapse." Traffic **5**(9): 651-61.
- Tasaki, Y., S. Fukuda, M. Iio, R. Miura, T. Imai, S. Sugano, O. Yoshie, A. L. Hughes and H. Nomiyama (1999). "Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes." Genomics **55**(3): 353-7.
- Taub, D. D., J. R. Ortaldo, S. M. Turcovski-Corrales, M. L. Key, D. L. Longo and W. J. Murphy (1996). "Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production." J Leukoc Biol **59**(1): 81-9.
- Taub, D. D., T. J. Sayers, C. R. Carter and J. R. Ortaldo (1995). "Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis." J Immunol **155**(8): 3877-88.
- Taube, C., X. Wei, C. H. Swasey, A. Joetham, S. Zarini, T. Lively, K. Takeda, J. Loader, N. Miyahara, T. Kodama, L. D. Shultz, D. D. Donaldson, E. H. Hamelmann, A. Dakhama and E. W. Gelfand (2004). "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 **172**(10): 6398-406.
- Teran, L. M. (2000). "CCL chemokines and asthma." Immunol Today **21**(5): 235-42.
- Terrier, B., I. Bieche, T. Maisonobe, I. Laurendeau, M. Rosenzwaig, J. E. Kahn, M. C. Diemert, L. Musset, M. Vidaud, D. Sene, N. Costedoat-Chalumeau, D. Le Thi-Huong, Z. Amoura, D. Klatzmann, P. Cacoub and D. Saadoun (2010). "Interleukin-25: a cytokine linking eosinophils and adaptive immunity in Churg-Strauss syndrome." Blood **116**(22): 4523-31.
- Tesciuba, A. G., S. Subudhi, R. P. Rother, S. J. Faas, A. M. Frantz, D. Elliot, J. Weinstock, L. A. Matis, J. A. Bluestone and A. I. Sperling (2001). "Inducible costimulator regulates Th2-mediated inflammation, but not Th2 differentiation, in a model of allergic airway disease." J Immunol **167**(4): 1996-2003.
- Thomas, E. L., P. M. Bozeman, M. M. Jefferson and C. C. King (1995). "Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines." J Biol Chem **270**(7): 2906-13.
- Thoren, F. B., R. E. Riise, J. Ousback, M. Della Chiesa, M. Alsterholm, E. Marcenaro, S. Pesce, C. Prato, C. Cantoni, J. Bylund, L. Moretta and A. Moretta (2012). "Human NK Cells Induce Neutrophil Apoptosis via an NKp46- and Fas-Dependent Mechanism." J Immunol **188**(4): 1668-74.
- Tomassini, M., A. Tscopoulos, P. C. Tai, V. Gruart, A. B. Tonnel, L. Prin, A. Capron and M. Capron (1991). "Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation." J Allergy Clin Immunol **88**(3 Pt 1): 365-75.
- Topham, N. J. and E. W. Hewitt (2009). "Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?" Immunology **128**(1): 7-15.
- Tosi, D., R. Valenti, A. Cova, G. Sovena, V. Huber, L. Pilla, F. Arienti, F. Belardelli, G. Parmiani and L. Rivoltini (2004). "Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic

- cells and NK cells in priming CD8⁺ T cell responses against human tumor antigens." *J Immunol* **172**(9): 5363-70.
- Townson, D. H. and A. R. Liptak (2003). "Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis." *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 94.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits (2009). "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* **10**(8): 864-71.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv Immunol* **47**: 187-376.
- Trompette, A., S. Divanovic, A. Visintin, C. Blanchard, R. S. Hegde, R. Madan, P. S. Thorne, M. Wills-Karp, T. L. Gioannini, J. P. Weiss and C. L. Karp (2009). "Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein." *Nature* **457**(7229): 585-8.
- Trotta, R., K. Fettucciari, L. Azzoni, B. Abebe, K. A. Puorro, L. C. Eisenlohr and B. Perussia (2000). "Differential role of p38 and c-Jun N-terminal kinase 1 mitogen-activated protein kinases in NK cell cytotoxicity." *J Immunol* **165**(4): 1782-9.
- Truong, M. J., V. Gruart, F. T. Liu, L. Prin, A. Capron and M. Capron (1993). "IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity." *Eur J Immunol* **23**(12): 3230-5.
- Tsuyuki, S., C. Bertrand, F. Erard, A. Trifilieff, J. Tsuyuki, M. Wesp, G. P. Anderson and A. J. Coyle (1995). "Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways." *J Clin Invest* **96**(6): 2924-31.

V

- Valiante, N. M., J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1996). "Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells." *J Exp Med* **184**(6): 2243-50.
- Valiante, N. M., M. Uhrberg, H. G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, K. L. Arnett, A. D'Andrea, J. H. Phillips, L. L. Lanier and P. Parham (1997). "Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors." *Immunity* **7**(6): 739-51.
- van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, E. W. Taanman-Kueter, F. J. Muller, D. W. Hommes, S. A. Zaat, M. L. Kapsenberg and E. C. de Jong (2007). "Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells." *Immunity* **27**(4): 660-9.
- van den Brule, S., J. Heymans, X. Havaux, J. C. Renaud, D. Lison, F. Huaux and O. Denis (2007). "Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling." *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**(2): 202-9.
- van der Voort, R., M. Kramer, E. Lindhout, R. Torensma, D. Eleveld, A. W. van Lieshout, M. Looman, T. Ruers, T. R. Radstake, C. G. Figdor and G. J. Adema (2005). "Novel monoclonal antibodies detect elevated levels of the chemokine CCL18/DC-CK1 in serum and body fluids in pathological conditions." *J Leukoc Biol* **77**(5): 739-47.
- van Lieshout, A. W., P. Barrera, R. L. Smeets, G. J. Pesman, P. L. van Riel, W. B. van den Berg and T. R. Radstake (2005). "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* **64**(3): 408-14.
- van Rijt, L. S., N. Vos, D. Hijdra, V. C. de Vries, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht (2003). "Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells." *J Immunol* **171**(7): 3372-8.
- Van Snick, J., A. Goethals, J. C. Renaud, E. Van Roost, C. Uyttenhove, M. R. Rubira, R. L. Moritz and R. J. Simpson (1989). "Cloning and characterization of a cDNA for a new mouse T cell growth factor (P40)." *J Exp Med* **169**(1): 363-8.
- Vance, R. E., J. R. Kraft, J. D. Altman, P. E. Jensen and D. H. Raulet (1998). "Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b)." *J Exp Med* **188**(10): 1841-8.

- Veillette, A. (2006). "NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adapters." *Immunol Rev* **214**: 22-34.
- Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmby, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." *Nat Immunol* **9**(12): 1341-6.
- Venge, P., J. Bystrom, M. Carlson, L. Hakansson, M. Karawacjzyk, C. Peterson, L. Seveus and A. Trulsson (1999). "Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease." *Clin Exp Allergy* **29**(9): 1172-86.
- Vercelli, D. (2008). "Discovering susceptibility genes for asthma and allergy." *Nat Rev Immunol* **8**(3): 169-82.
- Vicari, A. P., D. J. Figueroa, J. A. Hedrick, J. S. Foster, K. P. Singh, S. Menon, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, K. B. Bacon and A. Zlotnik (1997). "TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development." *Immunity* **7**(2): 291-301.
- Vissers, J. L., F. C. Hartgers, E. Lindhout, M. B. Teunissen, C. G. Figdor and G. J. Adema (2001). "Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo." *J Leukoc Biol* **69**(5): 785-93.
- Vitale, C., L. Chiossone, G. Morreale, E. Lanino, F. Cottalasso, S. Moretti, G. Dini, L. Moretta and M. C. Mingari (2004). "Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation." *Eur J Immunol* **34**(2): 455-60.
- Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta and A. Moretta (1998). "NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis." *J Exp Med* **187**(12): 2065-72.
- Vitale, M., M. Della Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Arico, L. Moretta and A. Moretta (2005). "NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor." *Blood* **106**(2): 566-71.
- Vivier, E., D. H. Raulet, A. Moretta, M. A. Caligiuri, L. Zitvogel, L. L. Lanier, W. M. Yokoyama and S. Ugolini (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science* **331**(6013): 44-9.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer and S. Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* **9**(5): 503-10.
- Volpe, E., N. Servant, R. Zollinger, S. I. Bogiatzi, P. Hupe, E. Barillot and V. Soumelis (2008). "A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses." *Nat Immunol* **9**(6): 650-7.
- von Andrian, U. H. and T. R. Mempel (2003). "Homing and cellular traffic in lymph nodes." *Nat Rev Immunol* **3**(11): 867-78.
- von Bubnoff, D., E. Andres, F. Hentges, T. Bieber, T. Michel and J. Zimmer (2010). "Natural killer cells in atopic and autoimmune diseases of the skin." *J Allergy Clin Immunol* **125**(1): 60-8.
- von Bubnoff, D., H. Matz, C. Frahnert, M. L. Rao, D. Hanau, H. de la Salle and T. Bieber (2002). "FepsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses." *J Immunol* **169**(4): 1810-6.
- Von Ehrenstein, O. S., E. Von Mutius, S. Illi, L. Baumann, O. Bohm and R. von Kries (2000). "Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers." *Clin Exp Allergy* **30**(2): 187-93.
- von Mutius, E. and K. Radon (2008). "Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course." *Immunol Allergy Clin North Am* **28**(3): 631-47, ix-x.
- Voskoboinik, I., M. A. Dunstone, K. Baran, J. C. Whisstock and J. A. Trapani (2010). "Perforin: structure, function, and role in human immunopathology." *Immunol Rev* **235**(1): 35-54.
- Vosshenrich, C. A., M. E. Garcia-Ojeda, S. I. Samson-Villeger, V. Pasqualetto, L. Enault, O. Richard-Le Goff, E. Corcuff, D. Guy-Grand, B. Rocha, A. Cumano, L. Rogge, S. Ezine and J. P. Di Santo (2006). "A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127." *Nat Immunol* **7**(11): 1217-24.

- Vujanovic, N. L., S. Nagashima, R. B. Herberman and T. L. Whiteside (1996). "Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells." *J Immunol* **157**(3): 1117-26.
- Vulcano, M., S. Struyf, P. Scapini, M. Cassatella, S. Bernasconi, R. Bonecchi, A. Calleri, G. Penna, L. Adorini, W. Luini, A. Mantovani, J. Van Damme and S. Sozzani (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." *J Immunol* **170**(7): 3843-9.
- Vyas, Y. M., K. M. Mehta, M. Morgan, H. Maniar, L. Butros, S. Jung, J. K. Burkhardt and B. Dupont (2001). "Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions." *J Immunol* **167**(8): 4358-67.

W

- Wahn, U., S. Lau, R. Bergmann, M. Kulig, J. Forster, K. Bergmann, C. P. Bauer and I. Guggenmoos-Holzmann (1997). "Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life." *J Allergy Clin Immunol* **99**(6 Pt 1): 763-9.
- Wakashin, H., K. Hirose, Y. Maezawa, S. Kagami, A. Suto, N. Watanabe, Y. Saito, M. Hatano, T. Tokuhisa, Y. Iwakura, P. Puccetti, I. Iwamoto and H. Nakajima (2008). "IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice." *Am J Respir Crit Care Med* **178**(10): 1023-32.
- Walch, M., S. Latinovic-Golic, A. Velic, H. Sundstrom, C. Dumrese, C. A. Wagner, P. Groscurth and U. Ziegler (2007). "Perforin enhances the granulysin-induced lysis of *Listeria innocua* in human dendritic cells." *BMC Immunol* **8**: 14.
- Walker, C., J. Checkel, S. Cammisuli, P. J. Leibson and G. J. Gleich (1998). "IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation." *J Immunol* **161**(4): 1962-9.
- Wallace, W. A. and S. E. Howie (1999). "Immunoreactive interleukin 4 and interferon-gamma expression by type II alveolar epithelial cells in interstitial lung disease." *J Pathol* **187**(4): 475-80.
- Walsh, E. R., N. Sahu, J. Kearley, E. Benjamin, B. H. Kang, A. Humbles and A. August (2008). "Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma." *J Exp Med* **205**(6): 1285-92.
- Walsh, G. M., M. L. Williamson, F. A. Symon, G. B. Willars and A. J. Wardlaw (1996). "Ligation of CD69 induces apoptosis and cell death in human eosinophils cultured with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Blood* **87**(7): 2815-21.
- Walter, D. M., J. J. McIntire, G. Berry, A. N. McKenzie, D. D. Donaldson, R. H. DeKruyff and D. T. Umetsu (2001). "Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity." *J Immunol* **167**(8): 4668-75.
- Walzer, T., M. Blery, J. Chaix, N. Fuseri, L. Chasson, S. H. Robbins, S. Jaeger, P. Andre, L. Gauthier, L. Daniel, K. Chemin, Y. Morel, M. Dalod, J. Imbert, M. Pierres, A. Moretta, F. Romagne and E. Vivier (2007a). "Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3384-9.
- Walzer, T., L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello and E. Vivier (2007b). "Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor." *Nat Immunol* **8**(12): 1337-44.
- Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel and E. Vivier (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"." *Blood* **106**(7): 2252-8.
- Walzer, T. and E. Vivier (2011). "G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration." *Trends Immunol* **32**(10): 486-92.
- Wang, Y. D., Z. J. Gu, J. A. Huang, Y. B. Zhu, Z. H. Zhou, W. Xie, Y. Xu, Y. H. Qiu and X. G. Zhang (2002). "gp130-linked signal transduction promotes the differentiation and maturation of dendritic cells." *Int Immunol* **14**(6): 599-603.
- Wang, Y. H., T. Ito, B. Homey, N. Watanabe, R. Martin, C. J. Barnes, B. W. McIntyre, M. Gilliet, R. Kumar, Z. Yao and Y. J. Liu (2006). "Maintenance and polarization of human TH2 central

- memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells." *Immunity* **24**(6): 827-38.
- Wardlaw, A. J., S. Dunnette, G. J. Gleich, J. V. Collins and A. B. Kay (1988). "Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity." *Am Rev Respir Dis* **137**(1): 62-9.
- Wardlaw, A. J., R. Moqbel, O. Cromwell and A. B. Kay (1986). "Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils." *J Clin Invest* **78**(6): 1701-6.
- Warren, H. S., A. L. Jones, C. Freeman, J. Bettadapura and C. R. Parish (2005). "Evidence that the cellular ligand for the human NK cell activation receptor NKp30 is not a heparan sulfate glycosaminoglycan." *J Immunol* **175**(1): 207-12.
- Wedi, B., U. Raap, H. Lewrick and A. Kapp (1997). "Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis." *J Allergy Clin Immunol* **100**(4): 536-43.
- Wei, H., J. Zhang, W. Xiao, J. Feng, R. Sun and Z. Tian (2005). "Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance." *J Allergy Clin Immunol* **115**(4): 841-7.
- Wells, T. N. and M. C. Peitsch (1997). "The chemokine information source: identification and characterization of novel chemokines using the WorldWideWeb and expressed sequence tag databases." *J Leukoc Biol* **61**(5): 545-50.
- Welte, S., S. Kuttruff, I. Waldhauer and A. Steinle (2006). "Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction." *Nat Immunol* **7**(12): 1334-42.
- Wendel, M., I. E. Galani, E. Suri-Payer and A. Cerwenka (2008). "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer Res* **68**(20): 8437-45.
- Wenzel, S. E., S. Balzar, M. Cundall and H. W. Chu (2003). "Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair." *J Allergy Clin Immunol* **111**(6): 1345-52.
- Wenzel, S. E., L. B. Schwartz, E. L. Langmack, J. L. Halliday, J. B. Trudeau, R. L. Gibbs and H. W. Chu (1999). "Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(3): 1001-8.
- White, M. V. (1990). "The role of histamine in allergic diseases." *J Allergy Clin Immunol* **86**(4 Pt 2): 599-605.
- Williams, T. J. and P. J. Jose (2000). "Role of eotaxin and related CC chemokines in allergy and asthma." *Chem Immunol* **78**: 166-77.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman and R. de Waal Malefyt (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* **8**(9): 950-7.
- Wilson, R. H., G. S. Whitehead, H. Nakano, M. E. Free, J. K. Kolls and D. N. Cook (2009). "Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness." *Am J Respir Crit Care Med* **180**(8): 720-30.
- Woerly, G., P. Lacy, A. B. Younes, N. Roger, S. Loiseau, R. Moqbel and M. Capron (2002). "Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation." *J Leukoc Biol* **72**(4): 769-79.
- Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau and M. Capron (1999a). "Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils." *Int Arch Allergy Immunol* **118**(2-4): 95-7.
- Woerly, G., N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron and M. Capron (1999b). "Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes." *J Exp Med* **190**(4): 487-95.
- Woltmann, G., C. A. McNulty, G. Dewson, F. A. Symon and A. J. Wardlaw (2000). "Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow." *Blood* **95**(10): 3146-52.

- Wong, C. K., P. F. Cheung, W. K. Ip and C. W. Lam (2007). "Intracellular signaling mechanisms regulating toll-like receptor-mediated activation of eosinophils." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(1): 85-96.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, F. W. Ko, C. H. Chan, A. S. Ho, D. S. Hui and C. W. Lam (2001). "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 **125**(2): 177-83.
- Wong, C. K., S. Hu, P. F. Cheung and C. W. Lam "Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(3): 305-15.
- Wong, C. K., S. Hu, P. F. Cheung and C. W. Lam (2010). "Thymic stromal lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(3): 305-15.
- Wong, C. K., S. W. Lun, F. W. Ko, P. T. Wong, S. Q. Hu, I. H. Chan, D. S. Hui and C. W. Lam (2009). "Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma." Immunol Invest **38**(7): 652-64.
- Wood, I. S., B. Wang and P. Trayhurn (2009). "IL-33, a recently identified interleukin-1 gene family member, is expressed in human adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **384**(1): 105-9.
- Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier and J. H. Phillips (1999). "An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10." Science **285**(5428): 730-2.
- Wynn, T. A. (2009). "Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses." Nat Immunol **10**(7): 679-81.

Y

- Yabe, T., C. McSherry, F. H. Bach, P. Fisch, R. P. Schall, P. M. Sondel and J. P. Houchins (1993). "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins." Immunogenetics **37**(6): 455-60.
- Yadav, P. K., C. Chen and Z. Liu (2011). "Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease." J Biomed Biotechnol **2011**: 348530.
- Yamamoto, H., J. B. Sedgwick, R. F. Vrtis and W. W. Busse (2000). "The effect of transendothelial migration on eosinophil function." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(3): 379-88.
- Yamashita, N., H. Tashimo, H. Ishida, F. Kaneko, J. Nakano, H. Kato, K. Hirai, T. Horiuchi and K. Ohta (2002). "Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)." Cell Immunol **219**(2): 92-7.
- Yang, D., Q. Chen, H. F. Rosenberg, S. M. Rybak, D. L. Newton, Z. Y. Wang, Q. Fu, V. T. Tchernev, M. Wang, B. Schweitzer, S. F. Kingsmore, D. D. Patel, J. J. Oppenheim and O. M. Howard (2004). "Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation." J Immunol **173**(10): 6134-42.
- Yang, D., Q. Chen, S. B. Su, P. Zhang, K. Kurosaka, R. R. Caspi, S. M. Michalek, H. F. Rosenberg, N. Zhang and J. J. Oppenheim (2008). "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 **205**(1): 79-90.
- Yang, J. and D. Zucker-Franklin (1984). "Modulation of natural killer (NK) cells by autologous neutrophils and monocytes." Cell Immunol **86**(1): 171-82.
- Yasuda, K., T. Muto, T. Kawagoe, M. Matsumoto, Y. Sasaki, K. Matsushita, Y. Taki, S. Futatsugi-Yumikura, H. Tsutsui, K. J. Ishii, T. Yoshimoto, S. Akira and K. Nakanishi "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): 3451-6.
- Yazdanbakhsh, M., P. G. Kremsner and R. van Ree (2002). "Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis." Science **296**(5567): 490-4.
- Yazdanbakhsh, M. and P. M. Matricardi (2004). "Parasites and the hygiene hypothesis: regulating the immune system?" Clin Rev Allergy Immunol **26**(1): 15-24.

- Ying, S., Q. Meng, C. J. Corrigan and T. H. Lee (2006). "Lack of filaggrin expression in the human bronchial mucosa." *J Allergy Clin Immunol* **118**(6): 1386-8.
- Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, C. Fang, D. Cousins, G. Zhang, S. Gu, Z. Gao, B. Shamji, M. J. Edwards, T. H. Lee and C. J. Corrigan (2008). "Expression and cellular provenance of thymic stromal lymphopoietin and chemokines in patients with severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease." *J Immunol* **181**(4): 2790-8.
- Ying, S., B. O'Connor, J. Ratoff, Q. Meng, K. Mallett, D. Cousins, D. Robinson, G. Zhang, J. Zhao, T. H. Lee and C. Corrigan (2005). "Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity." *J Immunol* **174**(12): 8183-90.
- Yoneda, O., T. Imai, S. Goda, H. Inoue, A. Yamauchi, T. Okazaki, H. Imai, O. Yoshie, E. T. Bloom, N. Domae and H. Umehara (2000). "Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells." *J Immunol* **164**(8): 4055-62.
- Yoshimoto, T., K. Yasuda, H. Tanaka, M. Nakahira, Y. Imai, Y. Fujimori and K. Nakanishi (2009). "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* **10**(7): 706-12.
- Yoshino, T., S. Nakamura, J. Suzumiya, N. Niitsu, K. Ohshima, J. Tsuchiyama, K. Shinagawa, M. Tanimoto, Y. Sadahira, M. Harada, M. Kikuchi and T. Akagi (2002). "Expression of cutaneous lymphocyte antigen is associated with a poor outcome of nasal-type natural killer-cell lymphoma." *Br J Haematol* **118**(2): 482-7.
- Yu, C., A. B. Cantor, H. Yang, C. Browne, R. A. Wells, Y. Fujiwara and S. H. Orkin (2002). "Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo." *J Exp Med* **195**(11): 1387-95.
- Yu, H., T. A. Fehniger, P. Fuchshuber, K. S. Thiel, E. Vivier, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (1998). "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15." *Blood* **92**(10): 3647-57.
- Yu, M., M. Tsai, S. Y. Tam, C. Jones, J. Zehnder and S. J. Galli (2006). "Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice." *J Clin Invest* **116**(6): 1633-41.

Z

- Zagai, U., E. Dadfar, J. Lundahl, P. Venge and C. M. Skold (2007). "Eosinophil cationic protein stimulates TGF-beta1 release by human lung fibroblasts in vitro." *Inflammation* **30**(5): 153-60.
- Zagai, U., J. Lundahl, J. Klominek, P. Venge and C. M. Skold (2009). "Eosinophil cationic protein stimulates migration of human lung fibroblasts in vitro." *Scand J Immunol* **69**(4): 381-6.
- Zamai, L., M. Ahmad, I. M. Bennett, L. Azzoni, E. S. Alnemri and B. Perussia (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." *J Exp Med* **188**(12): 2375-80.
- Zarek, P. E., C. T. Huang, E. R. Lutz, J. Kowalski, M. R. Horton, J. Linden, C. G. Drake and J. D. Powell (2008). "A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells." *Blood* **111**(1): 251-9.
- Zavala-Flores, L. M., J. Villatoro-Hernandez, A. Gamez-Escobedo, M. Franco-Molina, B. R. Rangel-Colmenero, A. Villanueva-Olivo, Y. Gutierrez-Puente, R. M. de Oca-Luna, J. Valdes-Flores and O. Saucedo-Cardenas (2009). "Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by *Lactococcus lactis*." *Biotechnol Lett* **31**(2): 215-20.
- Zeidler, R., G. Reisbach, B. Wollenberg, S. Lang, S. Chaubal, B. Schmitt and H. Lindhofer (1999). "Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing." *J Immunol* **163**(3): 1246-52.
- Zeng, X., T. A. Moore, M. W. Newstead, R. Hernandez-Alcoceba, W. C. Tsai and T. J. Standiford (2003). "Intrapulmonary expression of macrophage inflammatory protein 1alpha (CCL3) induces neutrophil and NK cell accumulation and stimulates innate immunity in murine bacterial pneumonia." *Infect Immun* **71**(3): 1306-15.

- Zhang, F., G. Huang, B. Hu, Y. Song and Y. Shi (2011). "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): 256-64.
- Zhang, H., C. Zhong, L. Shi, Y. Guo and Z. Fan (2009). "Granulysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to Necroptosis." J Immunol **182**(11): 6993-7000.
- Zhao, D. M., A. M. Thornton, R. J. DiPaolo and E. M. Shevach (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." Blood **107**(10): 3925-32.
- Zhao, Y., J. Yang, Y. D. Gao and W. Guo "Th17 immunity in patients with allergic asthma." Int Arch Allergy Immunol **151**(4): 297-307.
- Zhao, Y., J. Yang, Y. D. Gao and W. Guo (2010). "Th17 immunity in patients with allergic asthma." Int Arch Allergy Immunol **151**(4): 297-307.
- Zheutlin, L. M., S. J. Ackerman, G. J. Gleich and L. L. Thomas (1984). "Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins." J Immunol **133**(4): 2180-5.
- Zhou, B., M. R. Comeau, T. De Smedt, H. D. Liggitt, M. E. Dahl, D. B. Lewis, D. Gyarmati, T. Aye, D. J. Campbell and S. F. Ziegler (2005). "Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice." Nat Immunol **6**(10): 1047-53.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-89.
- Zingoni, A., T. Sornasse, B. G. Cocks, Y. Tanaka, A. Santoni and L. L. Lanier (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." J Immunol **173**(6): 3716-24.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.