HAL
open science

CCL18 et réponse régulatrice, de la situation physiologique à l'atopie

Imane Azzaoui

To cite this version:

Imane Azzaoui. CCL18 et réponse régulatrice, de la situation physiologique à l'atopie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S019 . tel-01222616

HAL Id: tel-01222616

https://theses.hal.science/tel-01222616v1

Submitted on 30 Oct 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 obtenir le diplôme d'état de

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

CCL18 et réponse régulatrice, de la situation physiologique à l'atopie

---

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2011

Par

Imane AZZAOUI

Devant le jury composé de

Monsieur le Professeur Benoît WALLAERT Clinique des maladies respiratoires, Hopîtal Calmette, Lille	**Président**
Madame le Docteur Amanda PROUDFOOT Merck Serono, Genève, Suisse	**Rapporteur**
Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN Inserm UMR 915, Institut du Thorax, Nantes	**Rapporteur**
Monsieur le Professeur André-Bernard TONNEL Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 11, Lille	**Examinateur**
Madame le Docteur Anne TSICOPOULOS Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, 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
« Biomolécules et Inflammation Pulmonaire »
Directeur : Dr. Philippe LASSALLE

Devenue par la suite

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

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

Monsieur le Professeur Benoît WALLAERT, pour avoir accepté de présider ce jury.

Madame le Docteur Amanda PROUDFOOT, et Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN, pour avoir accepté la tâche prenante de rapporteur.

Monsieur le Professeur André-Bernard TONNEL, pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.

Madame le Docteur Anne Tsicopoulos, pour la rigueur de son encadrement au cours du Master recherche et les trois années de thèse passées sous sa direction.

Je tiens à remercier également l'ensemble des membres du laboratoire sans oublié les anciens et certaines personnes de passage.

Tout d'abord, la « Tsicopoulos's Team », un grand MERCI à Han, pour son encadrement technique surtout à mon arrivée au laboratoire, son soutien pendant la rédaction de l'article et la thèse et surtout pour sa grande gentillesse et bonne humeur habituelle. Saliha, ma co-doctorante, ma compagne de paillasse, merci pour ton aide et amitié tout au long de ces années. Merci à Fan, arrivée récemment de Chine et dans ses valises un caractère bien marqué, une grande gentillesse et surtout un sens de l'humeur incommensurable d'autant plus qu'il est insoupçonné. Merci à Coline pour son aide, nouvelle arrivée dans notre équipe mais pas dans le laboratoire.

À mes compagnes de bureau, Catherine et Corine (la belge), merci pour votre bonne humeur, vos critiques et nos échanges (scientifiques ou pas!).

Merci aux « Philippes » pour leur bonne humeur, vannes et échanges notamment lors du repas du midi ou des pots, et, ils furent bien nombreux!

Merci à Nathalie pour ses encouragements et P. LASSALLE pour ses conseils lors des réunions de laboratoire. A Ngoc, Ali et Edith pour leur aide et partage.

Aux anciens, Philipe Gosset, merci pour vos conseils techniques précieux, votre regard critique et nos discussions scientifiques. A Chang Ying, Joséphine, Jean, Muriel, Eve, David R, Benjamin, Mathieu, Latifa, Audrey, David T, Eva, Gwen, Solenne, Hussein…

Merci à l'équipe de physiologie de la faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques de Lille, de m'avoir accueilli et intégré à leur équipe d'enseignement pendant trois ans. Un grand Merci au Dr. Audrez Helleboid, ma responsable pédagogique, pour la rigueur de son encadrement et sa confiance. Merci au Dr. Carine Brinster pour ses enseignements, son amitié, nos fous rires et nos discussions d'immunologistes pures dans un « tas» de physiologistes.

Je remercie TRES sincèrement les membres de ma famille pour leur aide, soutien et amour. Et bien évidemment, mes amis, tout particulièrement : Sabrina (on y est!), Ibtissame, Cyrielle…

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS **p.3**

RESUME **p.5**

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE **p.7**

L'allergie **p.7**
Historique : L'allergie, une maladie vieille comme le monde…
Epidémiologie : L'allergie, une épidémie moderne…
Physiopathologie des maladies allergiques
Les phases de la réaction allergique

La cellule dendritique : Du début à la fin de la réaction allergique **p.11**
La capture allergénique
La maturation et la migration des DC
La présentation antigénique
Type de DC et la polarisation de la réponse T
La balance Th1/Th2
Les lymphocytes Th17
Les lymphocytes Th22
DC et induction de la tolérance

Les chimiokines **p.39**
Généralités
Structure et classification
Les CXC chimiokines ou CXC ligands (CXCL)
Les CC chimiokines ou CC
Les C chimiokines ou CL
Les CX3C chimiokines ou CX3CL
La séquence consensus BBXB
Régulation des chimiokines
Récepteurs de chimiokines
Structure
Mécanisme d'activation et de transduction du signal
Régulation des interactions chimiokine – récepteur
Régulation par la présentation des chimiokines à leurs récepteurs
Régulation par inhibition compétitive
Régulation par modification post-traductionnelle
Régulation par désensibilisation du récepteur
Activité chimiotactique : La diapédèse
Activités Extrachimiotactiques
Chimiokines en pathologies allergiques

Notre Chimiokine d'intérêt : CCL18 **p.56**
Généralités
Le gène CCL18
La protéine CCL18

Le récepteur de CCL18
Activité biologique de CCL18
Expression de CCL18
Les monocytes/macrophages
Les cellules dendritiques
CCL18 et pathologies
L'asthme allergique
Autres maladies à tropisme pulmonaire
Les pathologies cancéreuses
Les pathologies cutanées
Autres pathologies

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE p.67

TRAVAIL DE THESE p.68

Article I p.68
Article II p.79
Article III p.108
Article IV P.135

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES p.171

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES p.176

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN/DNA : acide désoxyribonucléique
AMPc/cAMP : adenosine monophosphate cyclique
APC : antigen presentation cells
ARN/RNA : acide ribonucléique
ATP : adenosine triphosphate

CCX-CKR : chemokine (C-C) receptor-like 1
CDx : cluster de différenciation x
CLA : cutaneous lymphocyte antigen
CMHI/II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou II
CTLA-4 : cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

Da : dalton
DC : dendritic cell
Der p : Dermatophagoïdes pteronyssinus protein

ECP : eosinophil cationic protein
EDN : eosinophil-derived neurotoxin
ELR : Glutamine-Leucine-Arginine
EPO : eosinophil peroxydase

FcxR : type x crystallizable-fragment receptor
Foxp3 : Forkhead box protein 3

GAG : glycoaminoglycanes
GC : glucocorticoides
GDP : guanosine di-phosphate
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCR : G-protein coupled receptor
GRK : G protein – coupled Receptor Kinase
GTP : guanosine tri-phosphate

HRB : hyperréactivité bronchique
hu-SCID : souris SCID humanisée par greffe systémique de PBMC

ICAM : intercellular adhesion molecule
ICOS : inducible T-cell co-stimulator
IDO : indoleamine-2,3-dioxygenase
IFNx : interféron x
IgX : immunoglobuline d'isotype x
Ilx : interleukine x
iNKT : invariant natural killer T cells
IPEX : immunodeficiency polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome

Jak : Janus kinase

Kd : constante de dissociation
KO : knock-out

LBA : lavage broncho-alvéolaire
Lc : lymphocyte
LC : Cellule de Langerhans
LFA-1 : lymphocyte function-associated antigen 1
LPS : lipopolysaccharide

MBP : Major basic protein
mDC : cellule dendritique myeloïde
MDDC : Monocyte-Derived Dendritic Cell

MMP : Matrix metalloproteinases

NK : natural killer

PAF : platelet activation factor
PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARC : pulmonary and activation-regulated chemokine
PBMC : peripheral blood mononuclear cells
pDC : cellule dendritique plasmacytoïde
pI : potentiel isoélectrique
PI3K : kinase de type phosphoinositide-3
PIP3 : phosphotodylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC : protein kinase C
PRR : Pattern Recognition Receptors

RANTES : regulated upon activation, normally T-expressed
ROR : Retinoic acid receptor-related orphan receptor

SCID : severe combined immunodeficiency
Statx : signal transducers and activators of transcription x

TCR : T-cell receptor
TGF : transforming growth factor
Thx : T helper x – réponse T auxiliaire type x
TLRx : Toll-like receptors x
TNFx : tumor necrosis factor x
Treg : lymphocyte T régulateur

VCAMx : vascular cell adhesion molecule x

ZO-1 : zonula occludens-1 protein

RESUME

Les chimiokines sont un élément essentiel du trafic cellulaire aussi bien homéostatique que dans des situations pathologiques. Outre cette fonction chimiotactique spécifique à ce type de molécules, on leur a récemment attribué une implication dans le profil de polarisation de la réponse adaptative spécifique, en agissant directement sur les lymphocytes T (Lc T) ou indirectement par le biais des cellules dendritiques (DC).

CCL18 est une chimiokine exprimé préférentiellement au niveau pulmonaire et de façon moindre au niveau ganglionnaire. Il est capable d'attirer les DC et les Lc T et est induit par les cytokines de type Th2 telle que l'IL-4, l'IL-13, mais aussi par la cytokine immunomodulatrice l'IL-10. Au laboratoire il a été montré une implication de CCL18 dans l'asthme allergique, et cette chimiokine a été associée à différentes pathologies à tropisme pulmonaire ou non avec un rôle pas toujours très clair. L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle immunobiologique de cette chimiokine, en base et en situation atopique.

L'effet direct du CCL18 a été évalué sur la polarisation de la réponse T. Le prétraitement des Lc T mémoire $CD4^{+}CD25^{-}$, de sujets non allergiques, avec le CCL18 conduit à la génération de Lc T régulateurs (Treg) $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ produisant de l'IL-10 et du TGF-b capables d'inhiber la prolifération des Lc T effecteurs, à la fois par un mécanisme cytokine et contact dépendant. Cependant, cet effet régulateur de CCL18 est perdu lorsque les cellules T proviennent de sujets allergiques. L'effet indirect du CCL18 a été évalué sur la réponse immune via les DC. La différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-SCF et CCL18 conduit au développement de DC de phénotype semi-mature, expriment le CCR7, produisant de l'IL10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygenase. Ces DC induisent le développent de Lc Treg de type Tr1 produisant de l'IL-10 et capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs par un mécanisme cytokine dépendant. Lorsque les monocytes proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu en liaison avec la diminution de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif. Par ailleurs, CCL18 pourrait également jouer un rôle dans la résolution de la réaction allergique par un effet chimiotactique vis-à-vis d'une sous population de Lc Treg $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}LAP^{+}$. La dernière étude concerne une approche dans un modèle murin d'asthme allergique, induit par l'ovalbumine chez la souris Balb/cByJ. D'un point de vue fonctionnel, l'administration de CCL18 par voie intratrachéale à des animaux sensibilisés permet d'inhiber le développement de la réaction asthmatique, en diminuant l'inflammation pulmonaire (réduction de l'infiltration éosinophilique, inhibition de la production locale de cytokines Th2) et protège ces derniers contre l'altération de leur

fonction respiratoire (protection contre l'hyperréactivité bronchique, avec inhibition de l'hypersécrétion de mucus). Toutefois, les mécanismes cellulaires à l'origine de cette protection sont encore a élucidées.

L'ensemble de ces études montre, pour la première, qu'une chimiokine est capable d'induire le développement d'une réponse tolérogénique. Cependant, cette fonction est absente chez les donneurs allergiques qui présentent un défaut de liaison de CCL18 à son récepteur, ce qui pourrait participer à la diminution de la tolérance observée dans les maladies allergiques. Ces données font du CCL18 et de son récepteur putatif des cibles thérapeutiques potentielles.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'allergie

Historique : L'allergie, une maladie vieille comme le monde…

Comme en témoignent les hiéroglyphes inscrits sur la tombe du roi Ménès d'Égypte ce monarque succomba, il y'a plus de 4600 ans, à une piqure de guêpe. Le philosophe Romain Lucrèce (98-55 avant JC) a écrit dans son unique livre, *De la nature des choses*, « ce qui est chez les uns une nourriture se révèle pour d'autres un amer poison ». En 1902, soit sept ans après la mort de Louis Pasteur, Charles Richet et Paul Portier découvrent qu'une immunisation tue au lieu de protéger. Embarrassés par cette découverte, ils nomment le phénomène anaphylaxie, en opposition à la prophylaxie (protection). Rapidement on comprend que l'anaphylaxie est une réaction allergique violente, et l'allergie (littéralement une autre réaction) devient alors une réaction à part entière, et bifurque vers l'immunologie suite aux découvertes qui se succédèrent tout au long du dernier siècle.

Épidémiologie : L'allergie, une épidémie moderne …

Les études épidémiologiques démontrent que les pathologies allergiques (certaines formes d'asthme, de rhinite, d'eczéma et de réactions digestives) ont connu au cours des vingt dernières années une recrudescence fulgurante. Tout particulièrement dans les pays industrialisés, où il a été démontré que plus du quart de la population présente une réactivité à des allergènes communs [Pascual, 2000], plaçant ainsi l'allergie au sixième rang mondial des maladies chroniques. Comment expliquer l'augmentation des allergies ?

Plusieurs hypothèses ont été avancées. Des modifications du style de vie, d'une part, le calfeutrement conduit à un accroissement de la température et de l'humidité intérieure favorisant la production d'allergènes intérieurs. A cela s'ajoute l'augmentation du nombre d'animaux de compagnie qui vivent dans les maisons. D'autre part, l'amélioration de l'hygiène a modifié l'environnement microbien, notamment pendant la prime enfance, provoquant un défaut d'éducation du système immunitaire. Le rôle de la pollution dans le déclenchement des allergies n'est pas encore très clair, néanmoins on sait qu'elle peut exacerber un état respiratoire défaillant.

Ces pathologies induites par les allergènes peuvent être fatales, c'est le cas de l'asthme. Il s'agit de la première maladie chronique de l'enfant. On comptabilise plus de 3,5 millions asthmatiques en France, 6% de la population adulte et 10% des enfants. Aujourd'hui, l'asthme provoque plus de 1 000 décès par an dont la moitié touche des personnes de moins de 30 ans. Une cause allergique est retrouvée chez 70 à 80 % des adultes asthmatiques et chez 95 % des enfants. Ce chiffre a baissé de moitié en France entre 1997 et 2005 grâce aux traitements anti-inflammatoires et une meilleure prise en charge [Annesi-Maesano, 2008]. Le coût de cette maladie pour la société est important, elle est responsable de 600 000 journées d'hospitalisation et de 7 millions de journées d'arrêt de travail par an. Il est donc nécessaire de mettre en place des stratégies préventives et thérapeutiques efficaces pour lutter contre les allergies.
[www.irdes.fr ; ISAAC-France ; www.sante.gouv.fr ; www.who.int ; Allergy Facts and Figures, NIAID, 2005; Editorial, Nature Immunol, 2005]

Physiopathologie des maladies allergiques

La définition des maladies allergiques introduit les deux notions d'hyperréactivité du sujet allergique et de spécificité à l'antigène de provocation. Elles résultent d'une combinaison de différents facteurs. Des facteurs génétiques ; cette prédisposition héréditaire est nommée atopie, et est caractérisée par une hypersensibilité précoce médiée par les immunoglobulines E (IgE), il est cependant possible de posséder un terrain atopique sans pour autant développer de réactions allergiques. D'autres facteurs entrent en jeu, notamment des facteurs environnementaux spécifiques (allergènes) pouvant être amplifiés par des facteurs non spécifiques (infection, pollution…).

Chez un sujet sain, ces substances sont parfaitement tolérées grâce à un système de défense qui implique des facteurs mécaniques (Barrière cutanée, mucus, cils, toux, barrière épithéliale…) et des facteurs immunitaires humoraux et cellulaires. Cependant, une réponse immune inefficace ou inappropriée peut entrainer le développement de réactions inflammatoires d'intensités variables face aux allergènes.

Les allergènes sont des substances de nature variée, mais essentiellement protéiques, ils forment un groupe d'antigène complexe très hétérogène et possèdent des déterminants antigéniques, ou épitopes, qui se lient spécifiquement au paratope des IgE mais aussi des IgG, IgM et IgA. Le mode d'introduction de l'allergène dans l'organisme permet d'avoir une

orientation clinique. Il existe plusieurs types d'allergènes notamment les pneumallergènes et les trophallergènes. Les pneumallergènes, allergènes véhiculés par l'air, sont généralement impliqués dans des manifestations respiratoires, oculaires ou conjonctivales. Ces allergènes inhalés peuvent être soit saisonniers comme les pollens, soit perannuels, localisés dans des lieux d'habitation confinés (acariens de la poussière de maison). Les trophallergènes, allergènes d'origine alimentaire (lait, œuf…), sont responsables de symptômes digestifs ou systémiques, mais ces troubles affectent également d'autres organes comme la peau. Les venins d'insectes ou les médicaments quant'à eux induisent des réactions systémiques. Un allergène est dit « majeur » quand un antigène purifié déclenche une allergie chez 50% ou plus des patients testés, et qu'il présente des IgE spécifiques, avec des tests cutanés immédiatpositifs, à une concentration très faible, chez au moins 90% des sujets ayant la maladie allergique en relation avec cet allergène. Les acariens, les pollens, les poils d'animaux et moisissures sont les allergènes les plus fréquents.

On ne devient allergique qu'à la suite d'au moins deux contacts avec un allergène donné. Le premier contact ne déclanche aucune réaction visible cliniquement et aux contacts suivants, l'allergène entrainera une cascade de réactions aboutissant à des manifestations pathologiques, qui peuvent être exacerbées par des co-facteurs ou allergies croisées.

Les phases de la réaction allergique (Figure 1)

La phase de sensibilisation est le premier contact de l'allergène avec le système immunitaire qui conduit à sa reconnaissance. Les cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques, capturent l'allergène et le présentent aux lymphocytes T naïfs, cette présentation aboutit à une polarisation de la réponse immune vers un profil Th2, et s'accompagne de la production d'IgE spécifiques de l'allergène par les lymphocytes B. Les IgE se répartissent ensuite dans l'ensemble de l'organisme, via la circulation sanguine, et se fixent à leur récepteur de haute affinité présents sur des cellules cibles de la peau et des muqueuses (mastocytes) ainsi que sur des cellules cibles circulantes (granulocytes basophiles). Cette première étape est muette cliniquement, elle prépare l'organisme à réagir de façon immédiate lors d'un second contact avec l'allergène.

La réaction allergique proprement dite se produit lors du deuxième contact avec l'allergène (ou d'un allergène de structure proche dans le cas des allergies croisées), elle est subdivisée en deux réponses, une réponse immédiate et une autre retardée. La réponse

immédiate est caractérisée par l'apparition, dans les premières minutes, de signes cliniques dépendants du tissu cible (irritation tissulaire, formation d'un œdème, sécrétion de mucus ou d'une obstruction bronchique marquée par un spasme du muscle lisse bronchique). Le pontage des IgE spécifiques membranaires produites lors de la phase de sensibilisation active les mastocytes et basophiles luminaux ou intra épithéliaux et entraîne alors la libération du continu de leurs granules intracellulaires, des molécules vaso-actives ou cytokiniques et chimiotactiques [MacGlashan, 2008]. Les médiateurs vaso-actifs (histamine, leucotriènes et prostantigènelandines) augmentent la perméabilité de la barrière épithéliale, permettant d'accroitre le passage des allergènes dans la sous-muqueuse en induisant une vasodilatation. Les agents chimioattractants sont à l'origine du recrutement plus tardif de certaines cellules immunitaires. Le recrutement secondaire des lymphocytes et éosinophiles ainsi que les basophiles définie la phase tardive de la réaction allergique. Cette réponse se produit quelques heures après l'exposition allergénique, ces cellules vont générer une cascade inflammatoire, dont la durée est étroitement liée à la quantité d'IgE produite lors de la phase de sensibilisation ainsi qu'à la clairance allergénique, en libérant à leur tour des substances cytotoxiques (Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil Peroxydase (EPO)) [Gleich, 1990] qui vont aboutir à la destruction du tissu environnant et l'endommagement de l'organe touché (destruction de la barrière épithéliale, inflammation de la sous-muqueuse diminuant le diamètre des voies aériennes, perte de l'intégrité de la barrière cutanée…). Cette réaction, suite à des expositions répétées avec l'allergène, peut devenir de plus en plus intense et destructive, et acquérir un caractère chronique capable dans certains cas de s'auto-entretenir.

La chronicité de cette réaction au niveau de l'organe touché induit des anomalies structurales et anatomiques suite aux tentatives de réparation tissulaire (dépôts dans la matrice extracellulaire, métaplasie des muqueuses, augmentation de la masse musculaire lisse, remodelage vasculaire…) ce qui provoque un dysfonctionnement plus au moins prononcé de l'organe atteint [Galli, 2008].

L'inflammation déclenchée par l'allergène implique des mécanismes immunitaires cellulaires et moléculaires polymorphes. La place de ces différents acteurs dans les phases de cette réaction sera mise en revue dans les pages suivantes.

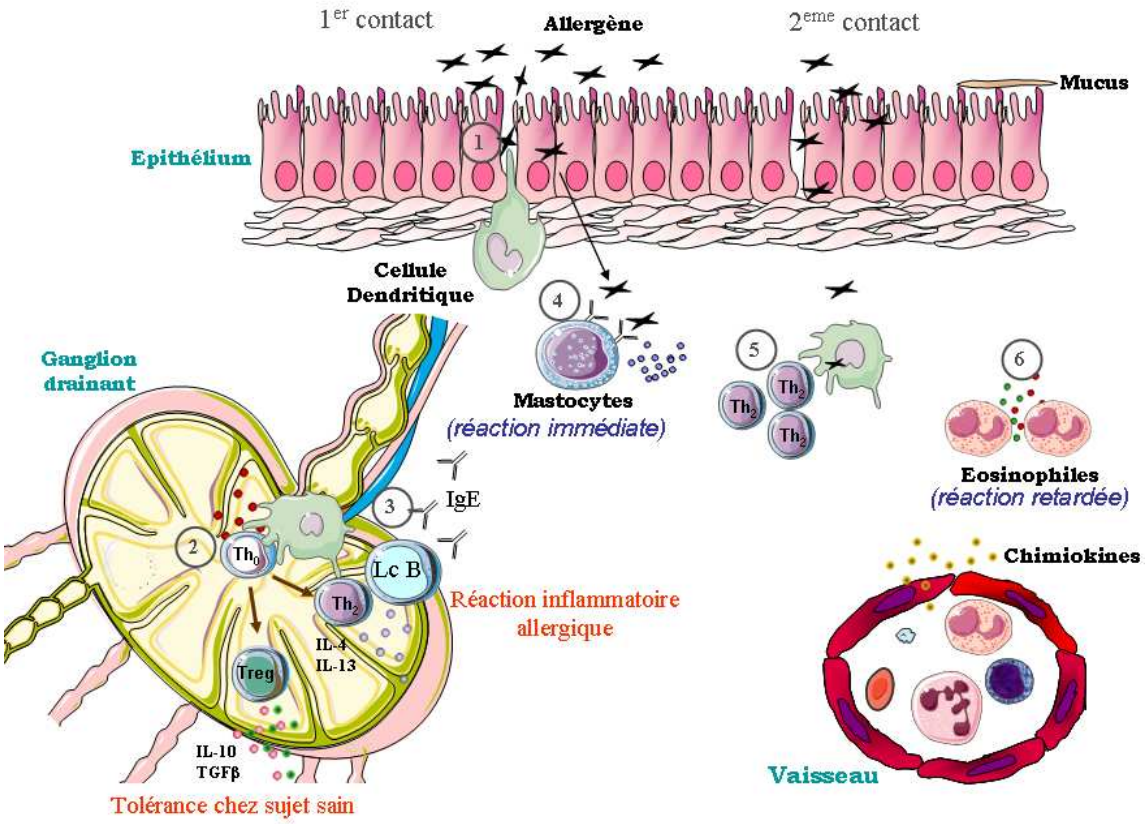


Figure 1 : Régulation de la réaction inflammatoire allergique au niveau d'un épithelia. 1. capture allergénique, 2. Présentation de l'allergène et polarisation de la réponse immune, 3. Réponse humorale, 4. Réaction immédiate, 5. Recrutement de lymphocyte Th2, 6. Réaction tardive médiée entre autres par les éosinophiles [Azzaoui I.].

La cellule dendritique : Du début à la fin de la réaction allergique

La capture allergénique

La cellule dendritique (DC), en tant que cellule présentatrice d'antigène (APC) professionnelle, a un rôle pivot dans l'initiation des réactions d'hypersensibilité et est à la base du développement de la réponse adaptative spécifique**.** Véritables sentinelles intervenant dans les processus d'immunosurveillance au niveau des interfaces de l'organisme. Les DC sous leur forme immature sont caractérisées par un haut pouvoir de capture et d'internalisation. Elles colonisent les épithéliums de revêtement [Steinman, 1973], pour y capturer les antigènes comme il a été montré au niveau de la lumière intestinale [Chirdo, 2005], au niveau trachéal [Bimczok, 2006] et également au niveau pulmonaire avec les DC

integrine $\alpha 2\beta 7^{+}$ [Sung, 2006]. Elles sont capables de projeter leurs dendrites à travers les jonctions des cellules épithéliales et ainsi capturer les antigènes présents à la surface [Bimczok, 2006]. Les DC expriment des protéines de jonction serrées (ZO-1 et Occludines), et permettent donc le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale (Figure 2). En outre, certains allergènes (pollen de Cupressaceae, acariens, Alternaria) possédant une activité protéasique forte, sont capables de digérer les protéines de jonction, ainsi augmentant la perméabilité de l'épithélium et potentialisant l'immunoréactivité de ces allergènes [Runswick, 2007].

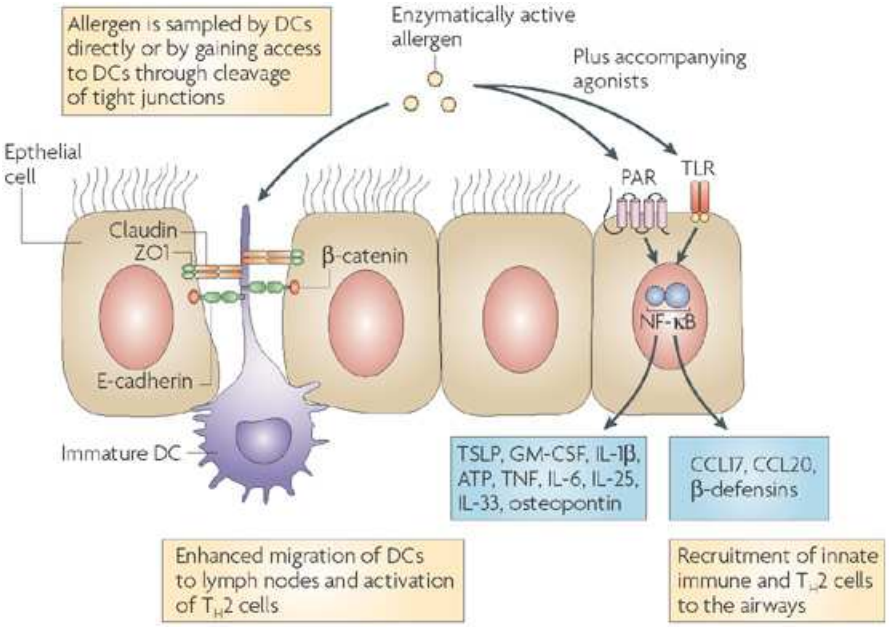


Figure 2 : Les cellules dendritiques au contact de la lumière des voies respiratoires en formant des extensions dendritiques entre les cellules épithéliales [Hammad, 2008].

Les DC expriment à leur surface tout un panel de récepteurs (PRR) reconnaissant des motifs commun à de nombreux pathogènes (PAMP), ces récepteurs de l'immunité innée peuvent être aussi bien cytoplasmiques que intracellulaires et sont divisés en plusieurs familles : les récepteurs d'épuration ou « scavenger receptors » (SR), les récepteurs aux lectines de type-C (CLR), les récepteurs NOD-like, les RNA hélicases et les récepteurs Toll (TLR) (Figure 3 et Tableau 1). Le rôle des PRR dans l'allergie commencent à être de plus en plus exploré.

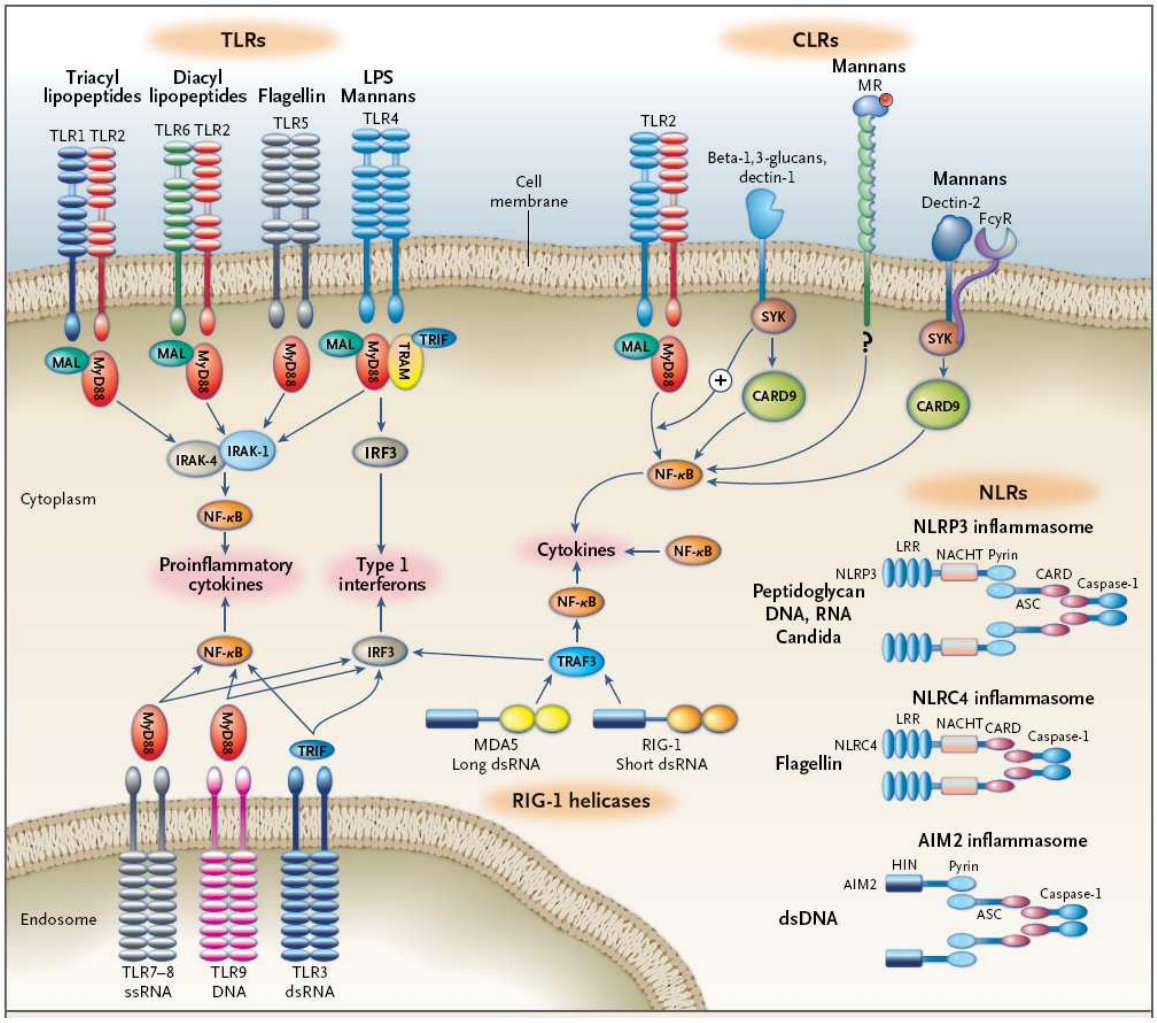


Figure 3 : Représentation schématique de la structure et les principales voies de signalisation des membres de la famille des PRR [Netea, 2011].

Il est connu que l'interaction entre les hydrates de carbone et les récepteurs de lectines de type C génère une réponse Th2 [van Liempt, 2007]. Ce qui soutient un rôle des glucides complexes dans les réponses allergiques. Plus particulièrement, il a été rapporté que le β-glucane présent dans le glycoallergène d'arachide Ara h 1 active les DC dérivées de monocytes et induit la production de cytokines Th2 via le DC-SIGN. Conformément au rôle de certains récepteurs de cette famille dans la reconnaissance des allergènes, notamment Der p 2 et le pollen de graminées qui lient et activent le DC-SIGN et L-SIGN respectivement [Nathan, 2009], ainsi que Der p 1 par le mannose récepteur (MR) [Deslee, 2002]. Il a été montré que Der p 1 pouvait se lier aux protéines du surfactant SP-A et D et les dégrader via son activité protéasique, augmentant ainsi son allergénicité [Deb, 2007].

Table 1. Overview of Pattern-Recognition Receptors (PRRs) and Their Respective Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP) Ligands, According to PRR Class.*

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

Tableau 1 : Les récepteurs de l'immunité innée (PRR) et leurs ligands (PAMP) [Netea, 2011].

Les macrophages alvéolaires et DC sont capables de lier les granules d'amidon de pollen avec des récepteurs lectinique de type C [Currie, 2000]. Duan *et al.* ont démontré que le récepteur Nod2 induit une réponse Th2 dans un modèle souris de tolérance allergénique [Duan, 2010]. Les TLR sont la famille des PRR la plus étudiée dans l'inflammation allergique. Des études épidémiologiques ont fait état d'une corrélation inverse entre le niveau élevé des produits bactériens comme le LPS, ligand du TLR4, dans l'environnement au cours de la prime enfance et le développement des allergies [Braun-Fahrlander, 2002] [Gehring, 2002] [Riedler, 2001]. Le CpG, ligand du TLR9, associé à un allergène délivré par voie intra trachéale ou seul en injection intrapéritonéale, inhibe clairement le développement de l'inflammation allergique expérimentale et ce à toutes les doses [Kline, 1998] [Santeliz, 2002]. La molécule AVE7279, antagoniste du TLR9, est en essai clinique phase 1 pour le traitement de l'asthme et de la rhinite allergique [Gearing, 2007]. Les récepteurs TLR2 et TLR4 sont tantôt décrits pro [Redecke, 2004] [Eisenbarth, 2002] [Hammad, 2009] tantôt anti allergiques [Page, 2009] [Hollingsworth, 2006]. Eisenbarth *et al.* ont mis en lumière cette complexité, en démontrant que l'impact du TLR4 sur l'inflammation allergique est dépendant de la dose de LPS [Eisenbarth, 2002]. Plus précisément, la co-exposition à l'antigène OVA et de fortes concentrations de LPS (100 mg) induit une réponse immunitaire Th1, tandis que de faibles concentrations de LPS (100 ng) mènent à une réponse Th2. Bien que ces études aient fourni une explication plausible pour les effets contradictoires observés dans les études épidémiologiques, ils n'ont pas expliqué comment une stimulation par le même récepteur pourrait entraîner deux conséquences distinctes au niveau biologique. Pour résoudre ce problème, Tan *et al*. ont évalué la réponse allergique chez des souris chimériques exprimant le TLR4 dans des compartiments différents [Tan, 2010]. Ils montrent qu'une forte dose de LPS aboutit toujours à une réponse Th1, chez des souris exprimant le TLR4 que dans le compartiment stromal. Étonnamment, ils ont constaté que des niveaux faibles de LPS, chez ces souris ne montre ni une réponse Th1 ni Th2. Cependant, lorsque des souris aillant le TLR4 dans les deux compartiments, stromal et hématopoïétique, ont été exposés à de faibles concentrations de LPS, elles montrent une réponse Th2. Ce qui suggère qu'une fois qu'un seuil de stimulation du TLR4 est atteint dans le compartiment stromal, les réponses Th2 s'ensuivent. Les auteurs proposent que la capacité des cellules stromales (probablement les cellules épithéliales) à conduire des réponses Th2 est due à la production de la cytokine Th2 TSLP par les cellules épithéliales, elles même capable de promouvoir des DC qui expriment Jagged-1 mais pas le Delta-4, tous deux ligands de Notch, ce dernier induisant une réponse Th1. Un autre groupe [Hammad, 2009] a montré que le TLR4 stromal est suffisant pour

entraîner une réponse Th2 lorsque les souris ont été exposées aux extraits d'acariens contenant de faibles niveaux de LPS, suggérant une présence d'un ligand endogène. Les études biochimiques de Gruber *et al*. et cristallographique de Derewenda *et al*. montrent des homologies structurales entre l'allergène Der p 2 et MD-2, une molécule requise pour la reconnaissance du LPS par le TLR4 [Gruber, 2004] [Derewenda, 2002]. Aussi il a été décrit, pour la première fois, une activation directe d'un TLR par un allergène dans le cas de la blatte et du TLR2 [Page, 2008]. L'environnement, infectieux notamment, à une fonction importante dans la sensibilisation à l'allergène comme suggéré par Boasen *et al.* [Boasen, 2005] et Lam *et al.* [Lam, 2008] suite aux difficultés qu'ils ont eu pour induire un asthme expérimental chez des souris TLR2, TLR4, TLR9 et MyD88 déficientes, souris qui présentaient un défaut de maturation des DC et donc un défaut de réponse à l'exposition allergénique.

D'autres mécanismes interviennent dans cette capture antigénique hormis les récepteurs de l'immunité innée. Le FcεRI (recepteur de forte affinité pour l'IgE) est impliqué dans l'endocytose médiée par les cellules de Langerhans [Geiger, 2000]. L'implication des DC dérivées de monocytes reste discutée [van den Heuvel, 1998] [Buentke, 2000] [Kraft, 2001]. Les FcγRI et FcγRII sont impliqués dans l'internalisation de particules opsonisées par les DC du sang circulant [Fanger, 1996]. Dans tous les tissus non lymphoïdes, les DC sont dans un état immature, un état qui leur confère une spécialisation dans l'internalisation de l'antigène. L'absorption de cet allergène peut se faire par simple endocytose du matériel antigénique impliquant des puits recouverts de clathrine. Ou encore par macropinocytose constitutive qui implique l'actine du cytosquelette et entraîne l'engloutissement de grandes quantités de fluides et solutés [de Baey, 2000]. La macropinocytose est le mécanisme dominant impliqué dans l'absorption de protéines recombinantes, Bet v 1 et Phl p, allergènes de pollen par les cellules de Langerhans, qui peut être inhibé par la cytochalasine D et l'amiloride [Noirey, 2000]. Enfin, la phagocytose, permet d'endocyter les particules antigéniques, comme démontré sur des cellules de Langerhans immatures avec des billes de latex et des bactéries, ainsi que des cellules apoptotiques [Banchereau, 2000].

La maturation et la migration des DC

Les antigènes qui sont capturés par l'un de ces mécanismes s'accumulent dans le compartiment d'endocytose, où ils sont chargés sur des molécules de HLA de classe II nouvellement synthétisées [Rodriguez, 1999]. Dans le compartiment d'endocytose, l'antigène est clivé en petits peptides immunogènes par des enzymes de la famille des cathepsines, le pH du compartiment semble être un élément important de cette étape.

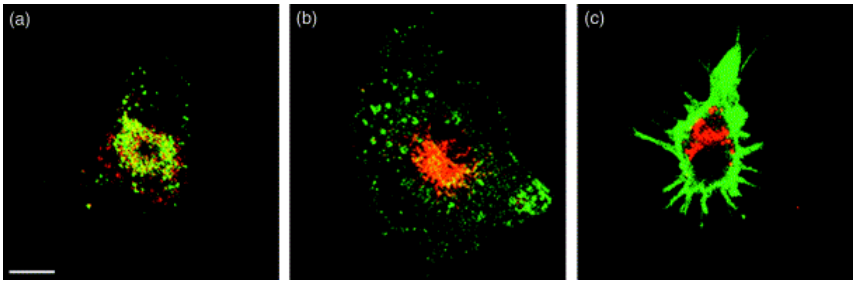


Figure 4 : Localisation des molécules du CMH de classe II selon le stade de développement des DCs. Des BMDCs immatures (a), en cours de maturation (b) et matures (c), ont été marquées par immunofluorescence pour les molécules du CMH II (vert) et DC-LAMP (rouge), et sont visualisées par microscopie confocale [Mellman, 1998].

Les DC migrent vers les ganglions lymphatiques drainant pour stimuler les cellules T naïves grâce aux récepteurs de chimiokines. Ainsi, les DC immatures expriment le CCR6, et sont attirés dans les sites où CCL20 est produit, à savoir par les kératinocytes, cellules endothéliales et l'épithélium recouvrant les amygdales, les plaques de Peyer et l'épithélium pulmonaire [Cook, 2000] [Dieu-Nosjean, 2000]. Une fois l'antigène internalisé, les DC commencent leur processus de maturation, caractérisé par la perte d'expression des molécules d'internalisation de l'antigène et le CCR6 puis entament une spécialisation dans la présentation de l'antigène avec un gain de l'arsenal de molécules adéquates, le HLA-DR et les molécules de costimulation (CD80, CD86…), ainsi que le récepteur chimiokinique CCR7 qui leur permettra de quitter l'endroit de la rencontre avec l'antigène et se diriger vers la zone T des ganglions drainants en réponse aux chimiokines CCL19 et CCL21, pour présenter l'antigène aux Lc T naïfs et induire une réponse adaptative spécifique (figure 5).

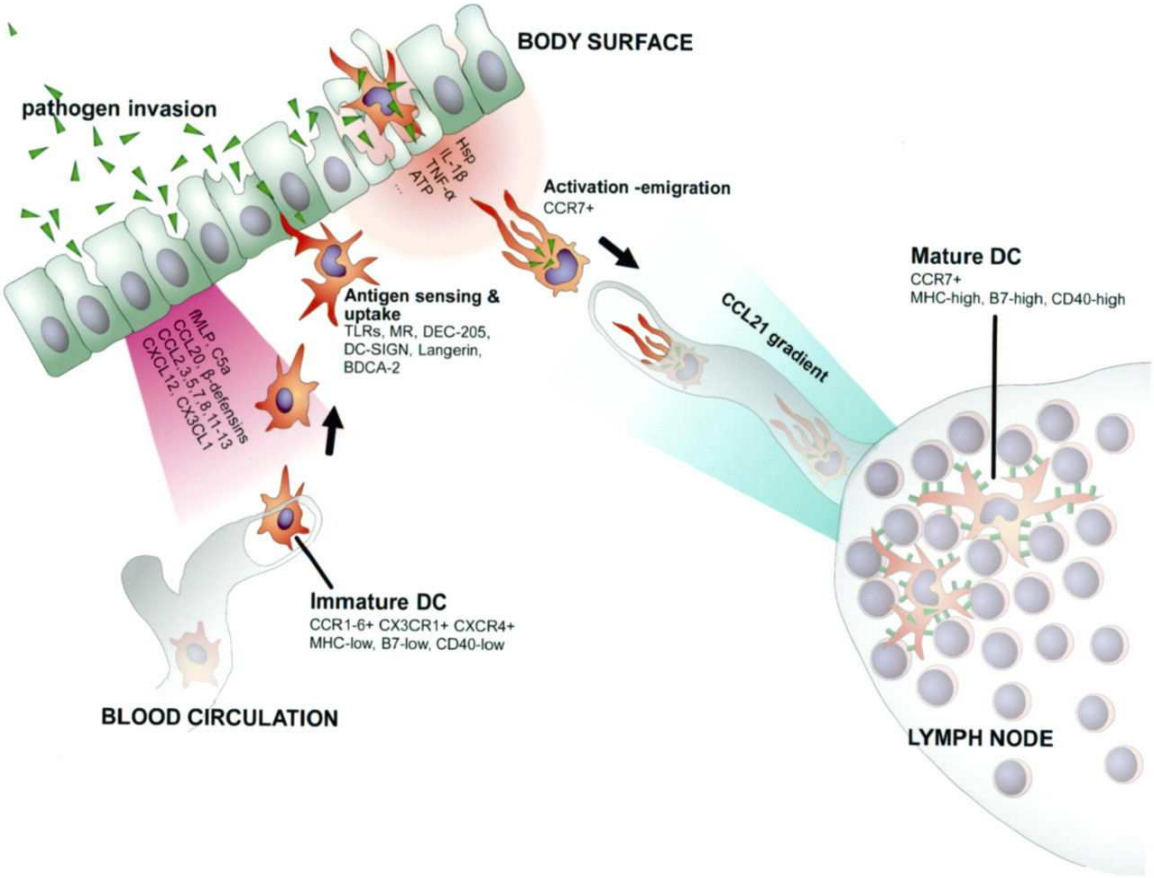


Figure 6 : Migration des cellules dendritique des épithélia vers les ganglions drainants [Vermaelen, 2005].

La présentation antigénique

Les DC matures interagissent avec les cellules T naïves dans les ganglions à plusieurs reprises, elles engagent et désengagent le contact avec l'antigène porté par les DC via l'interaction avec des molécules adhérences telles que DC-SIGN et CD54, des molécules d'adhésion intercellulaire et le CD11a/CD18 [Geijtenbeek, 2000] [Gunzer, 2000]. L'interaction entre les molécules de costimulation des cellules T naïves en association avec les rafts lipidiques constitue une synapse immunologique très complexe, qui déclenche la machinerie de transduction du signal [Wulfing, 1998] [Anderson, 2000]. Au niveau de la synape immunologique, on retrouve des signaux de stimulation permis par des kinases qui phosphoryleront les motifs ITAM des régions intra-cytoplasmique des chaînes du CD3 associées au TCR. Des signaux de costimulation, indispensable à une activation totale du lymphocyte, qui sont induit par l'interaction entre le cluster de différenciation CD28 présent à la surface du lymphocyte T-CD4 et le récepteur B7 présent à la surface de la cellule présentatrice d'antigène, ainsi que l'interaction entre le ligand du

récepteur CD40 (CD40-ligand) présent à la surface du lymphocyte et le cluster de différenciation CD40 présent à la surface de la cellule présentatrice d'antigène. En effet, Les co-signaux permettent de franchir un seuil d'activation nécessaire à la différenciation et à la prolifération du lymphocyte T [Vieira, 2000] ainsi qu'à la survie. Dans des expériences de coculture T/DC, les interactions permettent un arrêt de la mort de cellules T normalement observée *ex vivo*. Des signaux de survie peuvent être déclenchés par des DC, ils mettent en jeu les molécules de CMH, LFA-1, CD28, et une molécule encore non identifiée, toutes réclamant l'intervention de kinases de la famille src, mais pas de la PI3K [Feuillet, 2005].

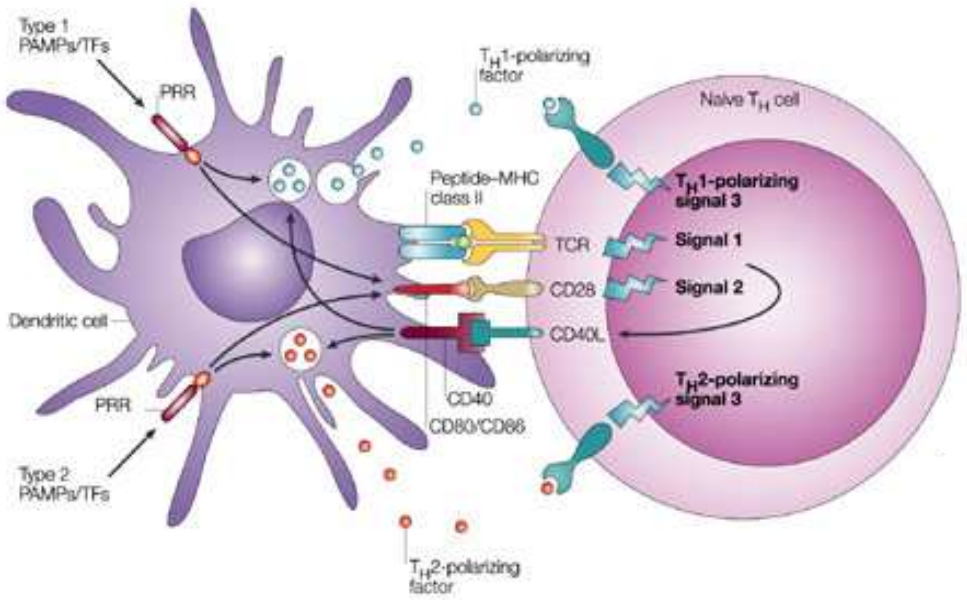


Figure 7 : Interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte T. Le schéma reprend les trois types d'interaction nécessaires à une polarisation T efficace. Le premier signal est apporté par la présentation antigénique via le CMHII au TCR. Le second signal provient des molécules de costimulation CD80/CD86, régulées par l'activation des PRR et exprimées à la surface de la DC. Ces molécules activent le CD28 lymphocytaire qui induit notamment l'expression du CD40L et permet la stimulation en retour de la cellule dendritique. Le troisième signal est constitué par des médiateurs polarisant solubles ou membranaires (IL12, IFN-γ ou ICAM-1 pour les Th1 ; IL4, IL13, ou OX40L pour les Th2) apportés essentiellement par la DC activée par les PRR [Kapsenberg, 2003].

Type de DC et la polarisation de la réponse T

Les DC déterminent la polarisation de la réponse T (Th1, Th2, Th17, Th22, Treg…) (figure 8). Cette polarisation va dépendre tout d'abord du type de DC impliquée qui se distingue sur des bases phénotypiques, morphologiques, fonctionnelles, ontogéniques et/ou anatomiques [Banchereau, 2000], le profil d'expression des molécules de costimulation, 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, 2000].

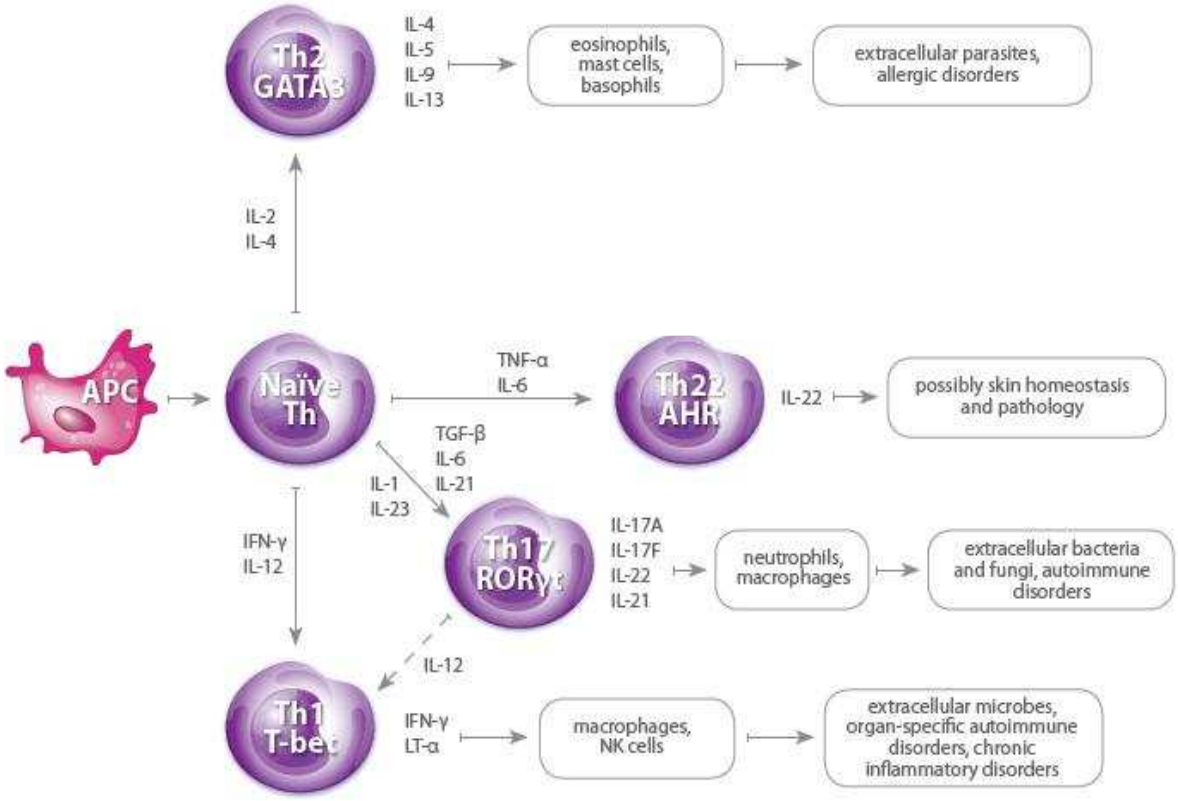


Figure 8 : Polarisation de la réponse T par les DC. Cytokines produites par chaque population lymphocytaire et leur rôle dans certaines maladies.

Les DC sont classées en deux sous-populations en fonction de leur origine biologique et de leur fonction, les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmacytoïdes (pDC) (figure 9). Les mDC sont subdivisées en migratoires et résidentes, les migratoires correspondent au modèle classique des DC. Elles résident à l'état basal en périphérie. Suite à la phagocytose d'une particule antigénique et/ou à la réception de signaux de danger, elles migrent vers les ganglions lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques. Elles arrivent à l'état

mature dans les organes lymphoïdes où elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs. Ex : cellules de Langerhans, DC des muqueuses. Les DC résidentes sont dans les organes lymphoïdes, où elles se trouvent normalement à l'état immature. Elles collectent et présentent les antigènes du soi ou étrangers au sein même des organes lymphoïdes. Ex : la plupart des DC du thymus et de la rate. Il existe également des DC inflammatoires qui sont recrutées dans les tissus suite à une inflammation où une infection. Elles ne sont pas présentes à l'état de repos. Elles seraient principalement issues de la différenciation des précurseurs myéloïdes à savoir les monocytes du sang. Les pDC, se différencient à partir de précurseurs hématopoïétiques au niveau des organes lymphoïdes, elles sont circulantes ou résidentes, rondes et sans dendrites à l'état basal mais les développent après activation. Ces cellules sont essentiellement impliquées dans la réponse anti-virale, après stimulation par un antigène viral, elles produisent de grandes quantités d'interférons de classe I (IFNα, IFNβ) [Siegal, 1999].

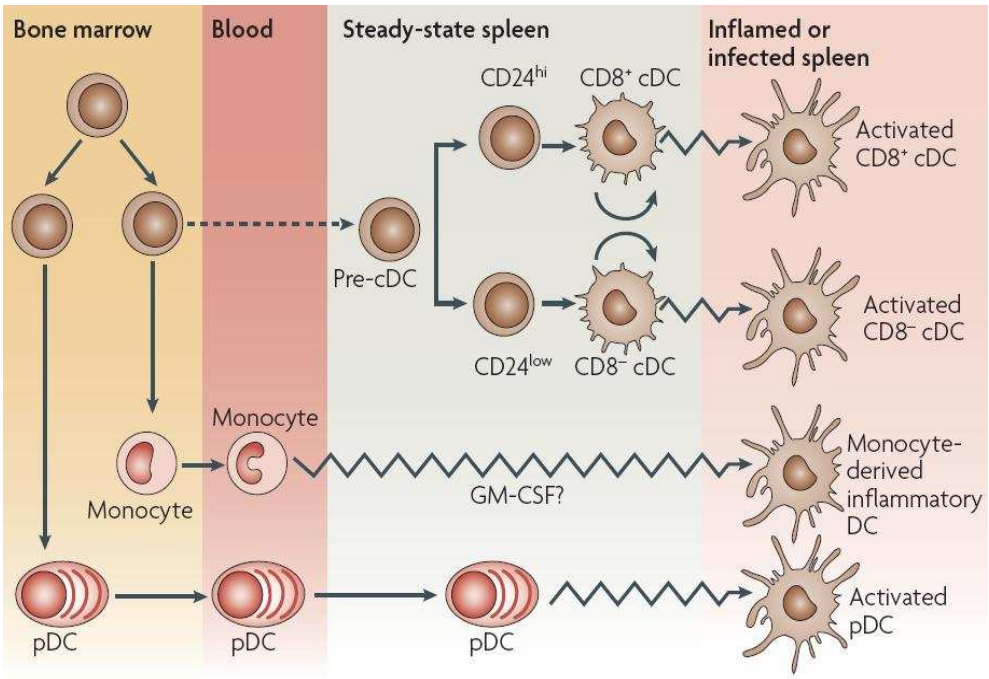


Figure 9 : Développement des sous-populations de DC. Issues de précurseurs hématopoïétiques communs (CD34+), les DC d'origine myéloïde sortent de la moelle pour s'accumuler au niveau tissulaire. Les pDC proviennent quant à elles de précurseurs lymphoïdes et son essentiellement présentes au niveau circulant. Ces dernières peuvent toutefois s'accumuler au niveau tissulaire en situation inflammatoire [Shortman, 2007].

Contrairement au mDC, les pDC ont de faibles capacités de phagocytose et de pinocytose [Grouard, 1997]. Cependant, il a été montré que ces cellules sont également

capables d'internaliser les antigènes puis de migrer vers les ganglions pour effectuer une présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs [Sapoznikov, 2007] [Soumelis, 2006]. Toutefois, contrairement aux mDC, ces cellules induisent une tolérance antigénique dans des modèles animaux d'asthme allergique. La déplétion des pDC induit une réponse Th2 au niveau des voies aériennes, alors que le transfert adoptif des pDC empêche le développement de l'asthme [Deheer, 2004]. Une explication possible pour les propriétés tolérogènes des pDC est leur capacité à produire de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la prolifération des cellules T [Hayashi, 2004]. Une augmentation du nombre de DC myéloïdes dans la muqueuse des voies respiratoires et dans le lavage broncho-alvéolaire a aussi été montrée dans un modèle murin d'asthme, et cette augmentation est due à une production accrue de progéniteurs issus de la moelle osseuse [van Rijt, 2002]. Chez l'homme, le rôle des pDC reste moins clair, des pDC traitées à l'IL3 sont en effet à la fois capable d'induire une polarisation des T vers un profil Th2 par une voie OX40-OX40L dépendante, mais elles sont également capables d'inhiber cette différentiation Th2 par une production d'IFN de type I en cas d'infection virale [Ito, 2004]. Dans le psoriasis, les lésions cutanées sont très tôt infiltrées par des pDC activées, en parallèle d'une diminution du nombre de pDC circulantes dans le sang. L'inhibition de la production d'IFN par les pDC avec des anticorps anti-BDCA-2 limite le développement des lésions de la peau dans un modèle de xénogreffe, en fournissant une preuve de causalité de la fonction des pDC dans la maladie [Nestle, 2005]. De même, les patients lupiques montrent une diminution de pDC circulantes et l'accumulation des pDC activées, produisant de l'IFN dans les tissus affectés, comme la peau [Farkas, 2001]. Les pDC activées via leur TLR deviennent résistantes aux glucocorticoïdes, ce qui pourrait expliquer l'efficacité limitée des agonistes des TLR dans le lupus [Lepelletier, 2010] [Guiducci, 2010]. Par ailleurs, chez les patients atteints de dermatite atopique, le nombre de pDC cutanées est fortement diminué. Certains travaux ont montré que chez ces patients les pDC expriment fortement le récepteur de forte affinité pour les IgE, et que son activation par l'immunoglobuline inhibe la production d'IFN de type I, et favorise l'apoptose de ces cellules [Novak, 2004]. La muqueuse nasale et l'épithélium bronchique de sujets asthmatiques allergiques contiennent un nombre accru de DC à l'état basal par rapport aux sujets non allergiques et ce nombre est encore augmenté après exposition à l'allergène [Moller, 1996] [Jahnsen, 2001] [Holmberg, 1995]. Alors qu'aucune accumulation de pDC n'est observée au sein des bronches, des DC $CD1a^+$ $HLA\text{-}DR^+$ s'accumulent dans la lamina propria au cours de la rhinite allergique [Jahnsen, 2000] [Reider, 2002], et des DC myéloïdes sont recrutées depuis le sang périphérique [Upham, 2002]. Parallèlement aux pDC, il semble que les mDC

puissent également induire une tolérance vis-à-vis des allergènes en fonction de leur phénotype. Les pDC ne représentent en effet qu'une très faible proportion des cellules dendritiques tissulaires au regard du réseau très dense de mDC. Par ailleurs, les mDC prélèvent continuellement les allergènes exposés aux épithélia, et elles présentent ces allergènes aux lymphocytes dans les ganglions, il est surprenant qu'une partie seulement de la population développe des réponses contre ces antigènes non infectieux. Il semble donc qu'en situation normale, les mDC permettent la mise en place d'une tolérance. Expérimentalement, l'exposition intranasale de souris à des protéines n'induit pas de réaction inflammatoire [Ostroukhova, 2004]. En revanche, la sensibilisation préalable des animaux à cette protéine, par voie systémique avec un adjuvant, provoque une réaction inflammatoire Th2 au niveau du tractus respiratoire après challenge allergénique. Les données expérimentales démontrent qu'il existe deux mécanismes différents à l'origine de la tolérance antigénique, avec un rôle central des cellules dendritiques. La stimulation des lymphocytes T naïfs par une DC faiblement mature peut entraîner un défaut d'activation lymphocytaire conduisant à un état anergique [Sporri, 2005]. Dans certaines conditions de stimulation, en particulier en produisant certaines cytokines immunorégulatrices comme l'IL10 ou le TGF-β, ou encore par le biais de ligands type ICOSL, les mDC peuvent également générer un type des lymphocytes T régulateurs [Akbari, 2001] [Ostroukhova, 2004]. Ces cellules permettent l'établissement d'une tolérance spécifique à l'allergène, transmissible par ailleurs à d'autres animaux par transfert lymphocytaire.

Du fait du faible nombre de DC résidentes et circulantes, l'étude de ces cellules a longtemps été limitée. Les différentes populations de DC sont présentes dans le sang périphérique : précurseurs, DC immatures et matures, myéloïdes et plasmacytoïdes [MacDonald, 2002] Les DC présentes dans le sang (Lin^- CMH II^+) ne représentent que 1% des PBMC chez l'Homme. De plus, des PBMC mises en culture avec du GM-CSF génèrent une population de cellules ressemblant aux DC, ce qui suggère la présence dans le sang de précurseurs des DC. Les précurseurs $CD34^+$ circulants et les monocytes pourraient être ces précurseurs. L'établissement de différents protocoles de génération de DC *in vitro* à partir de ces précurseurs a permis de grandes avancées dans la compréhension de leurs fonctionnalités et également l'exploitation de ces cellules comme outil thérapeutique dans différentes affections inflammatoires chroniques, des maladies auto-immunes au rejet d'allogreffe grace a leur manipulation avec des agents biologiques ou parmaceutiques (corticostéroïdes, IL-10,

vitamine D3, TGF-ß, IL-6, inhibiteurs de Calcineurine, rapamycine…) [Woltman, 2003] [Adorini, 2004].

Les cellules $CD34^+$ de moelle osseuse représentent les précurseurs les plus primitifs des DC. Chez l'Homme, ces cellules sont isolées à partir du sang périphérique ou du sang de cordon ombilical. Chez la souris, ces précurseurs sont récupérés directement dans la moelle osseuse (fémurs), pour générer des BMDC (Bone-Marrow derived DC). L'utilisation de différents facteurs de croissance ou de cytokines permet de contrôler la différentiation de ces précurseurs en DC myéloïdes ou plasmacytoïdes. Le Flt-3L, ajouté en début de culture, permet l'expansion des cellules $CD34^+$ *in vitro* et *in vivo* [Maraskovsky, 1996] [Banchereau, 2000] [Brasel, 2000] [Brawand, 2002]. Le GM-CSF permet également leur prolifération, et dirige leur différenciation vers la lignée myéloïde. En présence de GM-CSF et de TNF-α, les précurseurs se différencient simultanément en cellules de Langerhans (LC) et en DC interstitielles [Banchereau, 2000]. En effet, au 6ème jour de culture, deux sous-populations sont mises en évidence : des précurseurs de LC ($CD1a^+$ $CD14^-$) et des précurseurs de DC interstitielles ($CD1a^-$ $CD14^+$), qui deviendront matures à J14. Le rendement est très bon, puisque 2.10^6 précurseurs peuvent aboutir à 50.10^6 DC (> 90% CMH II^+ $CD11c^+$) à J14. Différents protocoles ont été mis au point, avec utilisation de TNF-α pour potentialiser la réponse proliférative due au GM-CSF, ou du TGF-β pour favoriser la génération de DC de type LC [Bartz, 2003]. D'autre part, la génération de pDC murines est obtenue en cultivant des précurseurs $CD34^+$ issus de moelle osseuse avec du Flt-3L seul pendant 10 jours [Brawand, 2002]. Pour obtenir des pDC humaines, les précurseurs $CD34^+$ issus du sang périphérique sont cultivés en présence de Flt-3L et de thrombopoïétine [Tan, 2000] [Blom, 2000]. Cependant, le rendement est faible (10 à 20% de pDC). L'utilisation de SCF et d'IL3 permet d'obtenir de meilleurs rendements.

Le modèle le plus utilisé pour générer des DC à partir de monocytes est l'association GM-CSF et d'IL-4 pendant 6 jours, les monocytes se différencient en DC myéloïdes immatures [Sallusto,1994]. Les MDDC immatures ont un phénotype $CD11c^+$ $CD4^+$ HLA-DR^{low} $CD14^-$ et présentent une grande capacité de capture de l'antigène grâce à un large panel de PRR. La stimulation des MDDC par des antigènes bactériens, ou des cytokines (TNF-α, IL-1β), entraîne une maturation irréversible de la DC. Différents modèles de différenciation ont été mis au point, à partir du GM-CSF. En présence de GM-CSF et de TNF-α, les monocytes se différencient en LC [Banchereau, 2000]. La présence de GM-CSF et d'IL-15 dans le milieu de culture de monocytes permet leur différenciation en une population de DC exprimant l'E-

cadhérine, la Langérine et CCR6, mais ne présentant pas de granules de Birbeck comme les LC [Mohamadzadeh, 2001]. Il est à noter que les kératinocytes formant l'épiderme produisent du GM-CSF et de l'IL-15, qui pourraient permettre la génération de LC *in vivo*. D'autres modèles associent le GM-CSF avec l'IL-3 ou l'IFN-α, caractérisés comme étant proche des DC plasmacytoïde à cause de leur expression de TLR (TLR7 et 3) et la sécrétion d'IFN-α [Mohty, 2003] [Mazouz, 2005]. D'autre part, les macrophages générés en cultivant des monocytes en présence de M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) peuvent être déviés en DC en présence de GM-CSF et d'IL-4 [Banchereau, 2000] ou de TNF [Chomarat, 2003]. Enfin, l'IL-10 et l'IL-6 limitent la différenciation des monocytes en DC, mais favorisent la génération de macrophages [Allavena, 1998] [Chomarat, 2000]. *In vivo*, la sécrétion d'IL-6 par les cellules stromales (fibroblastes) ou de GM-CSF et d'IL-4 par les mastocytes, pourrait contrôler la différenciation des monocytes. Des différences notables sont observées dans la littérature en terme de phénotype et de production cytokinique ainsi que la polarisation immune déclenchée, cela pouvant s'expliquer par les différentes méthodes de maturation utilisées ainsi que les concentrations des cocktails cytokiniques aussi bien lors de la différenciation que la maturation. La différenciation de monocytes en DC a été observée *in vivo*, soit après activation dans les tissus périphériques et migration vers les ganglions [Randolph, 1999], soit lors de la migration transendothéliale de monocytes [Randolph, 1998], ou encore sous l'effet de molécules comme le TNF-α, la PGE_2 ou l'anaphylatoxine C5a [Soruri, 2003]. Les DC obtenues ont des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques communes à celles des DC. Cet outil à permis notamment de caractérisé des dysfonctionnements de DC chez les sujets allergiques. Effectivement, des MDDC issues de sujets allergiques expriment davantage de molécules du CMH de classe II, associées à une plus grande capacité de stimulation des cellules T allogéniques [Deslee, 2002]. De plus, Hammad *et al*. ont mis en évidence que l'exposition de DC issues de sujets allergiques à l'allergène Der p 1 entraîne une libération préférentielle d'IL-10 et une augmentation de la molécule CD86. Cultivées avec des lymphocytes T autologues, ces MDDC induisent une production importante de cytokines Th2, comme l'IL-4, et une forte prolifération des lymphocytes T totaux. A l'opposé, les MDDC issues de sujets sains produisent de l'IL-12 et induisent une différenciation vers un profil Th1. De plus, les MDDC de sujets allergiques aux acariens présentent une plus grande capacité de capture de Der p 1 en raison de l'expression plus importante du récepteur au mannose [Deslee, 2002].

Après son arrivée dans les organes lymphoïdes secondaires, la DC mature est rapidement entourée de Lc T qui forment des rosettes autour des extensions cytoplasmiques de la DC. La zone de contact étroit établie entre DC et Lc T est appelée synapse immunologique [Friedl, 2005]. Comme décrit précédemment, la formation de cette structure implique la participation des molécules d'adhérence et des constituants du cytosquelette des deux partenaires. D'importants mouvements de molécules de surface regroupées au sein de rafts lipidiques sur les DC et les Lc T qui vont faciliter et surtout stabiliser l'interaction CMH/peptide-TCR [Cochran, 2001]. Le TCR induit un premier signal conduisant à des modifications du cytosquelette et à la redistribution des autres TCR vers la zone de contact. Ce premier signal induit l'expression et/ou la relocalisation de CD40 ligand, qui par liaison au CD40 à la surface de la DC, va entraîner l'expression des molécules de costimulation de la famille B7, B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) [Caux, 1994]. Ces molécules interagissent avec le CD28 et le CTLA-4 exprimés sur les Lc T.

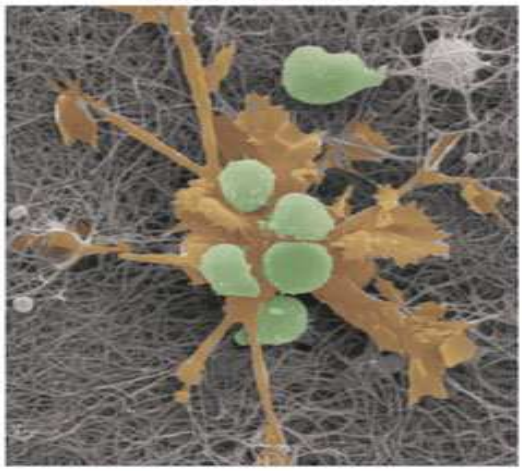


Figure 10: Morphologie de l'interaction entre une DC mature et des Lc T. Image de microscopie électronique à balayage montrant les Lc T en contact avec une DC mature (orange), cocultivés sur un réseau de collagène [Friedl, 2005].

Elles ont d'abord été décrites comme impliquées dans la différenciation Th1 et Th2 par la liaison du CD28 respectivement au CD80 et au CD86 [Kuchroo, 1995]. Il a été suggéré qu'une forte production d'IL-12, l'expression de CD80 et CD70 favorisent la différenciation vers un profil Th1 [Iwamoto, 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, 2006] [Delespesse, 1999]. Hammad *et al.* ont montré que chez les sujets non allergiques le CD80 était associé à une réponse Th1 alors que le CD86 à une réponse Th2 chez les sujets

allergiques [Hammad, 2001]. MacPhee *et al*. ont trouvé des résultats différents en montrant que ces molécules n'étaient pas associées à un profil particulier [MacPhee, 2001]. En effet, différent travaux ont montré que le CD80 et CD86 sont indispensables au développement d'une réponse Th2 *in vitro* [Balbo, 2001] [Broeren, 2000] et *in vivo* [Mark, 2000]. La liaison de ces molécules au CTLA-4 pourrait intervenir dans l'inhibition des Lc T activés [Vasu, 2003], cependant Mukherjee S. *et al*. ont montré que cette liaison joue un rôle activateur du Lc T chez la souris [Mukherjee, 2002]. L'activation des cellules T par les DC chargées en antigène est très rapide *in vivo* 2 jours en moyenne après leur injection [Lambrecht, 2000].

Les DC sont capables d'induire aussi une tolérance ou une anergie. En effet, des études ont montré que l'interaction ICOS/ICOS-ligand joue un rôle important dans la génération de T régulateurs [Witsch, 2002] et dans le développement d'une réponse régulatrice entraînant une réduction de l'hyperréactivité bronchique chez la souris [Akbari, 2002]. Cette molécule a été également associée à un profil Th2, en effet, ICOS peut activer des facteurs de transcription de type Th2 [Simpson, 2010]. Un autre mécanisme de tolérance a été récemment décrit, il s'agit des DC productrices d'une enzyme, l'IDO (Indoleamine-2,3-dioxygenase), impliquée dans le catabolisme du tryptophane, un acide aminé essentiel. Ce catabolisme génère des processus de régulation de la réponse immune, avec un effet sur les Lc T décrit par Lee *et al*. en 2002, la dégradation du tryptophane induit l'arrêt du cycle cellulaire et mène vers l'apoptose des cellules T (figure 10). Par ailleurs, les métabolites générés par le catabolisme du tryptophane ont une activité pro-apoptotique *in vitro*. La DC productrice d'IDO agit également sur les DC IDO^- *in vivo* et supprime leur capacité de présentation antigénique. Certains auteurs, dont Fallarino en 2003, ont démontré *in vivo* que des T reg induient par une voie dépendante du CTLA4 des DC qui expriment l'IDO. Dans un modèle souris d'asthme expérimental, l'IDO inhibe les paramètres de l'inflammation allergique, et ce via le TLR9 [Hayashi, 2004]. Cette enzyme est surexprimée dans la dermatite atopique, sous l'influence de l'IFN-γ [Ito, 2004].

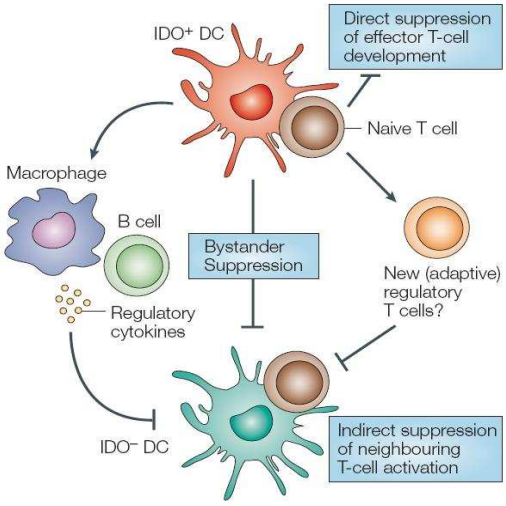


Figure 10 : Mécanismes de suppression immune médiées par l'IDO. Les DC productrices d'IDO peuvent supprimer directement la fonction des cellules T effectrices, et trasnformer les DC environnantes en induisant l'expression de l'enzyme. Par ailleurs, il a été suggéré que les DC IDO$^+$ puissent induire la production de cytokines immunosuppressive par les macrophages et les lymphocytes B [Mellor, 2004].

La balance Th1/Th2

Les DC pulmonaires sont directement la cause de la sensibilisation aux allergènes inhalés. L'administration intra-trachéale de DC myéloïdes chargées avec de l'ovalbumine (OVA) à des souris naïves induit une sensibilisation, conduit à une vigoureuse réponse Th2 et à une inflammation pulmonaire lors d'une réexposition à l'allergène [Lambrecht, 2000] [Sung, 2001]. Ces DC chargées à l'OVA sont également capables d'induire un phénotype asthmatique complet lorsqu'elles sont injectées en intra-trachéale à des souris préalablement sensibilisées et cela en absence de réexposition à l'antigène et peuvent également exacerber les symptômes allergiques chez des souris déjà sensibilisées [Hammad, 2002]. Des expériences de déplétion ont mis en évidence le rôle essentiel des DC dans le processus allergique. Ainsi, une déplétion systémique des DC myéloïdes pendant la phase de réexposition à l'allergène abroge tous les signes caractéristiques de l'asthme et ceci s'accompagne d'une diminution des cytokines Th2 effectrices [Lambrecht, 1998], même quand le processus inflammatoire est engagé. Une déplétion sélective cette fois des DC pulmonaires CD11c$^+$ élimine l'inflammation pulmonaire et diminue la génération de cellules Th2 effectrices [Lambrecht, 2005]. Les DC pulmonaires de souris exposées à l'OVA présentent un phénotype mature indiquant que les interactions

avec les cellules T pourraient avoir lieu au sein des voies respiratoires. Il a été observé que les DC pulmonaires forment des clusters avec des cellules T activées dans la muqueuse pulmonaire conduisant à l'activation des DC [Huh, 2003]. De plus, une sous-population à durée de vie longue a été mise en évidence dans les poumons de souris présentant une inflammation pulmonaire et cette population possède une capacité de présentation d'antigène aux cellules Th2 [Julia, 2002]. Les DC pulmonaires produisent des chimiokines qui attirent sélectivement des lymphocytes Th2 $CCR4^+$ dans les poumons, il semble vraisemblable que les DC puissent interagir localement avc ces cellules [Lambrecht, 2005]. Cependant la muqueuse pulmonaire n'est pas le seul site d'interaction entre DC et cellules T. L'exposition à un allergène accroît la migration des DC pulmonaires vers les ganglions médiastinaux drainants. L'ensemble de ces résultats a été confirmé sur des cellules humaines dans un modèle de souris SCID (severe combined immunodeficient) "humanisée". Ainsi, les MDDC de patients allergiques stimulées par l'allergène Der p 1 et injectées dans la trachée de souris SCID, migrent préférentiellement vers les ganglions médiastinaux pour y induire une réponse de type Th2, accompagnée d'une réponse IgE et du développement d'une réponse inflammatoire pulmonaire [Hammad, 2002]. Une fois la polarisation de la réponse T induite au niveau ganglionnaire, il est probable que les cellules dendritiques remigrent vers le site d'exposition antigénique pour permettre de restimuler et d'entretenir l'activité des lymphocytes Th2 et la pérennisation de l'inflammation. Il a en effet été démontré dans un modèle d'asthme murin qu'après sensibilisation à un allergène, les DC matures stimulent les lymphocytes T au niveau des poumons [van Rijt, 2005], ce qui démontre l'importance d'une restimulation locale dans l'établissement d'une réponse inflammatoire forte. L'induction d'une réponse lymphocytaire de type Th2 est au centre du développement des réactions d'hypersensibilité allergique. Ces lymphocytes permettent la production des IgE spécifiques, médiant la réaction d'hypersensibilité immédiate. D'autre par, ils génèrent au niveau du tissus cible les infiltrats inflammatoires polymorphes caractérisant la réaction retardée. *In vitro*, la stimulation de cellules mononucléées isolées à partir du sang de donneurs allergiques provoque la production massive de cytokines de type Th2 : les interleukines -3 -4 -5 -9 et -13. La synthèse de ces cytokines est inhibée par les cytokines de type Th1 : l'IFN-γ et l'IL12 et vice-versa, les voies Th1 et Th2 étant antagonistes, elles s'inhibent réciproquement d'où le terme balance Th1/Th2. Les cytokines Th2 ont plus au moins des rôles spécifiques.

L'IL-4 est impliqué dans la polarisation de la réponse humorale. Il permet avec l'IL-13 l'activation de la commutation de classe, et stimule donc la synthèse des IgG1 et IgE, alors

qu'il inhibe la synthèse des IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgM. Cette interleukine permet d'augmenter l'expression du CMH de classe II par les Lc B, ce qui favorise la présentation antigénique en présence de faibles doses antigéniques. L'IL4 agit également comme un signal activateur proinflammatoire sur les granulocytes, et active par exemple les mastocytes cutanés, favorisant leur sécrétion d'IL5 [Babina, 2004]. Certains travaux suggèrent enfin que l'IL4 ait une action profibrotique, car elle active la production de collagène sur des fibroblastes hépatiques [Aoudjehane, 2008] et dans certaines formes de fibroses pulmonaires [Wallace, 1999]. Le récepteur de l'IL4 active par phosphorylation les protéines adaptatrices Stat6 [Andrews, 2002], ce qui induit l'expression du facteur de transcription Gata3 au sein des Lc T. Ce facteur a en rôle essentiel dans la polarisation des T $CD4^+$ vers un profil Th2 en contrôlant les gènes de certaines cytokines [Nawijn, 2001]. Chez l'homme Gata3 permet ainsi de réprimer la transcription du gène de l'IFN-γ, alors qu'il active au contraire celui de l'IL-4 [Kaminuma, 2004]. L'expression de Gata3 n'est toutefois pas limitée aux T $CD4^+$, on le retrouve également dans les cellules NKT [Kim, 2006], les NK [Vosshenrich, 2006] et certains épithélia [Kouros-Mehr, 2006]. Enfin, on oppose à la voie Stats6/Gata3 l'activation par l'IL-12 de la voie Stat4, qui induit la production du facteur de transcription Tbet et permet une polarisation Th1. Cette voie de différentiation Th1 est à de nombreux niveaux antagoniste de la voie Th2. Ainsi, Gata3 va par exemple réprimer la production de Stat4, et Tbet inhibe la liaison de Gata3 au niveau des promoteurs de ses gènes cibles [Hwang, 2005]. 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 prédisposent aux allergies (individus atopiques).

L'IL-3 est un facteur de croissance impliqué dans développement de nombreux précurseurs hématopoïétiques. Toutefois, il provoque spécifiquement la prolifération des mastocytes et favorise leur synthèse d'histamine. L'IL-13, mis à part son rôle dans la commutation de classe des immunoglobulines, agit sur les macrophages tissulaires en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires du type IL-12, IL-8 et IL-6, mais inhibe également l'IL-10. L'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, 2005].

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, et il favorise chez la souris la prolifération des lymphocytes B pré-activés. Les souris IL-5 KO [Saito, 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 impliqué dans l'accumulation des éosinophiles vers le site inflammatoire après stimulation allergénique [Matsumoto, 2003]. Elle facilite ce recrutement en modulant l'expression de protéines d'adhésion et de récepteurs chimiokiniques à la surface des éosinophiles [Kudlacz, 2002].

L'IL-9 est induite par des pneumallergènes sur les cellules mononuclées [Sun, 2007] et les éosinophiles [Fujisawa, 2008] de patients allergiques, ce qui explique les taux élevés de cette cytokine dans les LBA après challenge allergénique [Erpenbeck, 2003]. Des souris transgéniques surexprimant l'IL-9 développent également une fibrose pulmonaire sous-épithéliale caractéristique du remodelage asthmatique, ce qui abouti à l'altération de leur fonction respiratoire [van den Brule, 2007], et ce indépendamment d'un recrutement éosinophilique. Par ailleurs, l'utilisation de modèles d'asthme expérimental chez la souris montrent que l'IL-9 favorise la prolifération des précurseurs éosinophiliques au niveau de la moelle osseuse, pourtant la neutralisation de cette interleukine à l'aide d'un anticorps n'inhibe pas le développement de l'inflammation éosinophilique [Sitkauskiene, 2005]. Enfin, les souris IL-9 KO présentent un défaut de développement de l'inflammation intestinale dans un modèle de réaction allergique alimentaire [Forbes, 2008], alors que son expression par les entérocytes prédispose a contrario à la sensibilisation allergénique orale, et favorise le recrutement de mastocytes vers les tissus.

Les lymphocytes Th17

Une nouvelle population de Lc T CD4+ a été récemment identifiée. Ces cellules ont été nommées Th-17 à cause de leur profil d'expression cytokinique spécifique. Elles produisent IL-17A et IL-17F mais aussi de IL-22, IL-21 et IL-26 [Wilson, 2007] [Cheung, 2008] [Dong, 2008]. Elles expriment spécifiquement les facteurs de transcriptions RORγt et RORα [Ivanov, 2006] ; Sundrud and Rao, 2008 ; Liu, 2009], et non pas Tbet ou Gata3, ce qui contribue à la justification de la création d'un groupe lymphocytaire indépendant des autres. Chez la souris, La différenciation des Th17 semble induite par apport de TGF-β et d'IL-6

[Ivanov, 2006] par contre l'absence de l'IL-6 bascule les cellules vers une differentiation de cellule T régulatrice exprimant le FoxP3, une balance entre les facteurs de transcriptions ROR/FoxP3 a été alors proposée. Chez l'homme, C'est nettement moins clair, pour Acosta-Rodriguez l'IL-1β et l'IL-6 sont les facteurs nécessaires à une différenciation Th17 [Acosta-Rodriguez, 2007], le TGF-β IL-21 selon Liu [Liu, 2009] et l'IL-23 pour Volpe [Aggarwal, 2003] [Volp, 2008]. Fonctionnellement, la sécrétion d'IL-17 conduit à l'activation de différents types cellulaires, comme l'endothélium vasculaire, l'épithélium bronchique, les kératinocytes ou encore les monocytes, conduisant à la production de cytokines proinflammatoires. Il est toutefois intéressant de noter que de nombreux autres types cellulaires sont producteurs d'IL-17, comme les iNKT [Michel, 2007], une production dépendante d'un environnement inflammatoire [Moreira-Teixeira, 2011]. L'axe IL-17/IL-23 a été initialement décrit comme permettant la mise en place d'une défense antibactérienne et antifongique [Happel, 2005] [Hohl, 2006]. Par ailleurs, certains motifs bactériens semblent favoriser la différenciation Th17 par une activation spécifique des cellules dendritiques [van Beelen, 2007]. Cette interleukine induit l'accumulation des neutrophiles dans les tissus par un mécanisme dépendant des chimiokines CXCL8 ou GRO-α et également le CCL20 [Hirota, 2007].

Le rôle des Th17 dans les pathologies à origine Th2 est toutefois assez complexe. Dans la réaction asthmatique chez l'homme, l'IL-17 semble plutôt proinflammatoire. L'IL-17 est retrouvé dans les expectorations, les lavages broncho-alvéolaires et dans des biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques [Molet, 2001] [Hashimoto, 2005] [Bullens, 2006] [Pene, 2008]. Des taux élevé d'IL-17 sont retrouvés dans des expectorations de patients asthmatiques modérés et sévères comparativement aux asthmatiques intermittents, avec une corrélation avec la présence de neutrophiles et l'IL-5 [Bullens, 2006]. L'IL-17 est retrouvé surexprimé dans plusieurs pathologies cutanées dont l'origine est dépendante d'une inflammation de type Th1 (comme le psoriasis, ou l'hypersensibilité de contact induite par haptènes). Toutefois, dans des pathologies à prédominance Th2 comme la dermatite atopique [Toda, 2003] l'IL-17 est principalement surexprimé dans la phase aigue de type clairement Th2, mais pas dans la phase chronique à phénotype mixte Th1/Th2. Chez la souris, les données expérimentales démontrent un rôle plus complexe des réponses Th17. D'une part, les souris déficientes pour le récepteur à l'IL-17 présentent un défaut de développement de la réaction asthmatique, ce qui corrobore un rôle inducteur des Th17 dans l'asthme. A contrario, la neutralisation de l'IL-17 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, 2006]. Ces données confèrent à l'IL-17 un rôle protecteur lors de l'exposition allergénique, et suggèrent une implication complexe des Th17 dans l'asthme allergique.

Les lymphocytes Th22

Une nouvelle population de Lc T a été décrite encore plus récente que les Th17, 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 [Duhen, 2009] [Trifari, 2009]. Son recepteur 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 [Nograles, 2009].Une production dépendantes des DC de Langerhans et une action sur les cellules épithéliales induisant un remodelage [Eyerich, 2009] [Fujita, 2009]. IL-22 est augmentée dans les sérums et surnageant de CMN de sujets allergiques asthmatiques [Zhao, 2010] [Wong, 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 DC préincubées avec l'IL-22 abolissent cette réponse [Schnyder, 2010].

DC et induction de la tolérance

La tolérance est l'incapacité pour l'hôte de répondre à un antigène spécifique. Elle peut être générée au niveau central et au niveau périphérique. Les mécanismes de la tolérance périphérique incluent la mort des cellules T par apoptose, anergie ou suppression active par des cellules T régulatrice (Treg). La DC joue un rôle important dans la mise en œuvre de la tolérance et le type de mécanisme mis en jeu semble dépendre de son degré de maturation. En effet, si aucune stimulation des DC n'a lieu en périphérie, elles demeurent immatures et résident dans les tissus. Si une présentation d'antigènes, des molécules du soi par exemple, a lieu dans ce contexte, l'absence de costimulation conduit à l'anergie des cellules T [Schwartz, 1989] [Adler, 1998] ou à leur mort par apoptose [Kurts, 1997]. Plusieurs expériences réalisées dans des modèles animaux ont montré que, même en condition non inflammatoire, les DC sont capables de migrer spontanément vers les ganglions drainants et ce processus est facilité

par l'expression du CCR7 [Matsuno, 1996] [Brand, 1999]. Ces DC sont généralement chargées avec des antigènes tissulaires, des matériaux apoptotiques ou des antigènes inhalés ou ingérés inoffensifs [Huang, 2000]. Il existe des différences morphologiques et phénotypiques entre les DC résidant dans les tissus et ces DC qui migrent en condition non inflammatoire. En effet, ces dernières présentent un certain degré de maturation puisqu'elles ont une expression de molécules du CMH II, chargées avec des peptides antigéniques, et des molécules de costimulation accrues en surface [Ruedl, 2000] [Brand, 1999]. En absence de stimuli inflammatoires, ces DC ne produisent pas d'IL-12 ou d'autres cytokines pro-inflammatoires et leur processus de maturation semble arrêté à un stade intermédiaire, d'où le nom de DC "semi-matures" [Turley, 2002]. Dans les ganglions régionaux, des cellules T naïves pourraient rencontrer ces DC, recevoir un signal suboptimal via un processus similaire à celui décrit dans un système allogénique et se différencier en cellules Treg [Jonuleit, 2000]. L'IL-10 est l'un des signaux de maturation qui conduit à la différenciation de DC tolérogéniques possédant un phénotype semi-mature [Steinbrink, 1997]. Ces DC particulières pourraient donc être responsables de l'établissement d'un état de tolérance via l'induction de cellules T à activité régulatrice [Akbari, 2001]. Sakaguchi *et al*. ont mis en évidence l'existence de populations T $CD4^+CD25^+$ suppressives, des Treg dits naturelles, spécialisées dans l'inhibition de réponses inflammatoires contre le non soi. Elles constituent 2 à 5 % des T $CD4^+$ circulants avec une très longue durée de vie. Différents marqueurs ont été proposés pour identifier spécifiquement ces Treg. Parmi ceux-ci, le CD25, le GITR, le CTLA-4, le CD103. Globalement, les mécanismes de suppression de ces populations régulatrices sont plutôt indépendants de la production de cytokine exogène, mais dépendante d'un contact cellulaire. Les Treg naturels semblent par ailleurs capables d'induire *in vitro* des Treg adaptatif à partir de T helper conventionnels [Jonuleit, 2002] [Dieckmann, 2002]. La seconde grande catégorie de Lc Treg est constituée par les Treg dits adaptatifs. Ces cellules se différencient lors de la maturation de T $CD4^+$, dans des conditions particulières. Vraisemblablement, le microenvironnement cytokinique est nécessaire à leur différenciation notamment le TGF-β, mais aussi d'IL-10 par la DC, associés cette fois-ci à une faible stimulation par des molécules CD80-86/CD28. Les Treg naturels peuvent contribuer à cette différenciation par apport d'IL10 exogène. Il a été montré que la génération de ces cellules peut-être induite *in vivo* par administrations régulières de faibles doses [Ostroukhova, 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. Le facteur de transcription Forkhead box3 (FoxP3) semblent associé au Treg. En effet, la mutation du gène FoxP3 en une

protéine non fonctionnelle conduit à des syndromes autoimmuns (souris scurfy, syndrome IPEX-immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked-). Les individus touchés par le syndrome IPEX présentent des taux d'IgE particulièrement élevés et développent la dermatite atopique [Wildin, 2002], d'où l'intérêt des études sur les Treg Foxp3^{+} et les réactions allergiques. Foxp3 confère une fonction régulatrice à des T conventionnels murins lorsque qu'il est introduit par génie moléculaire. Ce facteur de transcription inhibe certains gènes dont l'IL2, un facteur prolifératif. Au niveau d'un promoteur, FoxP3 peux agir comme répresseur ou activateur transcriptionnel. Il a été suggéré que cette protéine puisse se fixer et potentialiser l'initiation transcriptionnelle des gènes du CD25, GITR, CTLA-4, mais qu'il inhibe l'expression du CD127, dont la corrélation négative avec l'expression de FoxP3 a été mise en évidence chez l'homme et la souris [Hartigan-O'Connor, 2007]. L'IL-10 et le TGF-β ont été décrits depuis longtemps comme ayant des propriétés suppressives. La régulation par sécrétion d'IL10 semble un mécanisme commun aux Treg naturels et aux Treg adaptatifs antigène spécifiques (appelés également Tr1). L'IL-10 a d'abord été décrite comme une cytokine spécifiquement Th2 [Fiorentino, 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 a partir des monocytes circulants [Allavena, 1997], elle inhibe la production de cytokines par les mastocytes [Arock, 1996], la survie et la fonction des éosinophiles [Takanaski, 1994]. Chez la souris, elle présente une dualité fonctionnelle car elle bloque d'une part l'inflammation et la production de cytokines Th2, ainsi que l'éosinophilie, mais elle semble également potentialiser l'hyperréactivité bronchique [van Scott, 2000] dans un modèle d'asthme expérimental. Chez l'homme, l'IL10 présente par ailleurs la capacité d'inhiber les réponses de type Th1. Elle bloque en effet la production d'IL-2, 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, 2000], et de diminuer ces signaux de costimulation. Globalement, l'IL-10, même s'il est effectivement produit par des lymphocytes de type Th2, à un rôle inhibiteur pléïotrope, et est impliqué à de nombreux niveau 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, 2005]. Par ailleurs, la suppression spécifique de l'IL-10 chez des souris n'induit pas

de réactions d'autoimmunité type scurfy, mais favorise en revanche le développement de réactions inflammatoires dans l'intestin ou les poumons [Rubtsov, 2008], ce qui confirme le rôle de l'IL-10 dans la suppression des réponses inflammatoires périphériques excessives, dont les réactions d'hypersensibilité. Alors que le TGF-β semble avoir un rôle très important dans l'induction et la différenciation de Lc vers un profil régulateur, son implication dans la suppression spécifique des réponses immunes par les Treg est quant à lui sujet à débat, en fonction des modèles [Piccirillo, 2002]. Toutefois, plusieurs travaux ont évoqué son rôle dans la suppression *in vitro* [Nakamura, 2001] mais également *in vivo* dans un modèle d'asthme [Ostroukhova, 2004]. La spécificité des anticorps utilisés dans ces travaux a fait objet d'une critique. Second mécanisme de suppression, la cytotoxicité médiée par les Treg. Chez l'homme, on sait que les Treg peuvent tuer des cellules adjacentes par expression de granzyme A et de perforine [Grossman, 2004]. Chez la souris, l'expression spécifique de granzyme B par les Treg, ainsi que l'utilisation de Treg isolés à partir de souris déficientes en granzyme B a permis de confirmer le rôle de cette enzyme dans la cytotoxicité induite par les Treg sur les lymphocytes T effecteurs [Gondek, 2005]. 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, 2007], et d'autre part, maintient une anergie et facilite la génération de Treg adaptatifs en favorisant la production de TGF-β [Zarek, 2008] par les cellules cibles. Par ailleurs, certains modèles démontrent la possibilité d'une induction de Treg $FoxP3^{+}IL10^{+}$ par les glucocorticoides [Karagiannidis, 2004].

De nombreuses données suggèrent l'implication des Treg, $CD4^{+}CD25^{+}FoxP3^{+}$ dans la résolution de l'asthme allergique [Leech, 2007] [Carson, 2008], avec rôle apparemment prédominant de l'IL-10 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, 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, 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 secrétant de l'IL-10 en comparaison d'individus non allergiques [Akdis, 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, 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, 2004]. Les cellules T $CD25^+$ issues de sujets allergiques et non allergiques suppriment puissamment la prolifération cellulaire T et la production de cytokines Th2 en réponse à l'allergène en dehors de la saison pollinique. Cependant, lors de la période symptomatique, c'est-à-dire en haute saison pollinique, des cellules T $CD25^+$ issues de donneurs allergiques, mais pas de sujets contrôles, présentent un défaut d'activité inhibitrice [Grindebacke, 2004]. Des souris immunisées avec HKL (Heat-Killed *Listeria monocytogenes*) sont rendues résistantes au développement d'une réponse de type Th2 et d'une HRB, ceci de manière dépendante de DC $CD8\alpha^+$ [Hansen, 2000]. L'immunisation de souris à l'OVA avec l'adjuvant HKL et le transfert adoptif des DC $CD8\alpha^+$ issues de ces souris à d'autres souris sensibilisées à l'OVA permet le développement de Treg. Ces Treg adaptatifs sont particuliers puisqu'ils ont la capacité de sécréter de l'IFN-γ, expriment le T-bet et ont besoin d'IL-12 sécrétée par les DC $CD8\alpha^+$. Ces caractéristiques suggèrent que ces cellules sont dérivées de cellules Th1, d'où leur appellation : cellules T régulatrices Th1-like ; cependant elles se distinguent des Th1 par leur capacité à inhiber une réponse Th2 et une HRB ainsi que par leur expression de FoxP3 [Stock, 2004]. L'implication des Treg dans la résolution de pathologies cutanées comme la dermatite atopique est sujette à controverse. Il semble exister une corrélation entre le développement de la pathologie et un défaut de Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ au niveau du derme [Verhagen, 2006]. Toujours dans la Dermatite atopique, une autre étude a démontré l'augmentation périphérique de cellules $CD25^{hi}FoxP3^+$, exprimant par ailleurs fortement le $CCR4^+$ et CLA^+, impliqués dans l'adressage spécifique cutané des Lc [Reefer, 2008]. Ces observations ont été confirmées par certaines études en immunohistochimie qui confirment l'augmentation de marqueurs de Treg au niveau de biopsies cutanées de patients atteints de dermatite atopique comparativement à des patients sains [Caproni, 2007]. Les Treg sont également impliqués dans l'inhibition des allergies alimentaires. L'exposition quotidienne de la muqueuse intestinale à de nombreux

allergènes alimentaires, ainsi que la présence d'une flore commensale très développée justifient en effet la nécessité d'une répression immune très forte au niveau de cette muqueuse. Concernant, par exemple, l'allergie au lait de vache, des enfants qui ont perdu leur sensibilité au lait ont une fréquence plus importante de cellules $CD4^{+}CD25^{+}$ et une diminution de la réponse proliférative de leurs cellules mononucléées du sang périphérique envers la β-lactoglobuline *in vitro* en comparaison d'enfants qui présentent une allergie active [Karlsson, 2004]. Certaines études démontrent que les Treg inhibent les allergies aux arachides [van Wijk, 2007]. Par ailleurs, un défaut d'expression de TGF-β1 au niveau de l'intestin d'enfants présentant des allergies alimentaires à été mise en évidence [Perez-Machado, 2003].

Les chimiokines

Généralités

Les chimiokines sont des cytokines de faible poids moléculaire (entre 8 et 14 kDa). Elles sont impliquées dans le trafic, d'où leur nom (CHEMOtactic cytoKINES), et l'activation cellulaire, aussi bien en condition physiologique que pathologique (inflammation, organogenèse, angiogenèse, diffusion métastasique, polarisation de la réponse immune…). Les chimiokines agissent via leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à la protéine G (GPCR) [Wilbanks A, J Immunol, 2001]. Elles sont produites et majoritairement secrétées (excepté CX3CL1 et CXCL16), sous forme de pro-peptides, de façon constitutive, mais aussi par diverses voies d'induction, ainsi ces molécules prennent part aux mécanismes homéostatiques et également en réponse à une inflammation. Actuellement, les chimiokines comportent près de 50 membres chez les mammifères. Elles sont contrôlées par de subtils systèmes de régulation malgré la complexité due à la pléiotropie et la redondance généralement circonscrite à la même famille, puisque une chimiokine peut activer plusieurs récepteurs différents et un récepteur peut lier différentes chimiokines et pour en ajouter à cette complexité un type cellulaire peut exprimer plusieurs récepteurs à la fois (figure 11).

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 cystéine localisés dans la région N-terminal. Sur cette base la nouvelle classification des chimiokines est née en l'an 2000 [Zlotnik, 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 12).

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 définitoire. La majorité des gènes CXCL se retrouve dans un cluster sur le chromosome 4, à l'exception de CXCL12, CXCL14 et CXCL16 codés par le chromosome 10.

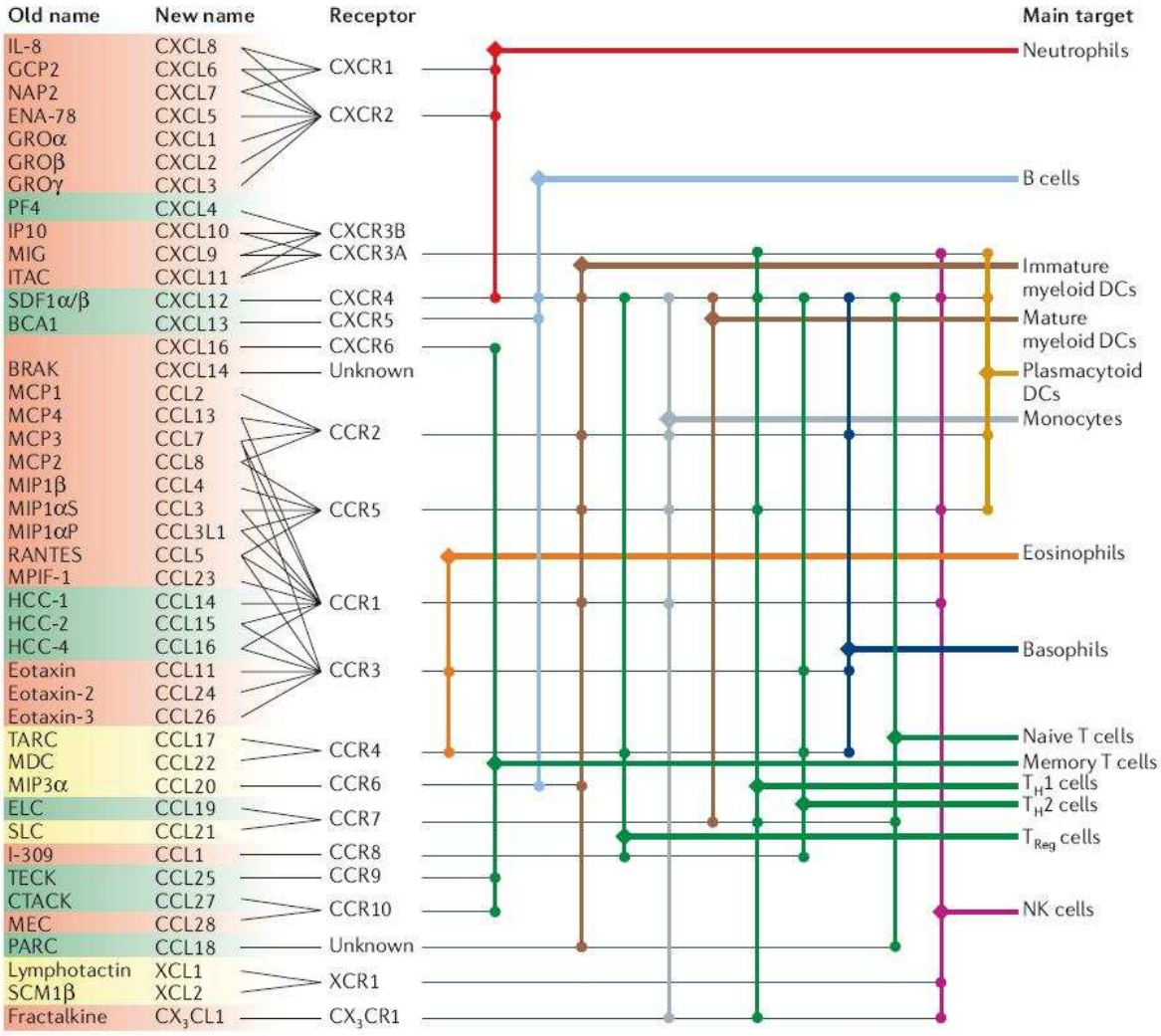


Figure 11 : Chimiokines et récepteurs associés. Le diagramme présente la propriété de redondance fonctionnelle de certaines chimiokines, capables d'activer plusieurs récepteurs. Par ailleurs, l'expression de ces récepteurs à la surface de différents types leucocytaires est précisée [Mantovani, 2006].

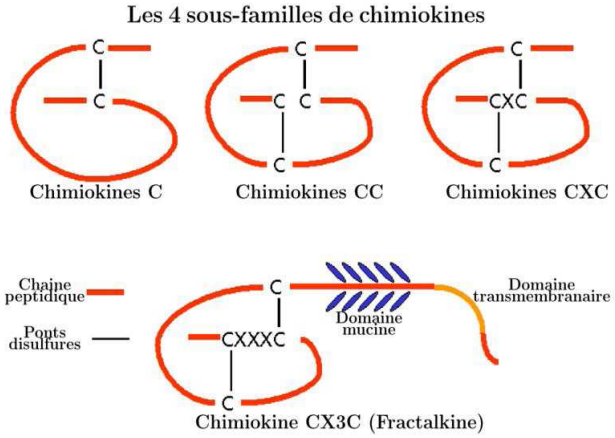


Figure 12 : Les quatre familles de chimiokines classées selon leur structure [Townson, 2003].

• 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, 1995]

• Les CXC chimiokines ELR-

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

Les CC chimiokines ou CC

Ce groupe comporte 28 membres. Le locus de la plupart de ces CC-chimiokines se situe sur le chromosome 17, à l'exception de CCL19 qui se trouve sur le chromosome 9, ainsi que CCL24 et CCL26 sur le chromosome 7. Les premières cibles de ces chimiokines sont les cellules mononucléées. Ces chimiokines sont impliquées à la fois dans les processus d'homéostasie et d'inflammation. Les CC-chimiokines pro-inflammatoires, impliquées dans l'allergie, sont généralement inductibles, et celles engagées dans l'homéostasie sont exprimées constitutivement. Les CC chimiokines impliquées dans l'allergie comptent le CCL1, CCL2, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, le CCL17, le CCL22, le CCL24 et CCL26. CCL2, CCL7, CCL8 et CCL13 attirent les mastocytes et les basophiles, et sont capable d'induire une libération rapide d'histamine [Luster, 1997]. Elles attirent également les Lc T et les monocytes, et participent à la réaction inflammatoire chronique. CCL17 et CCL22 quant à elles attirent les macrophages, les cellules Natural Killer (NK) et les Lc Th2, via le CCR4 [Inngjerdingen, 2000]. Elles induisent également l'activation des plaquettes [Abi-Younes, 2001]. CCL11

et CCL24 sont chimiotactique vis-à-vis des éosinophiles et les basophiles, via le CCR3 [Forssmann, 1997]. Les CC chimiokines impliquées dans l'homéostasie sont le CCL19, CCL20 et CCL21. CCL19 et CCL21 utilisent le CCR7 pour attirer les Lc T naïfs et certains T mémoires ainsi que les cellules dendritiques matures à travers les veinules endothéliales vers les ganglions [Saeki, 1999] [von Andrian, 2003]. CCL20 permet l'adressage des Lc T et des DC immatures au niveau des muqueuses intestinales [zadpanah, 2001]. Les CC chimiokines impliquées dans le développement sont CCL17 et CCL25. Bien que CCL17 joue un rôle dans l'allergie, elle est exprimée de façon constitutive dans le thymus et donc joue un rôle dans son développement [Imai, 1996]. CCL25 est chimiotactique pour les monocytes, les cellules dendritiques spléniques et thymiques et pourrait donc jouer un rôle dans le développement des Lc T [Vicari, 1997]

Les C chimiokines ou CL

Cette famille comprend 2 membres, XCL1 et XCL2. XCL1 est capable d'induire la chimiotaxie de Lc $CD4^+$ et $CD8^+$, ainsi que des cellules NK [Zavala-Flores, 2009]. Elle ne présente pas de propriétés chimiotactique vis-à-vis des monocytes ou des neutrophiles [Kelner, 1994]. En plus de sa fonction chimiotactique sur ces populations, XCL1 peut induire un effet suppressif et cytotoxique contre des tumeurs ou des cellules T effectrices [Huang, 2004]. XCL1 et son récepteur XCR1 sont faiblement exprimés dans les Lc Treg de patients asthmatiques allergiques, et cette sous expression est corrélée à une diminution de leur fonction régulatrice, qui peut être rétablie par administration de XCL1 [Nguyen, 2008].

Les CX3C chimiokines ou CX3CL

Le seul membre de cette famille est CX3CL1. Elle possède un domaine transmembranaire et existe sous forme liée à la membrane mais aussi sous 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, 1997]. Chez les patients allergiques, de fortes concentrations de CX3CL1 circulante sont observées et son récepteur est surexprimé sur les Lc T $CD4^+$. De plus, après un challenge allergénique, les niveaux de sécrétion augmentent dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA) et sont corrélés à la quantité totale de cellules dans ce lavage. Enfin, une forte

expression de CX3CL1 membranaire est observée au niveau des cellules endothéliales et épithéliales bronchiques [Rimaniol, 2003]. Des souris déficiantes en CX3CR1 et des souris de type sauvage traitées avec un anti-CX3CR1 bloquant montrent une réduction des paramètres de la réaction allergique pulmonaire (Baisse de l'hyperréactivité bronchique, éosinophilie, sécrétion de mucus et cytokines Th2) après sensibilisation et challenge allergénique. Le transfert de cellule CD4 de souris sauvages dans les souris déficientes CX3CR1 restaure les paramètres de l'asthme, et l'administration d'un anti-CX3CR1-bloquant empêche l'inflammation chez les CX3CR1 déficientes reconstituées avec des cellules Th2 de souris sauvages [Mionnet, 2011].

La séquence consensus BBXB

Les chimiokines possèdent une séquence particulière avec un enchainement de résidus à caractère basique, de type XBBXBX, ou encore XBBBXXBX ou B est un acide aminé basique (l'arginine, l'histidine ou la lysine). Cette particularité structurelle revêt une grande importance dans les fonctions biologiques de ces protéines. Ce cluster est notamment impliqué dans la liaison aux glycosaminoglycanes (GAG). Plusieurs paramètres primordiaux définissent la capacité de ces séquences à fixer les GAG, notamment le nombre de séquences BBXB, leur position dans la structure tertiaire de la chimiokine, la topographie des acides aminés basiques, qui peuvent notamment jouer sur la spécificité de liaison à certains GAG [Hileman, 1998]. Ainsi, la mutation en alanine des résidus basiques de la séquence BBXB (44RKNR47) dans CCL5 entraine une réduction de sa capacité à fixer l'héparine, et modifie sa sélectivité vis-à-vis de différents GAG [Proudfoot, 2001]. En outre, cette séquence est impliquée dans la fixation de CCL5 à l'un de ses récepteurs, le CCR1, mais ne semble pas impliqué dans celle au CCR5.

Régulation des chimiokines

Le clivage des chimiokines peut augmenter ou baisser leur activité, par exemple la Cathepsine G augmente l'activité de CXCL5, la cathepsine D et B agissent positivement et négativement sur de nombreuses CXC et CC chimiokines [Hasan, 2006]. Le clivage du CCR5 par le CD26 (DiPeptidylPeptidase IV) le rend inactif sur CCR1 et CCR3, mais son activité est augmentée sur le CCR5, quant à l'ADAM10 elle libère le CX3CL1 et CXCL16 transmembranaire. Les effets du clivage de certaines chimokines par les Matrix Metalloproteinases (MMP) sont énumérés dans le tableau 2 [Allen, 2007]. Les glycosaminoglycanes (GAG) participent à la régulation des chimiokines en les protégeant

de la dégradation et en augmentant le gradient le local, les GAG peuvent même changer la conformation des chimiokines et ainsi modifier leur activité *in vitro* [Proudfoot, 2003]. Il existe de nombreux stimuli capables de moduler la production de chimiokines. En effet, en tant que médiateurs de l'immunité innée et acquise, les chimiokines sont produites en réponse à l'intrusion de pathogènes. Ainsi, des cellules mononucléées du sang périphérique stimulées par du LPS ou par la concanavaline A (lectine extraite de *Canavalia ensiformis*) accroissent leur sécrétion de CXCL8. De même, la production de CCL18 est fortement induite chez les PBMC par l'exposition aux enterotoxines staphylococcales A et B [Schutyser, 2001].

Chemokine	Active MMPs	Truncation product(s)	Properties of truncation product(s)
CCL7/MCP-3	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-13 MMP-14	5–76	• Wild-type-like binding of CCR1/2/3 but loss of function • Antagonist with respect to receptor binding and chemotaxis • Attenuates CCL7-mediated inflammation and matrix degradation in rodent models of inflammation
CCL2/MCP-1	MMP-1 MMP-3	5–76	• Partial loss of agonist activity • Anti-inflammatory in rodent models of inflammation
CCL8/MCP-2	MMP-3	5–76	• Wild-type like binding of CCR2 but loss of function • Antagonist with respect to receptor binding and chemotaxis
CCL13/MCP-4	MMP-1 MMP-3	4–75 5–75 8–75*	• Wild-type-like binding of CCR2/3 but loss of function • Antagonist with respect to receptor binding and chemotaxis • Anti-inflammatory in rodent models of inflammation
CXCL8/IL-8	MMP-9	6–77 7–77	• Increased activity, particularly through CXCR1
CXCL12/SDF-1	MMP-1 MMP-2 MMP-3 MMP-9 MMP-13 MMP-14	5–67 (SDF-1α) 5–72 (SDF-1β)	• Loss of binding of CXCL12 to CXCR4 • Loss of inhibition of CXCR4-mediated entry of HIV-1 into $CD4^+$ cells • Neuronal death and inflammation in HIV/AIDS dementia models

Tableau 2 : Clivage de certaines chimiokines par certaines MMP et sa conséquence [Allen, 2007]

Certaines cytokines peuvent moduler la production de chimiokines. Ainsi l'IL-1β et le TNF-α sont des inducteurs de l'expression de nombreuses chimiokines, notamment CCL2, CCL5, CCL11, CCL13, CCL20, et CXCL [Sabatini, 2003]. De plus, l'IFN-γ potentialise fortement la production de CXCL9, CXCL10 et CXCL11 [Sauty, 1999] mais aussi de CCL5 [Wang, 1996] par les cellules épithéliales avec le TNF-α et, à l'inverse, inhibe la production de CXCL8 et CCL22. Les mécanismes moléculaires des effets synergiques entre l'IFN-γ et le TNF-α ne sont pas complètement élucidés. Par ailleurs, les cytokines Th2, comme l'IL-4 et l'IL-13, induisent la production de CXCL8, CCL7, CCL11, CCL13, et CCL20 par les cellules épithéliales bronchiques [Komiya, 2003]

[Reibman, 2003]. L'IL-4 augmente l'expression de CCL11 par les fibroblastes de la muqueuse nasale [Nonaka, 2004], pulmonaires [Teran, 1999] et les cellules épithéliales bronchiques [Yamamoto, 2004]. Ainsi, la production de chimiokines est étroitement régulée au cours de la réaction par les cytokines.

D'autres facteurs importants intervenant dans la régulation des chimiokines sont les glucocorticoïdes (GC). En effet, le traitement des pathologies pulmonaires chroniques par des GC conduit à une forte inhibition de l'infiltrat cellulaire au sein du tissu pulmonaire. Le mécanisme clé de ce mode d'action consiste en la suppression de l'activation de gènes proinflammatoires. De nombreuses chimiokines possèdent des éléments de réponses aux GC (GRE) au niveau de leur promoteur. Ainsi, GC sont capables d'inhiber la production de CCL2, CCL5, CXCL8 [Slavin, 1995] et CCL3 [Berkman, 1995] CCL11, CCL13 [Stellato, 1997]. *In vitro*, le budésonide inhibe la production de CCL11 en accélérant la dégradation des ARNm [Stellato, 1999]. De plus, *in vivo* dans un modèle de souris sensibilisé à l'OVA, le traitement avec la dexaméthasone abolit la production de CCL11 [Eum, 2003]. Cependant, les GC sont capables de potentialiser l'effet d'autres stimuli tel que les cytokines [Kodelja, 1998].

Récepteurs de chimiokines

Comme ne venons de le voir les chimiokines sont pléiotropes, et s'organisent en un réseau redondant de complexes ligands/récepteurs. A l'instar des chimiokines, il existe quatre sous-groupes de récepteurs divisés en CCR, CXCR, XCR et CX3CR par analogie avec leur ligand.

Structure

Les récepteurs chimiokiniques sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ce sont des protéines globulaires composées de 7 segments transmembranaires en hélice α. Ces hélices α sont des dipôles, du fait de l'orientation de liaison hydrogène. Leur surface présente des résidus hydrophobes, induisant une interaction hydrophobe entre les hélices, ce qui rend cet ensemble compact, se disposant en rosette. Ces hélices sont reliées par des boucles, celles extérieures peuvent être glycosylées et contiennent deux résidus cystéine extrêmement conservés qui forme un pont disulfure et stabilise la structure du récepteur. Ces récepteurs sont capables d'être activés par des signaux d'origine exogène, tel que des molécules odorantes/gustative, des phéromones, etc. Ces récepteurs sont capables

également de lier et d'être activés par des peptides, des lipides, des neurotransmetteurs, des hormones, des nucléotides. Cette famille de récepteurs, se divise en 6 classes, selon leur homologie de séquence et leur similarité fonctionnelle, la classe A est celle qui nous intéresse puisque elle renferme les chimiokines. Il s'agit du plus grand groupe de GPCR, il comprend 19 sous familles. Il comprend entre autre les récepteurs aux : Pigments visuels, peptides, chimiokines, nucléotide etc.

Mécanisme d'activation et de transduction du signal

La fixation du ligand induit une modification de la conformation du récepteur, provoquant la rupture de l'interaction ionique forte entre la 3ième et la 6ième hélice [Ballesteros, 2001], amenant ainsi le récepteur dans sa conformation active. Ce changement de conformation se répercute sur les boucles intracellulaires, leur permettant d'interagir avec la protéine G hétérotrimérique associée, et de l'activer. Il existe 2 classes principales de protéines G hétérotrimériques, la première membranaire associée aux GPCR, la seconde cytoplasmique. Ces protéines G hétérotrimériques sont composées de sous unités α, β et γ. Les sous-unités β et γ sont étroitement liées et peuvent être considérées comme une seule unité fonctionnelle. Le complexe hétérotrimérique se présente dans un premier temps sous une forme inactive, lié à la guanosine di-phosphate (GDP). Lorsque le ligand active le récepteur, entrainant un changement conformationnel, ceci induit un relargage rapide de GDP de son site de fixation sur la sous unité α. Cette GDP est immédiatement remplacée par une GTP (guanosine tri-phosphate). Ce qui entraîne une baisse d'affinité de la sous-unité α pour le complexe βγ, qui se dissocie. La voie de signalisation induite par la sous unité α diffère en fonction de la protéine G recrutée, la Gs induit de l'AMPc alors que la Gi l'inhibe. Le complexe βγ active la phospholipase C et favorise un pic de calcium intracellulaire et l'activation des protéines Rac et Rho-A, impliquées dans la mobilisation du cytosquelette via la polymérisation de l'actine et la réorganisation des microtubules [Woo, 2002] [Adachi, 2001]. Les kinases mise en jeux déterminent le panel de fonctions cellulaires qui vont en résulter. La GTP du complexe sous-unité α-GTP subit une hydrolyse, du fait de l'activité GTPasique de la sous-unité α, pour redonner une GDP. Le complexe α-GDP se réassocie alors avec le complexe βγ, et redevient inactif (figure 13). Les récepteurs aux chimiokines sont des GPCR de classe A. Des études *in vitro* ont montrées que l'administration de toxine pertussique inhibe le recrutement de leucocytes par les chimiokines. Or cette toxine empêche le relargage de GDP de la sous-unité α de type Gi, et bloque ainsi la protéine

dans son état inactif, les Gi sont impliquées dans la transduction du signal en activant les kinases de type phosphoinositide-3 (PI3K), ce qui entraine la formation du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), impliqué dans la migration cellulaire, toutefois la migration de certains types cellulaires, notamment les Lc, n'est pas tout à fait altéré dans des souris PI3PK KO [Hirsch, 2000], ce qui implique d'autres voies alternatives. De plus, des animaux KO pour la kinase janus 3, de la voie STAT, démontrent l'implication de cette voie de signalisation résultante d'une activation du CCR9, CXCR4 [Soldevila, 2004] et CCR1, CCR2, CCR5 [Shahrara, 2003]. La voie STAT est la voie d'activation par les interleukines qui induit la transcription de gènes de réponse cellulaire prolongée, le fait est qu'elle soit récemment décrite aussi pour les chimiokines les impliquent de plus en plus dans des fonctions cellulaires plus complexes et prolongées de la réponse immune qu'une simple diapédèse.

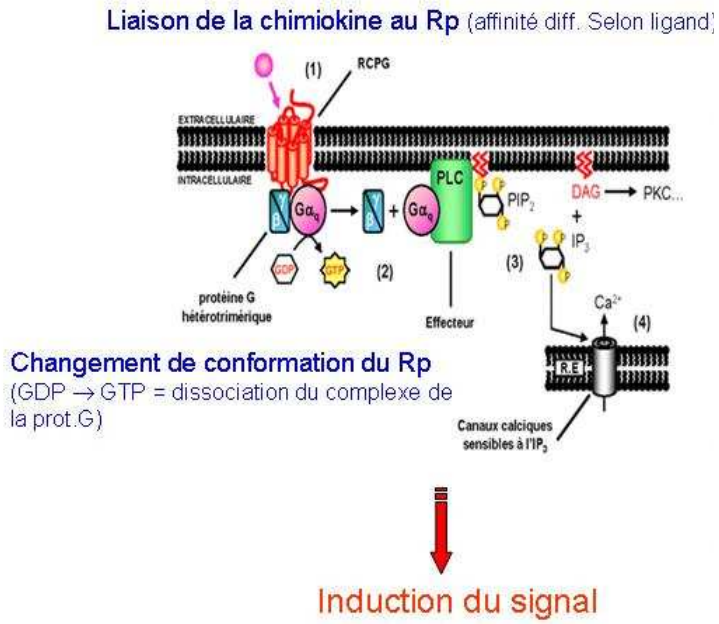


Figure 13 : Activation d'un GPCR et l'induction du relargage de calcium.

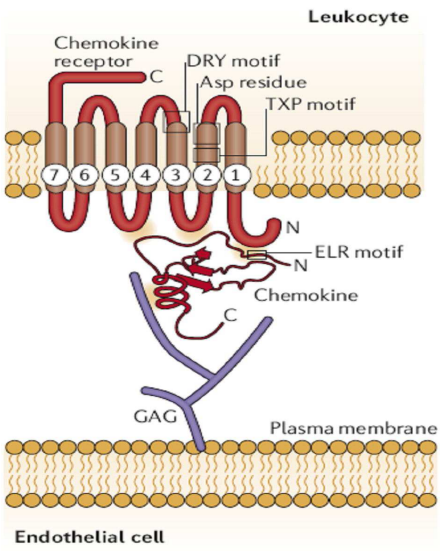
Régulation des interactions chimiokine – récepteur

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

l'interaction entre la chimiokine et son récepteur. Il peut s'agir de facteurs environnementaux ou encore de propriétés inhérentes à la chimiokine.

Régulation par la présentation des chimiokines à leurs récepteurs

La biodisponibilité des chimiokines est régulée par les GAG qui tapissent la surface des cellules endothéliales et des cellules épithéliales. En effet, les chimiokines sont capables de se lier aux GAG linéaires sulfatés tel que l'héparine ou héparane sulfate. Dès lors, les GAG sont capables d'immobiliser les chimiokines à la surface cellulaire aussi bien *in vitro* [Hoogewerf, 1997] qu'*in vivo* [Middleton, 1997]. Cette interaction est connue pour faciliter la rétention des chimiokines à la surface des cellules et de permettre ainsi l'augmenter la concentration locale. Ce comportement modifie la présentation du ligand à son récepteur (figure 14). De plus, les GAG sont capables de favoriser l'oligomérisation des chimiokines [Lau, 2004]. En effet, certaines chimiokines sont capables de s'assembler en dimères ou encore en oligomères. Bien qu'*in vitro* l'oligomérisation ne semble pas être un prérequis à l'activation du récepteur, il a été montré que des mutants monomériques de MCP-1, MIP-1β et RANTES étaient incapables de recruter des leucocytes *in vivo* [Proudfoot, 2003], soulignant de ce fait le caractère essentiel de ce comportement. Il existe également des processus pathogéniques qui impliquent l'interaction entre une chimiokine et une molécule tierce. En effet, le virus de la variole secrète une protéine de 35 kDa, vCCI, qui interagit avec plusieurs chimiokines et les empêche de se lier à leurs récepteurs [Smith, 1997].



6. réponse cellulaire appropriée
5. Transduction du signal
4. Activation du récepteur via la GPCR

3. Interaction chimiokine/récepteur (motifs ELR en N-ter)
2. Interaction GAG/chimiokine (feuillets β en C-term)
1. Expression des GAG au niveau l'endothéliale

Figure 14 : Interaction GAG/chimiokine/GPCR.

Régulation par inhibition compétitive

Afin de réguler la signalisation induite par les chimiokines, il est possible de mobiliser le récepteur avec un ligand d'affinité supérieure à la chimiokine n'induisant pas la signalisation : un antagoniste. Par exemple, les analogues de la substance P (SPA) sont capables d'inhiber *in vivo* la mobilisation de Calcium dépendante de CXCR2, et de bloquer l'angiogénèse induite spécifiquement par le CXCL8 [Guha, 2005]. Plusieurs autres molécules ont été développées dans un but thérapeutique, et permettent d'éteindre le signal de récepteurs spécifiques. Ainsi, quelques 4-hydroxypiperidines ont montré leur capacité à réguler l'activité de CCL3 et CCL5 via le blocage de CCR1 *in vitro*. En effet, l'administration de ces composés inhibe l'acidification extracellulaire et la mobilisation de calcium et d'inhiber la migration de PBMC induite par CCL3et CCL5 [Hesselgesser, 1998]. Il existe également des organismes pathogènes capables de synthétiser des antagonistes des chimiokines. Par exemple, le virus de l'herpes-8 associé au sarcome de Kaposi encode 3 molécules de structure proche des chimiokines humaines. Ces trois chimiokines (viral macrophage inflammatory protein-I vMip-I, -II vMip-II, et III vMip-III) ont une action antagoniste sur plusieurs récepteurs alors qu'elles en activent d'autres [Boshoff, 1997] [Stine, 2000]. Les chimiokines peuvent fixer plusieurs récepteurs, et inversement ce qui complique la régulation. Ce réseau se sophistique encore avec les jeux agoniste/antagoniste. En effet, en plus de leur capacité à activer divers récepteurs, certaines chimiokines ont des propriétés antagonistes pour leurs homologues [Loetscher, 2001]. Ainsi, des ligands du CXCR3, tels que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, préférentiellement exprimés par les cellules Th1 se sont avérés être des antagonistes du CCR3 [Loetscher, 2001], caractéristique des cellules Th2. En même temps, le CCL11, agoniste du CCR3, est un antagoniste du CCR2 [Ogilvie, 2001]. Ces différents croisements agonistes/antagonistes, permettraient une régulation subtile et extrêmement sensible des mécanismes mis en place lors de l'intervention des cellules immunitaire.

Régulation par modification post-traductionnelle

Les chimiokines subissent une série de modifications post-traductionnelles qui ont de nombreux effets sur le comportement futur de ces protéines. Elles peuvent être activatrices, inhibitrices ou encore potentialiser l'effet des chimiokines. Ainsi, CCL5 devient mature après un clivage de la méthionine en N-terminal. En effet, le CCL5 produit par *E.Coli*, qui est complètement replié mais qui conserve son résidu N-terminal,

perd son activité chimiotactique et de mobilisation du calcium sur les cellules THP-1 [Proudfoot, 1996]. Plus encore, ce CCL5 est un antagoniste du CCL5 mature et de CCL3 [Struyf, 1998]. Cependant, CCL5 clivé garde sa capacité à lier et activer le CCR5, et même avec une affinité plus forte que son homologue intact. La conversion de l'acide glutamique N-terminal en glutamine altère les propriétés inflammatoires de CCL8 [Van Coillie, 1998]. En revanche, XCL1 recombinant produit par *E.Coli* (non glycosylé) est moins actif que son correspondant produit par des cellules d'insecte S2 (O-glycosylé) au regard de tests de mobilisation de calcium, de chimiotaxie et de prolifération de cellules T [Dong, 2005]. L'une des modifications la plus commune est la formation de ponts disulfures entre deux cystéines. La création spécifique de ces ponts permet le repliement correct de la molécule dans sa conformation active. Ainsi le CCL18 produit dans un système eucaryote (CHO) dans notre laboratoire présente 2 ponts disulfures entre les cystéines Cys10-Cys34, et Cys11-Cys50, alors que le CCL18 produit par *E.Coli* ne possède que le pont entre les cystéines Cys11-Cys50. Les tests en chimiotaxie sur des Lc T naïfs et les basophiles, ainsi que les tests d'histaminolibération, ont montré que la concentration d'activité maximale de CCL18 produit par la CHO est de 10^{-9}M, contre 10^{-7}M pour le CCL18 produit par *E.Coli*. La réduction du pont Cys10-Cys34 dans la CCL18-CHO entraine la diminution de son activité biologique, à des niveaux équivalents de ceux observés pour la CCL18-*E.Coli* [Thèse Benjamin Legendre, 2009].

Régulation par désensibilisation du récepteur

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

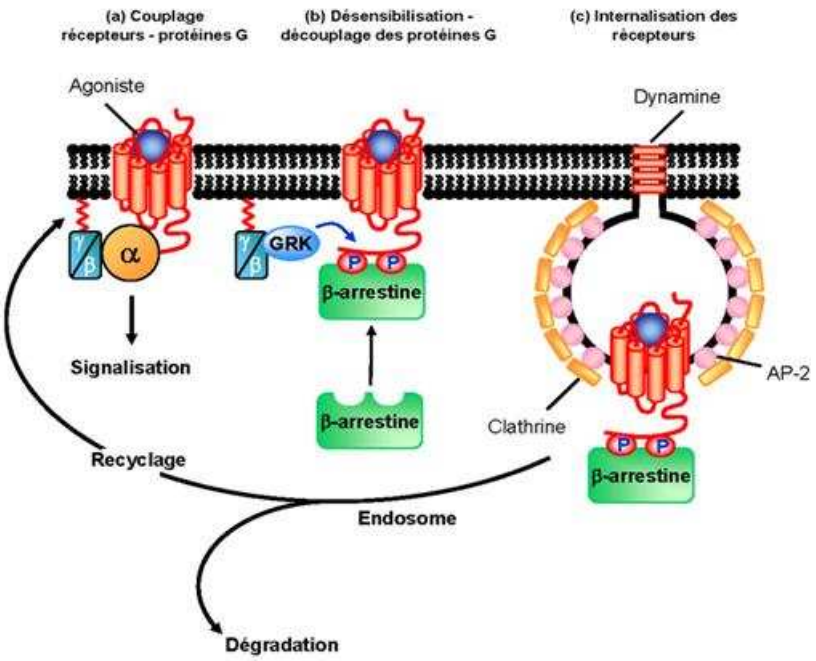


Figure 15 : Mécanisme de désensibilisation d'un GPCR.

Activité chimiotactique : La diapédèse

La diapédèse est le mécanisme par lequel les leucocytes du torrent circulatoire s'insinuent entre les cellules endothéliales en réponse à des signaux inflammatoires (figure 16). Cette transmigration implique une série d'événements faisant intervenir différents acteurs. La première étape est le roulement, les leucocytes sont ralentis à la surface endothéliale préactivée (Fragments bactériens, cytokines pro-inflammatoires, histamine, thrombine…), grâce aux E et P sélectines qui interagissent avec les L sélectines [Crisi, 1996], la délétion de ces gènes dans un modèle *in vivo* inhibe la réponse Th2 [Lukacs, 2002]. Cette adhésion est de faible affinité, elle favorise le contact entre les récepteurs chimiokiniques leucocytaires et les chimiokines piégés dans les GAG, conduisant à des phases successives d'attachement et de détachement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales, ce phénomène est nommé « rolling ». Durant cette phase la vitesse est peu rapide et favorise le contact des chimiokines avec leur récepteur ce qui donne lieu à la seconde phase, dite d'activation, la liaison au récepteur active la protéine G, le pic de calcium intracellulaire contrôle l'export des intégrines dont le LFA-1 à la surface. Ces intégrines se lient aux molécules d'adhésions endothéliales, dont le VCAM1 et l'ICAM1 [Keane, 1998]. Cette interaction est de forte affinité constitue la troisième phase, dite d'adhésion ferme. La dernière phase, la diapédèse, consiste en la mobilisation du cytosquelette avec émission de pseudopodes et motricité cellulaire.

Durant cette phase des protéases sont produites pour digérer les protéines de jonctions cellulaires endothéliales et la matrice extracellulaire permettant le passage leucocytaire au sein du tissu [Gunn, 1998].

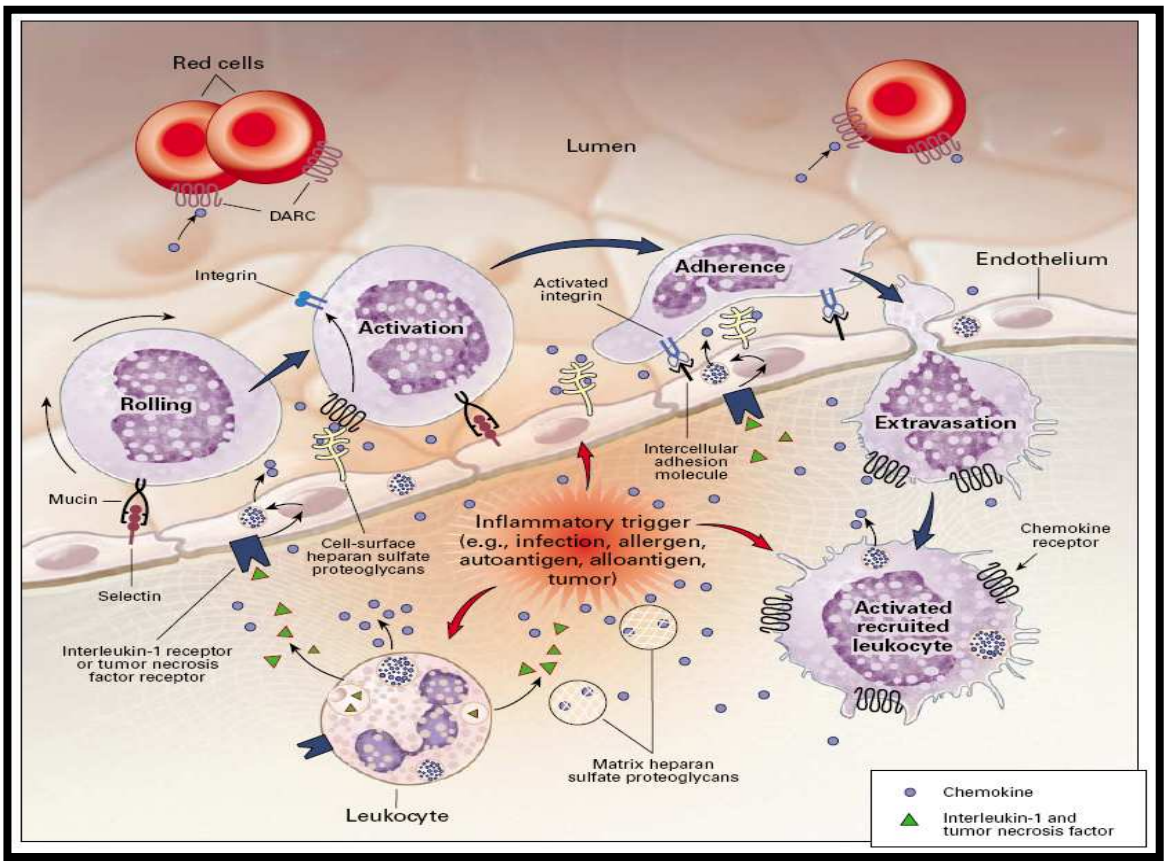


Figure 16 : Etapes de la migration leucocytaire transendothéliale. Le schéma permet de souligner la complexité des interactions moléculaires entre la cellule ciblée par la chimiokine et l'endothélium vasculaire. Cette interaction est dépendante de sélectines lors de la phase de roulement, puis des intégrines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

Activités Extrachimiotactiques

Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées aux activités qui impliquent les chimiokines autre que la migration, allant du maintien de la survie à des capacités de différenciation et polarisation cellulaire. L'équipe de Graham a démontré *in vitro* un effet inhibiteur de la prolifération de cellules souches hématopoïétique par le CCL3 [Graham, 1990]. 10 ans après, Stellato *et al.* ont décrit pour la première fois l'expression d'un récepteur chimiokinique fonctionnel sur des cellules de structures, le CCR3 à la surface des cellules épithéliales bronchiques et intestinalles sans pour autant s'aventurer dans une description de fonctionnalité [Stellato, 2001]. Au même moment Braun *et a.l* on constaté que CCL2 inhibait la production de l'IL-12 par des DC stimulées avec des agents

bactériens [Braun, 2000]. De façon intéressante les chimiokines semblent agir sur la différenciation des leucocytes. L'étude de Marsland concerne les DC et le CCL19, une chimiokine exprimée constitutivement dans les organes lymphoïde et qui attire les LcT naifs et les DC matures via le CCR7 pour les mettre en contact. Ils ont montré *in vitro* que le CCL19 induisait la maturation de DC de rate de souris en augmentant l'expression des molécules de costimulation et la production de cytokines pro Th1 de type IL-12 et TNF-α [Marsland, 2005]. Cette fonctionnalité a été confirmée *in vivo* avec des souris plt/plt déficientes en CCL19 et ne produisant pas de CCL21 au niveau des ganglions lymphatiques. Ils ont également montré que CCL19 facilite l'endocytose et avait un rôle, avec le CCL21, anti apoptotique sur les DC matures. Ainsi il a été démontré un rôle des chimiokines dans la finalisation de la maturation et la survie de DC ayant capturé un antigène. Au même moment Cappello *et al.* on décrit la même chose avec le CCL16 et des DC humaines différenciées *in vitro*, à savoir une action sur la maturation des DC avec augmentation de l'expression de molécules de costimulation et du CCR7 et une action favorisant un profil Th1 avec une baisse d'IL-10 [Cappello, 2006]. Ainsi, CCL16 semble agir dans la maturation précoce des DC au niveau des épithélia [Pannellini, 2004] [Chand, 2007], une maturation finalisée par CCL19 et CCL21 au niveau ganglionnaire. Cet effet extrachimiotactique des chimokines ne se limite pas qu'aux DC, puisque Karpus *et al.* ont démontré un effet du CCL2 et CCL3 sur la polarisation lymphocytaire T en présence d'APC, générant un profil Th2 ou Th1 aussi efficace qu'un apport d'IL-4 ou IFN- γ exogènes [Karpus, 1997]. Cette étude a été confirmée *in vivo* par Gu *et al.*, quelques années plus tard, avec des souris CCL2 KO [Gu, 2000]. Ces données démontrent un rôle important des chimiokines dans la réponse immunitaire, en dehors de l'effet purement migratoire avec un recrutement et localisation différentielle des différentes cellules et sous populations leucocytaires. Cet apport sur la fonctionnalité des chimiokines devrait être corroboré par des études plus approfondies, notamment en situation pathologique.

Chimiokines en pathologie allergique

L'intérêt s'est bien sur porté sur les chimiokines de type Th2 et leurs récepteurs, et plus particulièrement leurs implications dans la phase tardive de la réaction allergique qui nécessite un recrutement cellulaire. Le plus étudié est CCR3 et ses ligands. En effet, ce récepteur de chimiokines est exprimé sur différents acteurs cellulaires de la réaction

allergique en particulier sur les éosinophiles, basophiles, mastocytes et Lc Th2. Une surexpression de ses ligands dans l'environnement pulmonaire a également été retrouvée (Lavage broncho alvéolaire, cellules épithéliales bronchiques, muqueuses bronchiques, cellules musculaires lisses, expectorations…) après challenge allergénique [Sekiya, 2000] [Sekiya, 2002] [Lezcano-Meza, 2003]. Des études plus poussées *ex vivo* et *in vivo*, dans des souris CCR3 KO et des modèles de xénogreffes avec des peaux de patients allergiques ont confirmé son rôle dans le trafic des éosinophiles et dans leur localisation tissulaire lors d'une réaction allergique [Humbles, 2002] [Senechal, 2002]. Un deuxième recepteur qui sembe impliqué est le CCR4, fortement exprimé sur les Lc Th2 entre autres. Les études *in vivo* sur des souris CCR4 KO sensibilisées à l'OVA ne sont pas convaincantes quant à l'implication de ce récepteur dans la réaction allergique, ni au niveau production cytokinique, infiltrat cellulaire ou HRB qui ne sont pas modifiés [Chvatchko, 2000]. En revanche, ses ligands CCL17 et CCL22 sont surexprimés dans certaines pathologies allergiques [Goebeler, 2001] [Hirata, 2003] et la neutralisation de CCL22 entraîne une diminution du nombre d'éosinophiles et de T $CD4^+$ et une inhibition de l'HRB [Gonzalo, 1999]. La cinétique d'intervention de ces récepteurs de chimiokines semble déterminante dans la réaction allergique pulmonaire, comme l'a démontré Lyold, ainsi le CCR3 via le CCL11 semble être impliqué dans le recrutement précoce des cellules Th2 à partir du 4ème jour, tandis que le CCR4 via le CCL22 serait plus impliqué dans le recrutement tardif au delà du 7 ème jour. Le CCR8 est également exprimé préférentiellement sur les cellules Th2, et les souris CCR8 KO dans un modèle d'asthme expérimental présentent un défaut de production des cytokines Th2 et de recrutement d'éosinophilie au niveau pulmonaire [Chensue, 2001]. Cependant cette étude est très controversée par d'autres équipes qui démontrent que l'absence du CCR8 ne présente aucun effet sur l'inflammation allergique [Chung, 2003] et que des anticorps bloquant le CCR8 n'ont pas d'effet sur la réaction allergique dans un modèle animal d'asthme [Goya, 2003]. Le CCL1, ligand du CCR8, est augmenté au niveau pulmonaire au cours des challenges allergéniques et son inhibition diminue l'infiltrat d'éosinophiles [Bishop, 2003]. L'expression de cette chimiokine est très marquée dans les maladies allergiques cutanées, notamment dans la dematite atopique avec une sécrétion dépendante des DC et cellules endothéliales [Hieshima, 1997]. A coté du rôle prédominant de la famille CCL et CCR dans les maladies allergiques, la famille CXCL/CXCR avec le CXCL9 et CXCL10 et leur récepteur CXCR3 ; un récepteur spécifique des Lc Th1, peut évoquer une implication dans la résolution de la réaction allergique avec un recrutement de cellules

capables de produire des cytokines inhibitrices de l'inflammation Th2. Cependant, les souris le CXCL10 montrent un effet exacerbateur [Medoff, 2002]. La contre balance Th1/Th2 semble beaucoup plus complexe. Le CCR4 et CCR8 sont également exprimés sur les Lc T régulateurs [Iellen, 2001] qui participent à la résolution de la réaction inflammatoire et une théorie récente suggère que l'expression d'un même récepteur par des cellules effectrices et régulatrices permettrait une contre régulation de la réaction inflammatoire au sein d'un même tissu [Bromley, 2008].

Notre Chimiokine d'intérêt : CCL18

Généralités

CCL18 a été découvert en 1997 par plusieurs équipes, et selon des modalités différentes, ce qui lui a valu plusieurs dénominations avant la mise en place en 2000 de la nomenclature systématique. Elle a donc été nommée PARC (Pulmonary and Activation Regulated Chemokine) par l'équipe de Hieshima *et al*. dont la séquence a été isolée par homologie avec la sequence nucléotidique de CCL3, qui s'exprimait de manière constitutive dans le poumon foetal humain [Hieshima, 1997]. Adema *et al*., quant à eux, l'ont cloné a partir d'une banque de donnée d'ADNc issue de cellules dendritiques dérivées de monocytes, ce qui lui a valu le nom de DC-CK1 (Dendritic Cell Chemokine 1) [Adema, 1997]. Simultanément, sa séquence fut trouvée dans une banque d'ADNc issue de macrophages activés par l'IL-4 par l'équipe de Kodelja *et al*., qui a été nommée AMAC-1 (Alternated activated Macrophage Associated Chemokine-1) [Kodelja, 1998]. De même, un screening de la base de données EST a montré un peptide de forte homologie (64%) avec CCL3/MIP-1α, d'où le nom MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4) [Guan, 1999] [Wells, 1997].

Le gène CCL18

Le gène codant le CCL18 est situé sur le cluster majoritaire des CC-chimiokines humaines sur le chromosome 17q.11.2, très près du gène de CCL3. A l'instar des gènes de la famille des CC-chimiokines, le gène de CCL18 est composé de trois exons et deux introns [Politz, 2000]. Le gène de CCL18 est très grand, comparativement à ceux des autres CC-chimiokines (7,2 kb contre 2-3 kb), cela est du notamment à la longueur du premier intron (6 kb) qui contient deux pseudo-exons. Il a été suggéré que le gène du CCL18 serait issu de la duplication du gène de CCL3 suivie de délétions et d'une utilisation sélective de certains exons [Tasaki, 1999]. Cet évènement s'étant produit après la séparation rongeur-primate, ceci explique l'absence du CCL18 dans le génome murin. En outre, la région promotrice en amont de la TATA box du gène de CCL3 n'est pas bien conservée sur le gène de CCL18, ce qui expliquerait la différence d'expression entre ces deux chimiokines. L'analyse de la séquence du promoteur de CCL18 montre la présence d'élément de réponse à STAT1 et STAT6 (signal transducer and activator of transcription). Cette double présence suggère l'existence d'un effet de régulation

compétitive entre l'interféron γ (induction de STAT1) et l'IL-4 (inducteur STAT6) [, Politz, 2000]. On retrouve également deux séquences potentielles AP-1 (activator protein-1) et une séquence de l'élément régulateur C-EBP (CAAT/ enhancer-binding protein). Or l'induction de la transcription par stimulation à l'IL-4 nécessite la fixation de leur ligand à STAT6 et C-EBP. Il existe également une séquence GR de liaison au récepteur aux glucocorticoïdes au début du gène.

La protéine CCL18

La protéine CCL18 contient 89 acides aminés. Elle est clivée de 20 acides aminés N-terminaux, ce qui donne une protéine mature de 69 acides aminés, de poids moléculaire de 7851 daltons (Da). Il a été mis en évidence plusieurs isoformes chez l'homme. A coté de la forme complète (1-69), une forme clivée C-terminale (1-68) a été découverte dans le plasma de donneurs sains et chez des patients atteints de leucémie lymphoblastique [Struyf, 2003], ainsi que dans les ascites de patients atteint de carcinome ovarien [Schutyser, 2002]. D'autres formes tronquées N-terminales (3-69 et 4-69) ont été détectées dans des surnageants de PBMC [Schutyser, 2001]. Les PBMC produisent ces isoformes de manière constitutive ou induite par l'exposition à des enterotoxines staphylococciques (SEA, SEB) et à l'IL-4. Le CCL18 mature présente une forte homologie avec CCL3 (64% d'acides aminés identiques). Des analyses réalisés *in silico*, par alignement de séquence et modélisation assistés par ordinateur, ont montré que CCL18 présente les caractéristiques structurelles typiques des CC-chimiokines. Sa structure comprend la conservation de la position des 4 résidus cystéines et le noyau rigide composé d'une petite hélice suivie par une chaine de 3 feuillets β antiparallèles et une hélice α C-terminale.

Le récepteur de CCL18

Jusqu'à présent le récepteur CCR spécifique de CCL18 n'a été pas encore clairement défini. Cependant, des informations intéressantes des propriétés de la signalisation dépendante de CCL18 ont été caractérisées. Ainsi, la capacité de la toxine pertussique à inhiber la chimiotaxie induite par CCL18 sur les Lc T et B suggère l'implication d'une protéine Gαi et d'un GPCR à l'instar des autre chimiokines [Adema, 1997] [Atamas, 2003] [Lindhout, 2001]. De plus, l'inhibition d'ERK (extracellular signal-regulated kinase) dans les fibroblastes pulmonaires inhibe l'induction de la

production de collagène par CCL18 [Atamas, 2003]. L'utilisation d'une protéine de fusion CCL18-SEAP(His)6 a permis de mettre en évidence les caractéristiques du récepteur. Ainsi, sur les Lc, on trouve une seule classe de récepteur avec un Kd de 1,9 nM, 590 sites par cellule. En outre, la fixation spécifique de CCL18 n'est pas inhibée par la présence de CCL2, CCL3, CCL4 ou CCL5, ce qui suggère que CCL18 ne partage pas leur récepteur correspondant (par exemple CCR1, CCR2, CCR3 ou CCR5) [Hieshima, 1997]. Toutefois, il a été montré que CCL18 est capable de se fixer au CCR3, mais sans induire son activation, avec un rôle antagoniste [Nibbs, 2000]. En effet, CCL18 inhibe le flux calcique induit par CCL11 sur les éosinophiles, ainsi que la chimiotaxie. Il inhibe également la fixation de CCL11 sur les éosinophiles, mais aussi sur des cellules transfectées avec le CCR3. Wan *et al*. ont montré que le Ki de CCL18 sur CCR3 est de 8,8 ± 1,1nM (en compétition avec de l'éotaxine marquée) [Y. Wan, J. P. Eur J Pharmacol 2002]. Une firme pharmaceutique américaine du nom de « Oxygen », a publié un brevet qui affirme la liaison du CCL18 au CCRL2, connu aussi sous les noms : HCR, CRAM-A, CRAM-B, CKRX et Eo1, ce récepteur est fortement exprimé par les macrophages, les DC et certains sous types de Lc T et présentent 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 DC dans les poumons par contre le trafic des DC chargées en antigène vers les ganglions est altéré. Ces souris sont protégées de l'asthme expérimental dans un modèle d'OVA (réduction de l'infiltrat d'éosinophiles dans le LBA, diminution des cytokines et chimiokines Th2 [Otero, 2010]. Une autre équipe affirme que ce récepteur est non signalant et qu'il constitue un simple leurre pour le CCL19 ligand du CCR7 [Catusse, 2010]. Une étude récente a montré le rôle de CCL18 dans la migration métastatique du cancer du sein et incrimine le récepteur signalant PITPNM3 par des arguments de colocalisation cellulaire, immunoprécipitation et transfection **[**Chen, 2011].

Activités biologiques de CCL18

L'une des premières activités de CCL18 est son pouvoir chimiotactique envers les Lc T, que ce soit des T CD4+ ou CD8+ [Hieshima, 1997]. Adema *et al*. ont montré que ce sont les cellules T naïves qui répondent au CCL18, et peu les mémoires [Adema, F. 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. 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, 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 (polarisé par IL-12/anti IL-4) [de Nadai, 2006]. En plus de ses propriétés chimioattractantes, CCL18 est capable d'activer la polymérisation de l'actine dans des Lc Th2 polarisés *in vitro* [P. de Nadai, 2006]. CCL18 attire également les Lc B $CD38^-$, naïfs, de la couronne périfolliculaire des amygdales [Gunther, 2005]. En revanche, les Lc B des centres germinaux ne sont pas attirés. CCL18 n'attire pas la lignée monocytaire THP-1, ni les monocytes ou les neutrophiles fraichement isolés [Hieshima, 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 1 semaine de culture ils ne répondent plus à la stimulation par la chimiokine [Schraufstatter, 2004]. De même, CCL18 est capable d'attirer les DC immatures, mais est incapable d'induire la migration de DC matures [Vulcano, 2003]. CCL18 est capable d'induire non seulement la chimiotaxie de basophiles, mais également le relargage d'histamine par ces derniers [de Nadai, 2006]. De même, CCL18 est également 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, 2003]. CCL18 est capable également de supprimer la prolifération de progéniteurs hématopoïétiques, stimulés par GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et SLF (Steel Factor) [Broxmeyer, 1999], et augmente la survie et adhésion des monocytes/macrophages.

Expression de CCL18

Hieshima *et al*. ont montré une expression constitutive et forte de CCL18 au niveau pulmonaire, et à de plus faibles niveaux dans quelques tissus lymphoïdes, tels que les ganglions lymphatiques, le thymus [Hieshima, 1997]. Il a été également montré une transcription du gène de CCL18 dans les macrophages alvéolaires de poumon et dans les DC de ganglion lymphatique et d'amygdale [Adema, 1997] [Hieshima, 1997]. Les cellules productrices de CCL18 sont essentiellement les CPA (monocytes/macrophages et les DC).

Les monocytes/macrophages

Deux types de macrophages sont identifiés, d'une part les macrophages activés classiquement aussi dénommés M1, et les macrophages activés de façon alternative ou M2. Les macrophages M1 sont issus de macrophages activés par l'IFN-γ, des produits microbiens (LPS) ou des cytokines comme le TNF-α [Burke B, 2002]. Ces macrophages se caractérisent par une forte capacité de présentation de l'antigène, et de forte production d'IL-12 et d'IL-23 favorisant ainsi la réponse de type 1 [Verreck, 2004]. Les macrophages M2 peuvent être générés par un grand nombre de stimuli, notamment les cytokines IL-4, IL-13 [Gordon, 2003] et IL-10, les corticoïdes [Goerdt, 1999] ou une costimulation avec des complexes immuns et le LPS. Ces cellules expriment alors de grande quantité d'IL-10 et peu d'IL-12 et favorisent ainsi une réponse de type 2 ou une réponse régulatrice [Mosser, 2003]. Il a également été décrit une sécrétion de CCL18 par des monocytes stimulés par le LPS [Sallusto, 1999], bien que certaines équipes relatent l'inverse [Adema, 1997] [Kodelja, 1998]. Certains macrophages M2 générés par *Coxiella burnetii* présentent des caractéristiques différentes de ceux générés par le LPS. En effet, cette stimulation permet d'augmenter l'expression de certains gènes associés à la polarisation M2 [Benoit, 2008], tels que TGF-β, IL-1R. Il se trouve notamment que cette stimulation augmente la production de CCL18. Il existe également des stimuli capables d'induire l'expression de CCL18, tel que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13. Bien que le TNF-α n'en soit pas capable seul, sa co-administration avec l'IL-4 potentialise l'effet de ce dernier. En revanche l'adjonction d'IFN-γ quant à elle inhibe l'effet de l'IL-4 [Kodelja, 1998]. D'autres facteurs à caractère pathogénique sont capables d'induire la synthèse et la sécrétion de CCL18. En effet, des macrophages dérivés de monocytes voient leur taux de CCL18 augmenter sous l'action de MTB inactivé (*Mycobacterium tuberculosis*) [Wells, 1997].

Les cellules dendritiques

CCL18 est exprimée constitutivement par les DC immatures, tant en ARNm qu'en protéine [Adema, 1997] [Vulcano, 2003] [Vissers, 2001]. L'expression de CCL18 par ces DCs suit une cinétique sur plusieurs jours. Kodelja *et al*. ont rapporté une production *in vitro* de CCL18 qui augmente jusqu'à J3, et redescend à J6 et J8 [V. Kodelja, J Immunol 1998]. En outre, Van Der Voort *et al*. décrivent également une faible expression de CCL18 à J6 [van der Voort, 2005]. Les DC dérivées de monocytes immatures issues de patient atteint d'arthrite rhumatoïde présentent un taux d'ARNm supérieur à celui de sujet

contrôles [van Lieshout, 2005]. Ce résultat suggère que l'état inflammatoire chronique est associé à une surproduction de CCL18 par les MDDC immatures. En réalité, 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, des cytokines pro-inflammatoires de type Th1, sont capable de réprimer la production de CCL18 [Kodelja, 1998] [Vulcano, 2003]. En revanche, les cytokines de type Th2 comme IL-4, Il-10 et IL-13 augmentent fortement cette sécrétion [Vulcano, 2003] [van der Voort, 2005] [Kodelja, 1998]. 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, 2008], qu'elle soit constitutive ou induite par l'IL-4 (adjoint de GM-CSF). D'autres stimuli d'origine exogène sont capables de moduler la production de CCL18 par les DCs immatures. Ainsi l'activation du récepteur FcγRI par un anticorps chimérique entraîne l'activation des MDDC et l'expression de CCL18 [Zeidler, 1999)]. Par contre la PGE2 diminue la production de CCL18 par DC immatures [Vulcano, 2003]. Pourtant, la sécrétion de CCL18 est potentialisée au cours de la maturation des MDDC, lorsqu'elle est induite par l'activation de CD40 et gp130 avec des anticorps agonistes [Wang, 2002]. En outre, Le rôle du LPS, inducteur de la maturation, sur la sécrétion de CCL18 par les MDDC est controversé. En effet, Vulcano *et al*. montrent que le LPS inhibe la production de CCL18 [Vulcano, 2003], alors que d'autres observent une augmentation de l'expression [Vissers, 2001] [van Lieshout, 2005]. Il a été également constaté que le LPS n'avait pas d'incidence sur la sécrétion de CCL18 [van der Voort, 2005] [Kodelja, 1998]. Ces discordances peuvent être imputées aux différentes concentrations de LPS utilisées. L'effet activateur est observé pour des concentrations de 1 à 2 μg/ml, et l'inhibition pour des concentrations de 0,1 μg/ml. L'absence d'effet est manifeste à une concentration de 25 pg/ml. Récemment, une étude a montré que la maturation de MDDC par du LPS accroit la sécrétion de CCL18 sous une stimulation par la thrombine [Li, 2008], via l'activation de PARs (protease-activated receptors). Lorsque la maturation des DC est induite avec CD40L [Vissers, 2001], *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC), C. *albicans*, le virus *influenza* [Vulcano, 2003] ou un mélange de facteurs de maturation (TNF-α, IL-1β, IL-6 et PGE2) [van der Voort, 2005], la production de CCL18 n'est pas augmentée voire est inhibée. Bien que Vulcano *et al*. aient montré que le TNF-α inhibe la production de CCL18, Vissers *et al*. ont montré qu'au cours de la maturation induite par le TNF-α, l'expression de CCL18 est très augmentée (multipliée par 60) [Vissers, 2001]. De plus, la neutralisation de TNF-α par des anticorps au cours de la maturation des DC

entraîne une diminution de CCL18 (ARNm) chez les patients atteint d'arthrite rhumatoïde comme chez les sujets contrôles [van Lieshout, 2005]. La régulation de la sécrétion de CCL18 au cours de la maturation des MDDC est complexe et dépend vraisemblablement d'un contexte cytokinique. Parmi les autres types de DC, les cellules de Langherans fraîchement isolées de la peau ou après 24h de culture en GM-CSF n'expriment pas CCL18 [Vissers, 2001] [Kodelja, 1998]. De même, ni les pDC ni les mDC ne produisent CCL18 de façon constitutive [Vissers, 2001] ou après stimulation par le LPS, le virus *influenza*, le CpG, le CD40L ou la VitD3 [Vulcano, 2003]. En revanche, l'IL-10 induit la production de CCL18 par les m-DC mais pas par les pDC après 24h et 48h de culture [Vulcano, 2003]. De plus, la maturation des mDC par le MCM (Monocyte-Conditioned Medium) stimule l'expression de CCL18 (mRNA), alors que dans les memes conditions, les pDC matures ne produisent pas CCL18 [Vissers, 2001]. La lignée myéloblastique humaine KG1 est capable de se différencier en cellules DC-like en réponse au PMA et sécrète de grande quantité de CCL18. La sécrétion est inhibée par le TNF-α. Par contre la lignée dérivée KG1a qui ne répond pas au PMA n'exprime pas CCL18 en réponse à ce stimulus, mais en ajoutant le TNF-α, ces cellules produisent CCL18. Le PMA plus le TNF-α induisent une différenciation précoce des KG1a en DC-like, ce qui suggère donc que CCL18 a une expression maximale lors des stades précoces de la différenciation des DC. Par hybridation *in situ*, Adema *et al*. ont montré qu'au niveau des centres germinatifs des amygdales et des ganglions lymphatiques, l'ARNm de CCL18 est présent mais n'est pas exprimé par les macrophages ou les cellules dendritiques folliculaires [Adema, 1997] [Hieshima, 1997]. Ce sont les DC des centres germinatifs qui représentent la source de CCL18 [Lindhout 2001].

CCL18 et pathologies

L'asthme allergique

L'étude chez le singe par puce à ADN et PCR quantitative a montré que CCL18 est augmenté dans les tissus pulmonaires lors d'un asthme expérimental (*Ascaris suum*) [Zou, 2002]. De plus, CCL18 est retrouvé en plus grande quantité dans le LBA de patients asthmatiques allergiques que chez les sujets sains. de Nadaï *et al*. ont montré que des PBMC issues de patients asthmatiques allergiques stimulées par l'allergène Derp 1 secrètent plus de CCL18 par comparaison avec celles issues de sujets sains. Une partie du CCL18 retrouvée dérive directement des pDC stimulées par Der p 1, et une autre partie

provient d'une activation monocytaire par l'IL-4 et l'IL-3 produits par les cellules T stimulées par Derp 1. CCL18 recrute *in vitro* des cellules Th2 polarisées et des basophiles, mais reste inopérant vis-à-vis des cellules Th1 et des éosinophiles [de Nadai, 2006]. D'autre part, le CCL18 induit l'activation des basophiles, le relargage de calcium intracellulaire et la libération d'histamine.

Autres maladies à tropisme pulmonaire

Sur 16 chimiokines examinées par RT-PCR, CCL18 s'est révélé être la chimiokine la plus augmentée dans les poumons de patient atteint de pneumonie d'hypersensibilité et de fibrose pulmonaire idiopathique [Pardo, 2001]. Cependant, CCL18 est beaucoup plus exprimé au niveau du poumon de patients atteints de pneumonie d'hypersensibilité que de ceux atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Dans ces deux pathologies, il a été montré que les principales sources de CCL18 sont des cellules tissulaires inflammatoires qui ont été reconnues comme étant des macrophages et des DC, incluant également quelques cellules épithéliales alvéolaires. Il a également été démontré une corrélation entre le niveau d'expression de CCL18 et le pourcentage de Lc dans le LBA. Enfin, une plus forte expression de CCL18 est détectée lors de la phase aiguë de la pneumonie d'hypersensibilité correspondant à une inflammation sévère comparée à la phase chronique caractérisée par une inflammation moins importante et plus de lésions fibrotiques. Les données montrant que CCL18 induit la production de collagène par les fibroblastes pulmonaires impliquent CCL18 dans la fibrose pulmonaire [Atamas, 2003]. Chez des patients atteints de sclérodermie accompagnée d'une inflammation pulmonaire, CCL18 est légèrement augmenté au niveau des LBA [Luzina, 2002]. La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une maladie chronique systémique d'origine respiratoire, atteignant les bronches. Caractérisée par une obstruction lente et progressive des voies aériennes et des poumons, associée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires avec destruction des parois alvéolaires et une inflammation chronique des poumons. Le taux de CCL18 est élevé chez les patients BPCO et est corrélé avec un risque accru d'hospitalisation cardiovasculaire ou de mortalité dans la cohorte LHS et à la mortalité dans la cohorte ECLIPSE [Sin, 2011].

Les pathologies cancéreuses

CCL18 est exprimé dans plusieurs pathologies cancéreuses notamment le carcinome ovarien [Schutyser, 2002], le cancer gastrique [Leung, 2004] et la leucémie lymphoblastique aiguë [Struyf, 2003], et récemment décrit comme favorisant l'invasion et les métastases du cancer du sein [Chen, 2011]. Dans le carcinome ovarien, une comparaison des teneurs en CCL18 a montré que les patients atteints de carcinome ovarien présentent des ascites plus riches en CCL18 que des patients atteints de carcinome non ovarien. En outre, ce CCL18 a été purifié et ils ont observé la présence de deux isoformes, le CCL18 intact (1-69) et le CCL18 tronqué en C-Ter (1-68). Ce mélange est capable d'attirer des Lc $CD3^+$ [Schutyser, 2002]. Une étude en immunohistochimie a montré que l'expression de CCL18 dans l'infiltrat cellulaire n'est pas due à la cellule cancéreuse, mais à des cellules présentant une morphologie de monocyte/macrophage. Qui plus est, des macrophages immunosuppresseurs producteurs d'IL-10 ont été détectés dans les carcinomes ovariens [Loercher, 1999], or ceux-ci pourraient être responsables de la forte sécrétion de CCL18. Une deuxième source potentielle de CCL18 est représentée par des DC retrouvées dans les ascites de patients qui présentent un phénotype immature [Gunzer, 2001] [Melichar, 1998]. Ainsi CCL18 pourrait participer à la réponse tolérogénique de l'hôte développée vers la tumeur en recrutant des Lc et des DC immatures dans un environnement immunosuppresseur. Dans le cancer gastrique, un rôle de suppresseur de tumeur de CCL18 ne peut être éliminé. Une forte expression de CCL18 est associée à un bon pronostic des patients et ce quelque soit le stade tumoral. A l'instar du carcinome ovarien, des marquages en immunohistochimie et des hybridations *in situ* ont montré que la source prépondérante de CCL18 est une sous-population de macrophages associée à la tumeur. Cette sous-population de macrophages se localise préférentiellement au front invasif de la tumeur. Ces résultats suggèrent que CCL18 jouerait un rôle dans la génération d'une réponse anti-tumorale via le recrutement et l'activation spécifique de cellules immunitaires. Les enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë, montrent des taux de CCL18 sériques très supérieurs à ceux observés chez des sujets contrôles ou chez des enfants atteints de leucémie myéloïde. De plus, les taux de CCL18 au niveau de leur moelle osseuse sont comparables à ceux observés au niveau du sérum. Bien que les Lc ou les cellules lymphoblastiques ne soient pas capables de sécréter CCL18, la coculture de ces cellules avec des monocytes stimulés par un super-antigène ou l'IL-4 entraîne une sécrétion accrue de CCL18 [Struyf, 2003]. Le rôle de CCL18 dans cette pathologie est mal connu.

Dans le cancer du sein, La majorité des cancers mènent à l'inflammation des cellules appelées macrophages associés aux tumeurs (TAM) [Condeelis, 2006] [Pollard, 2004]. Il existe deux types de TAM ; les macrophages M2 favorisent la croissance des vaisseaux sanguins (ou angiogenèse) et sont associées à la progression du cancer et des métastases [Mancino, 2010] les macrophages M1, quant à eux, activent les cellules immunitaires qui attaquent les tumeurs cancéreuses. Dans étude de Chen *et al*. ils montrent que CCL18, libérée par les macrophages M2, est abondamment exprimé dans les TAM de cancer du sein et est corrélée aux métastases, CCL18 est de mauvais pronostic chez ces patients.

Les pathologies cutanées

CCL18 est vraisemblablement impliqué dans les réactions inflammatoires cutanées. Parhybridation *in situ* on observe une expression de CCL18 au niveau du derme au cours de l'hypersensibilité de contact, en particulier au niveau des sites périvasculaires d'accumulation des leucocytes [Goebeler, 2001]. L'expression de CCL18 est maximale à partir de 48h-72h après l'induction de la réaction d'hypersensibilité et coïncide avec un infiltrat important de Lc T. Des analyses par puce à ADN et PCR quantitative ont montré une augmentation de CCL18 dans la dermatite atopique [Nomura, 2003]. De plus, CCL18 est augmenté spécifiquement et fortement au niveau de la peau de patients atteints de dermatite comparativement à d'autres lésions cutanées et à des peaux normales [Pivarcsi, 2004]. Les marquages en immunohistochimie ont montré que CCL18 est produit par des cellules morphologiquement proches de DC dispersées dans l'épiderme ou en amas aux sites d'infiltrats périvasculaires. CCL18 est également exprimé par les kératinocytes et les cellules de Langerhans au niveau des lésions de dermatite atopique [Pivarcsi, 2004]. Les taux sériques de CCL18 ainsi que le pourcentage de monocytes/macrophages, et de DC produisant CCL18, parmi les cellules mononucléées stimulées par l'IL-4, sont augmentés dans la dermatite atopique par rapport à des sujets sains. En outre, l'augmentation de CCL18 est corrélée au passage d'une dermatite atopique légère à sévère. Toutefois, les taux sérique de CCL18 sont diminués chez des patients aux scores très sévères [Gunther, 2005]. *In vivo*, l'exposition de peau, issue de patients atteints de dermatite atopique non lésionnelle, à un allergène ou au SEB (*Staphylococcal enterotoxin B*) induit l'expression de CCL18. En outre, de nombreux patients atteints de dermatite atopique présentent des lésions colonisées par S. *aureus*. A l'instar de l'arthrite septique, la dermatite atopique peut représenter une autre pathologie

associée à S *aureus* où CCL18 peut contribuer à l'initiation et l'amplification de l'inflammation induite par ce pathogène [Pivarcsi, 2004].

Autres pathologies

CCL18 a été décrit dans un certain nombre d'autres pathologies, notamment dans l'arthrite. Les les fluides synoviaux de patients atteints d'arthrite contiennent de grande quantité de CCL18 [Radstake, 2005]. Les MDDC immatures et matures issues de patients atteints d'arthrite rhumatoïde expriment plus de CCL18 que celles de sujets témoins. Cette expression est corrélée à l'activité de la maladie. Dans la maladie de Gaucher, maladie qui se caractérise par une accumulation de glycolipides dans les macrophages due à un déficit enzymatique en glucocérébrosidase, et qui s'accompagne d'une réaction inflammatoire soutenue. Dans cette pathologie de fortes concentrations sériques de CCL18 ont été détectées [Boot, 2004]. De plus, les macrophages gorgés de glycolipides présentent un phénotype de macrophages M2 et sont la source de CCL18 dans la maladie de Gaucher [Boven, 2004]. CCL18 sérique est aussi augmentée dans la maladie de Niemann-Pick de type B caractérisée par un engorgement des macrophages en sphingomyéline [Brinkman, 2005]. Le syndrome de Sjögren est une maladie autoimmune qui entraîne la dégradation des glandes salivaires et lacrymales et une colonisation de ces tissus par des cellules mononucléées. L'étude de ces tissus a montré une forte expression de CCL18 chez les patients atteints de cette pathologie. Les cellules productrices de CCL18 ont été identifiées comme des DC et, de façon plus surprenante, des Lc B [Xanthou, 2001]. L'hépatite C est une maladie inflammatoire des aires portales et péri-portales du foie. Chez les patients atteints d'hépatite C chronique, les niveaux d'expression de l'ARNm de CCL18 sont corrélés aux taux sériques de l'alanine aminotransférase, reflet de la mort des hépatocytes. L'hybridation in situ révèle que des cellules mononucléées infiltrées sont la source de CCL18 au niveau de l'aire portale des patients atteint d'hépatite C chronique. Il est intéressant de noter que c'est au niveau de cette aire portale qu'est retrouvée une agrégation de Lc T naïfs avec une structure semblable à un follicule lymphoïde primaire [Kusano, 2000]. Une production importante de CCL18 a été observée dans différents tissus du système nerveux central traumatique. Un mécanisme anti-inflammatoire conjointement exercée par ces cellules par l'intermédiaire du CCL18 peut être impliqué dans l'effet protecteur après une blessure traumatique du système nerveux central et la tumorigenèse [Chang, 2010].

OBJECTIF DU TRAVAIL DE THESE

L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre la fonctionnalité de la chimiokine CCL18 en situation physiologique et en pathologie allergique. Des approches *in vitro* et *in vivo* ont été utilisées pour permettre une meilleure compréhension de la fonction de cette chimiokine. Ce travail était articulé autour de quatre parties. La première a concerné l'étude des effets immunobiologiques de CCL18 sur la réponse adaptative en agissant sur les lymphocytes T. La seconde partie est plus en amont, elle a évalué l'effet de CCL18 sur l'immunité innée (cellule dendritique) et l'établissement de la réponse adaptative consécutive. Le troisième axe a étudié la fonction chimiotactique *in vitro* et *in vivo* de CCL18 vis-à-vis d'une sous population de cellules régulatrices. Enfin, pour permettre la caractérisation du rôle de CCL18 sur l'inflammation pulmonaire et la fonction respiratoire, un modèle murin d'asthme expérimental avec administrations intratrachéales de la chimiokine a été utilisé. La vocation de ce travail de thèse était donc, en mettant à jour ces mécanismes, d'évaluer le potentiel thérapeutique de CCL18 pour permettre le développement de traitements plus ciblés notamment des affections allergiques.

Article I

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

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

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

Problématique et approche expérimentale

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

Résultats de l'article

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

Conclusions

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

Article II

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

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

Blood in press.

Problématique et approche expérimentale

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

Résultats de l'article

La différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-CSF et CCL18 conduit au développement de DC de phénotype semi-mature, expriment le CCR7, produisant de l'IL10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygenase et induisant le développent de Lc T régulateurs de type Tr1 produisant de l'IL-10 capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs, par un mécanisme dépendant de cytokine. De même que pour l'effet sur les Lc T, lorsque les monocytes proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu en liaison avec une diminution de la fixation de CCL18 à son récepteur putatif.

Conclusions

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

Figure S1

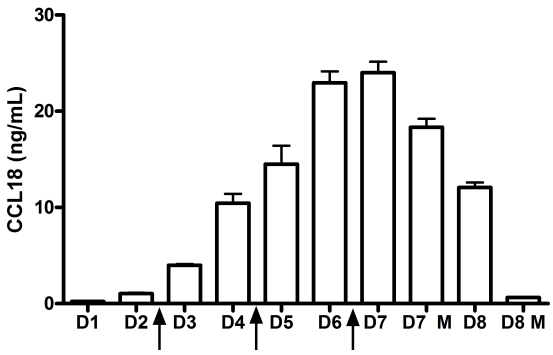


Fig S1 : monocytes from non allergic subjects were differentiated with GM-CSF and IL-4 and washed every two days (arrows). At Day 7 DC were matured (D7M and D8M) or not (D7,D8). CCL18 was assessed in the collected supernatants at each timepoint by ELISA and expressed as ng/mL

Figure S2

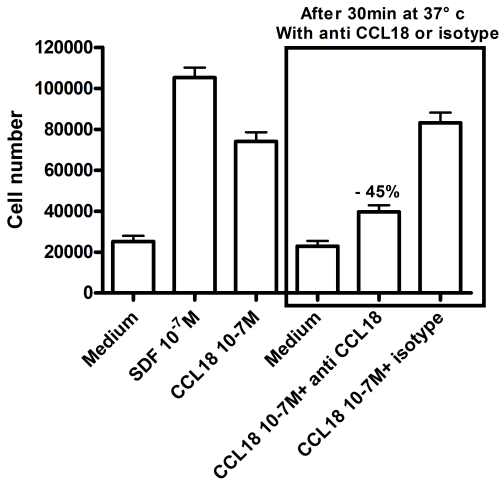


Fig S2: Naive T cells were purified using naive CD4+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). T cells were suspended at a concentration of 10^6 cells/ml in RPMI 1640. The chemotaxis protocol was performed using a 48-well micro chemotaxis Boyden chamber (Neuro Probe, Cabin John, Md) with 5µm pore polycarbonate filters (Nucleopore Corp, Pleasanton, CA). T cells were incubated for 2h30 at 37℃ in 5% CO2 with CCL18 (R&D Systems, Minneapo lis, USA) at 10^{-7} mol/L. RPMI and CXCL12 (PeproTech Inc, Rocky Hill, USA) at 10^{-7} M were used as negative and positive controls, respectively. Naive T cells were pre treated or not with the neutralizing anti-CCL18 antibody or a control isotype for 30 minutes before migration. Each condition was performed in triplicate. Results are expressed as the number of cells having migrated through the filter.

Figure S3

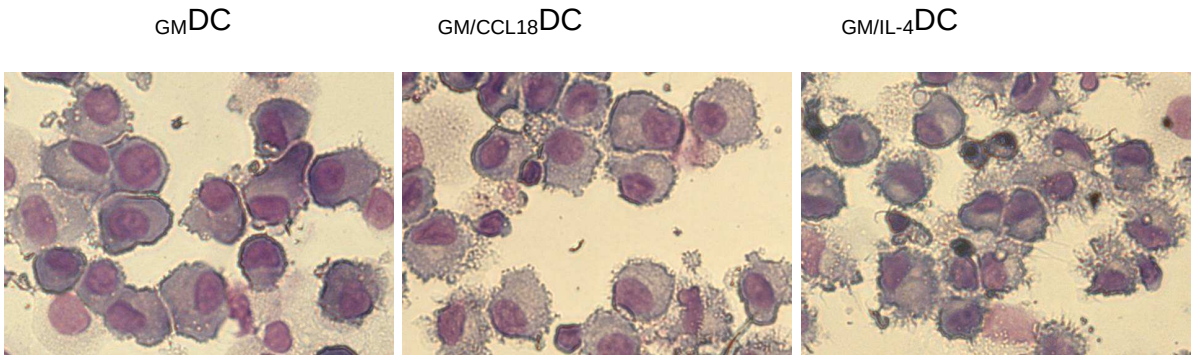


Fig S3: Monocytes from a non allergic subject were differentiated in the presence of GM-CSF alone, GM-CSF + CCL18 or GM-CSF + IL-4 for 6 days, and matured for 48 hours. Cells were cytocentrifuged using a shandon cytospin and stained by May Grumwald Giemsa. Magnification x 250.

Figure S4

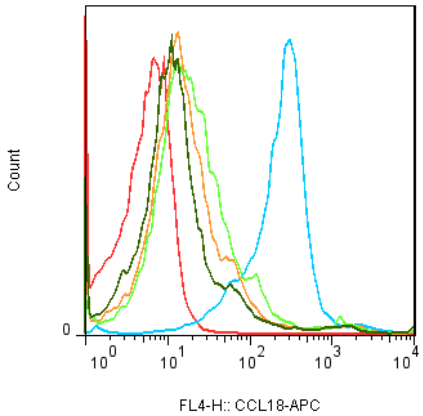


Fig S4: Naive T cells were purified using naive CD4+ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). T cells were incubated at +4℃ with non labelled CCL18 at 1 0^{-5}M (**black line**) 10^{-6}M (**orange line**) 10^{-7}M (**green line**) or without CCL18 (**Blue line**), washed incubated with biotinylated CCL18 at 10^{-7}M or a control biotinylated protein (**red line**), and then with streptavidin -APC. Fluorescence intensity was evaluated by flow cytometry

Figure S5

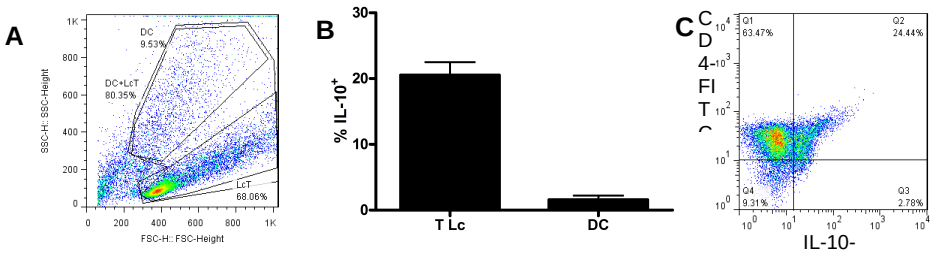


Fig S5: $_{GM/CCL18}$DCs obtained from 3 non allergic subjects were cocultured with allogenic naive T cells for 5 days. Total cells were recovered and extra cellularly stained with CD4-FITC antibody and intra cellularly with an anti-IL-10 antibody (BD pharmingen) according to the manufacturer protocol. **A)** Cells were gated on their forward and side scatter properties, and on CD4 expression. **B)** Quantative percentage of T cells and of DCs expressing IL-10. **C)** Representative experiment out of 3 showing IL-10 expression by cocultured CD4+ T cells

Article III

La chimiokine pulmonaire CCL18 recrute des cellules T régulatrices.

Cécile Chenivesse, Ying Chang, **Imane Azzaoui**, Saliha Ait Yahia, Olivier Morales, Coline Plé, Arnaud Foussat, André-Bernard Tonnel, Hans Yssel, Han Vorng, Benoit Wallaert, and Anne Tsicopoulos.

The Journal of Immunology, en révision.

Problématique et approche expérimentale

Le CCL18 présente des caractéristiques pro et anti inflammatoires. Cette chimiokine est exprimée de façon constitutive et inductible par les CPA et présente une activité chimiotactique vis-à-vis des cellules T auxiliaires et cytotoxiques, ainsi que des MDDC immatures. Concernant les Lc T, CCL18 recrute préférentiellement des cellules T naïves, des cellules Th2 et des cellules T mémoire à domiciliation cutanée CLA. Néanmoins, CCL18 présente des caractéristiques qui laisseraient penser à une implication dans l'homéostasie et la tolérance. En effet, cette chimiokine est induite en phase tardive de l'inflammation et est augmentée par la cytokine immunosuppressive IL-10. De plus, l'association de Lc T naïfs et de DC immatures peut générer une réponse régulatrice. De surcroit, nous avons récemment montré que le CCL18 transforme les Lc T mémoires en Treg. Nous avons posé l'hypothèse que le CCL18 pourrait recruter localement des cellules T régulatrices.

Résultats de l'article

Le CCL18 attire en particulier certaines sous populations de Lc T mémoires régulatrices à savoir les $CD25^{high}CD127^{low}$ LAP/TGF-$\beta1^{+}$ $FOXP3^{-}$ $CCR4^{+}$, des cellules capables de produire les cytokines régulatrices IL-10 et TGF-β1, de même que l'IL-4 et qui sont capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs $CD4^{+}CD25^{-}$ par un mécanisme IL-10 dépendant. Dans un modèle de greffe de peau humaine chez des souris SCID reconstituées avec des PBMC autologues, les injections intra dermique du CCL18 conduit à un recrutement cutané de cellules $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, IL-10^{+}, $FOXP3^{-}$. Le CCL18 se lie préférentiellement sur les Lc T mémoire IL-10^{+}, mais aussi sur les cellules mémoire LAP/TGF-$\beta1^{+}$ et les IL-4^{+}.

Conclusions

Cette étude montre que le CCL18 attire une sous population de Lc T régulateurs, *in vitro* et *in vivo*, ce qui suggère que cette chimiokine pourrait participer au maintien de la tolérance et/ou le contrôle de l'inflammation dans les tissus.

Title: The Pulmonary Chemokine CCL18 Recruits Human Regulatory T Cells

Cécile Chenivesse*†‡§¶, Ying Chang*†‡§, **Imane Azzoui***†‡§, Saliha Ait Yahia*†‡§, Olivier Morales||, Coline Plé*†‡§, Arnaud Foussat#, André-Bernard Tonnel*†‡§¶, Hans Yssel**, Han Vorng*†‡§, Benoit Wallaert*†‡§¶, Anne Tsicopoulos*†‡§¶.

*Pulmonary Immunity, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, U1019, F-59019, Lille, France ; †Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille, F-59019, Lille, France ; ‡CNRS UMR 8204, F-59000, Lille, France ; §Univ Lille Nord de France, F-59000, Lille, France; ¶Clinique des Maladies Respiratoires et Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille, France ; ||UMR 8527, CNRS, Institut de Biologie, Lille, France ; #Txcell, Valbonne, France ; **INSERM Unité 844, Montpellier, France

Abstract

CCL18 is both a constitutive and inducible chemokine, whose role in inflammatory reaction is poorly known. Clues for both a proinflammatory and regulatory action are found in the literature. The aim of this study was to evaluate if CCL18 was able to attract T cells with a regulatory function (Treg). Chemotaxis assays performed on different types of Treg showed that $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$ cells, but not Tr1 clones or anti-CD3/CD46 differentiated Treg, were dose dependently recruited by CCL18. In transwells experiments, CCL18-recruited memory $CD4^{+}$ T cells were enriched in $CD25^{high}$, $CD25^{high}CD127^{low}$, LAP/TGF-β1 and CCR4 positive T cells, whereas there was no enrichment in $Foxp3^{+}$ cells as compared with controls. Stimulated CCL18-recruited memory T cells exhibited a significant increase in the production of the regulatory cytokines IL-10 and TGF-β1, as well as in IL-4, but not in IFN-γ and IL-17. Cell surface CCL18 binding was found predominantly on $IL\text{-}10^{+}$ (26.3 ± 5.8 %), but also on $LAP/TGF\text{-}\beta1^{+}$ (15.3 ± 0.8 %) and $IL\text{-}4^{+}$ (14.5 ± 2.9 %) memory T cells. In an in vivo model of SCID mice grafted with human skin and reconstituted with autologous PBMC, the intradermal injection of CCL18 led to the cutaneous recruitment of $CD4^{+}$, $CD25^{+}$, $IL\text{-}4^{+}$, $IL\text{-}10^{+}$ but not $Foxp3^{+}$ cells. Furthermore, CCL18-recruited memory T cells inhibited the proliferation of $CD4^{+}CD25^{-}$ effector T cells through an IL-10-dependent mechanism. These data suggest that CCL18 may contribute to maintain tolerance and/or suppress deleterious inflammation by attracting Treg into tissues, particularly in the lung where it is highly and constitutively expressed.

Introduction

Two main subsets of regulatory T cells (Treg) have been described, natural and adaptive/induced Treg, that seem to differ in their development, antigen specificities and mechanism of action. Expression of the transcription factor Foxp3 is a defining feature of thymic-derived natural Treg (1). The phenotypic characteristics of natural Treg include constitutive expression of IL-2 receptor-α (CD25) (2) and of the T cell activation marker CTLA-4 (3). The suppressive function of natural Treg seems to require only cell-cell contact or proximity *in vitro*, whereas aspects of the *in vivo* function of natural Treg depend on the secretion of IL-10 and TGF-β (4, 5). Adaptive Treg include Foxp3$^+$ cells that develop extrathymically and share most phenotypic and functional features with natural Treg (6), as well as Foxp3$^-$ cells that seem to exert their regulatory activity mainly by means of secreted cytokines such as IL-10 or TGF-β, the best characterized being T regulatory type 1 cells (Tr1 cells) (7). The expression of specific chemokine receptors by Treg has been linked to the control of their migration into tissues and may reflect functional heterogeneity among Treg subsets that localize to distinct tissue environment (8). Some chemokine receptors have been shown to be preferentially expressed on human Treg, such as CCR4 and CCR8 (9-12), however the homing properties of human Treg are still poorly understood.

The chemokine CCL18 displays characteristic features of inflammatory chemokines. Its production is induced by infectious agents (13) and allergens (14) and is regulated by inflammatory cytokines, i.e. up-regulated by IL-4 and IL-13 and down-regulated by IFN-γ *in vitro* (15). Moreover, CCL18 attracts memory T cells, Th2 cells and basophils, all involved in the Th2 immune response (14, 15). *In vivo*, CCL18 is overexpressed in numerous inflammatory disorders of skin, lung and joints (16). Hitherto, it has been difficult to assess CCL18 functionality, because CCL18 receptor(s) is still unknown and because there is no murine orthologue of this chemokine (17). However, since CCL18 has been discovered, the idea has emerged that it may be implicated in homeostasis and immune tolerance. Indeed, CCL18 is spontaneously produced by antigen presenting cells, including monocytes/macrophages *in vitro* (18), and lung macrophages and lymph node dendritic cells *in vivo* (19). Furthermore, it is up-regulated by the suppressive cytokine IL-10 (15). In addition, CCL18 attracts naïve CD4$^+$ T lymphocytes (20) as well as immature monocyte-derived dendritic cells (21) both involved in tolerogenic immune responses. Moreover, CCL18 has been recently shown to convert effector memory T cells into Treg cells (22). As the main function of chemokines consists of activating cell

migration, we hypothesized that CCL18 may activate migration of regulatory T cells (Treg). We show here that CCL18 is able to attract a particular subset of Treg $CD25^{high}CD127^{low}$, LAP/TGF-$\beta1^{+}$, $Foxp3^{-}$, acting through the production of IL-10.

Materials and Methods

Isolation of memory $CD4^{+}$ T cells and culture

Venous blood provided by Etablissement Français du Sang was obtained from 36 healthy subjects. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from venous blood by density gradient centrifugation over Ficoll/Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Human $CD4^{+}$ and $CD4^{+}CD45RO^{+}$ cells were isolated from PBMC by negative selection over a MACS column using $CD4^{+}$ and memory $CD4^{+}$ T cell isolation kits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) with a purity of 96-98%. Memory $CD4^{+}$ cells (10^{6} cells/mL) were rested overnight after purification in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 10% FCS.

Flow cytometry sorting of T cell subsets

PBMC were isolated from peripheral blood as described above and $CD4^{+}CD45RO^{+}$ T cells were purified by magnetic separation (Miltenyi Biotec). Cells were further stained with anti-CD4–FITC (BD Pharmingen) and anti-CD25–PE (BD Pharmingen) or anti-CCR4-PE (BD Pharmingen), and CD127-APC (BD Pharmingen) for 30 minutes on ice, washed in PBS/2% BSA, filtered, and then sorted by flow cytometry (FACS Aria, BD Biosciences, San Jose, USA). Memory $CD4^{+}CD25^{-}$, $CD4^{+}CD25^{high}$, $CD4^{+}CCR4^{+,}$ $CD4^{+}CCR4^{-}$, $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}$ T cell purity was more than 96%.

Generation of anti-CD3/CD46 regulatory T cells and culture of Tr1 clones

Purified $CD4^{+}$ T cells were stimulated (2 x 10^{5} cells/well) with 10μg/ml coated anti-CD3 mAb (OKT3 clone) and 5μg/ml anti-CD46 mAb, a kind gift of Dr C Kemper in 96-well, flat-bottom microculture plates (BD, Franklin Lakes, USA) and were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mmol/L glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin, 10% FCS, and 10ng/ml rhIL-2 (Tebu, Le Perray en Yvelines, France) for 3 days and assessed in chemotaxis assays. Two sources of human Tr1 clones were used. The first ones were generated from skin delayed-type hypersensitivity reactions, induced in healthy human volunteers after an initial sensitization and a subsequent challenge with

2,4 dinitrochlorobenzene, as previously described (23). The second ones were OVA specific clones generated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors with Crohn disease, which were cultured in the presence of native OVA in X-Vivo 15 (Cambrex, East Rutherford, NJ) and cytokine-enriched *Drosophila* feeder cells as previously described (24).

Chemotaxis and transwell migration

The different T cell populations were harvested and suspended at a concentration of 10^6 cells/ml in RPMI 1640. The chemotaxis protocol was performed as previously described (25) using a 48-well micro chemotaxis Boyden chamber (Neuro Probe, Cabin John, Md) with 5µm pore polycarbonate filters (Nucleopore Corp, Pleasanton, CA) for 2h30 at 37°C in 5%CO2 with CCL18 (R&D Systems, Minneapolis, USA) at concentrations ranging from 10^{-7} mol/L to 10^{-11} mol/L. RPMI and CXCL12 (PeproTech Inc, Rocky Hill, USA) at 10^{-7} M were used as negative and positive controls respectively. Each condition was performed in triplicate. Cells having migrated through the filter were counted in the inferior well, and results were expressed as index of chemotaxis compared with medium. In order to recover memory T cells responding to CCL18, transwells with 5µm pore polycarbonate filters (Costar, Cambridge, MA) were used. T cells were suspended in RPMI at a concentration of $2x10^6$ cells/mL and incubated 2h30 at 37°C in 5%CO_2. RPMI and CXCL12 were used as controls. Transmigrated memory T cells were recovered in the inferior compartment, and stimulated or not (10^5 cells/well) with 10µg/ml coated anti-CD3 mAb (OKT3 clone) and 2µg/ml soluble anti-CD28 mAb (BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA) in 96-well, flat-bottom microculture plates (BD, Franklin Lakes, USA). As baseline cells, non migrated purified memory T cells were also stimulated in the same conditions. After 3 days of stimulation, the culture supernatants and cells were harvested for further experiments.

Quantification of the cytokine profile

Concentrations of IL-4, IL-10, IFN-γ (Diaclone Research, Besançon, France), IL-17 and TGF-β1 (R&D Systems Inc, Minneapolis, USA) in cell culture supernatants were measured by ELISA, according to the manufacturer's recommendations. The level of sensitivity was 1.1 pg/mL for IL-4, 12.5 pg/mL for IL-10 and IFN-γ, 15.6 pg/mL for IL-17 and TGF-β1. Results were expressed as percentage increase of non migrated memory T cells.

Flow cytometry phenotype analysis

The phenotypes related to regulatory T cells were evaluated by flow cytometry using a standardized protocol as previously described (26). For the extracellular markers, cells were stained with anti-CD25-PE, anti CD127-APC (both from BD Pharmingen), anti-CD103-FITC (Beckman Coulter, Fullerton, USA), anti-CTLA-4-FITC, anti-CCR4-PE (both from R&D) and biotinylated latency-associated peptide (LAP) of TGF-ß1 (R&D) followed by streptavidin-PE, or LAP/TGF-β1-PE for double staining (R&D). For the intracellular marker, cells were labeled by using anti-human Foxp3-FITC staining set (eBioscience, San Diego, USA), according to the manufacturer's recommendations. For CCL18 receptor expression, cells were labeled with biotin conjugated CCL18 (Sigma, Steinheim, Germany) followed by streptavidin-APC (R&D). As a control we used a small molecular weight protein derived from *Plasmodium falciparum,* a kind gift of Dr S Tomavo. The complete open reading frame of a gene encoding the *P. falciparum* TAF10 homolog (27) was cloned in-frame into the pGEX-6P-3 (Amersham, Uppsala, Sweden). The GST was removed from the recombinant protein using preScission protease and glutathione-Sepharose 4B column according to manufacturer's instructions (Amersham). The purified *P. falciparum* TAF10 was subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining and then labelled using a biotinylation kit (Sigma). For double extracellular CCL18R and intracellular cytokine expression, cells were stimulated for 24h by PMA at 50ng/ml and ionomycin at 1ug/ml. Brefeldine was added the last 4h of the culture. Cells were stained for CCL18R as described above, then permeabilized using the Cytofix/Cytoperm BD Pharmingen kit according to the manufacturer's recommendations, and then labelled using anti-IL-4-PE and anti IL-10-PE (BD Pharmingen).

Real-time quantitative RT-PCR

After removal of the supernatants, the transmigrated memory $CD4^+$ T cells were suspended in TRI Reagent® (Ambion, Austin, USA), and total RNA was extracted according to the manufacturer's procedure. Reverse transcription was performed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). The cDNA was amplified in triplicate by real-time PCR using the SYBR Green PCR kit (Applied Biosystems). The amount of Foxp3 mRNA expression was normalized to β-actin and calculated according to the comparative δδCt method. Primer pairs were as follows: Foxp3, 5'-GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC-3' and 5'-ATGGCCCAGCGGATGAG-3'; β-actin, 5'-TCCTCACCCTGAAGTACCCCA -3' and

5’-AGCCACACGCAGCTCATT GT -3’.

Proliferation suppression assays

Flow cytometry sorted $CD4^+CD25^-$ T cells (5×10^4/well) were stimulated in triplicate wells with soluble anti-CD3 mAb (10ng/mL) and anti-CD28 mAb (10ng/mL) (BD Pharmingen) in 96-well round-bottom plates (Corning Costar, Corning, USA), in the absence or presence of CCL18- recruited $CD4^+CD45RO^+$ T cells at suppressor/responder ratios of 1:4, 1:2 and 1:1. Irradiated (5000 rads) autologous PBMC were used as APCs (5×10^4/well). Purified sorted $CD4^+CD25^{high}$ cells were used as positive control of T cell suppression and medium- and CXCL12-recruited $CD4^+CD45RO^+$ T cells as negative controls of T cell suppression. Proliferation was measured in triplicates after [methyl-^{3}H]-Thymidine (^{3}H-TdR) (1µCi/well) (GE Healthcare, Bucks, UK) incorporation for the last 18h. Cultured cells were harvested on glass fibre filter (Printed Filtermat A, Wallac, Finland) using the harvester (Tomtec, Wallac, Turku, Finland) and sealed in a sample bag after drying and the addition of scintillation liquid (Beckman Coulter, Fullerton, USA). Incorporated radioactive thymidine was detected by scintillation counting using a 1450 Trilux β-counter (Wallac, Turku, Finland), and estimated in count per minute (cpm). Results were expressed as percentage of proliferation ± SEM of $CD4^+CD25^-$ effector cells alone. In some experiments, 1µg/mL neutralizing anti-IL-10 (R&D) 1µg/mL neutralizing anti-TGFβ (R&D) or 1µg/mL isotype antibody was added to the cultures. To investigate a contact-dependent mechanism, $CD4^+CD25^-$ T cells were separated from $CD4^+CD45RO^+$ T cells recruited by CCL18 by using a 96 transwell plate with 0.4 µm polycarbonate membrane (Corning, Avon, France).

In vivo model of SCID mouse grafted with human skin

Skin from human donors was obtained from thorax surgery in which skin was discarded. Skin was kept in sterile normal saline with added penicillin and streptomycin and transplanted onto SCID mice within 2 h after harvesting. Blood from the same donors was collected on heparin 6 weeks after surgery. The protocol was approved by the Centre Hospitalier Régional et Universitaire ethical committee (n° 96102). All donors signed an informed consent form according to the declaration of Helsinki protocols.

Inbred mice with severe combined immunodeficiency (CB-17 SCID mice) were obtained from breeding pairs originally provided by M. Lieberman (Stanford University, Stanford, CA) maintained at the Institute Pasteur of Lille in sterilized isolators. Leaky mice

(displaying spontaneous IgG production after 6 weeks of age) were discarded. Mice were housed under pathogen-free conditions. Animals were handled according to the ethical principles of animal experimentation established by the European Center of Tufts University.

Skin grafting was performed as described previously (28, 29). Briefly, after anesthesia, 6- to 8-week-old mice were prepared for grafting by shaving the hair from a 5-cm^2 area on each side of the lateral abdominal region. Two circular graft beds, approximately 1.5 cm diameter, were prepared by removing shaved mouse skin. Full thickness human skin grafts of the same size were placed onto wound beds. The use of two skin grafts per mouse allowed each mouse to be its own control. The transplants were held in place using 6/0 silk suture material and covered with an adhesive wound dressing and then with a standard bandage. Dressing material and sutures were removed 10 days after transplantation.

Six weeks after human skin transplantation, anti-asialo GM1 (1/20 dilution, Wako, Osaka, Japan) was injected intraperitoneally to neutralize murine NK activity. Twenty-four hours later, SCID mice were reconstituted intraperitoneally with 20 x 10^6 autologous PBMC purified from the donor's blood and suspended in PBS. The use of mononuclear cells and skin specimens obtained from the same human donor for each group of mice was of importance in this SCID mouse model, because it avoided allogenic reactions during the reconstitution phase. Recombinant human chemokine CCL18 at a dose of 2.5µg with 5% Evans blue dye (Sigma) to mark the site of injection was then immediately injected in one of the two skin grafts. On the opposite site, skin graft was injected with a diluent containing an equivalent amount of BSA and 5% Evans blue dye to serve as control. Twenty-four hours later, human skin biopsies were performed at the site of injection marked by Evans blue dye using a cylindrical sterile punch and cut into two halves. One half was immediately embedded in OCT compound (Labonord, Villeneuve d'Ascq, France), snap-frozen in isopentane precooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C. The other half was fixed in 4% paraformaldehyde, washed in 15% PBS/sucrose before OCT embedding, freezing, and storage at -80°C.

Immunohistochemistry

Cryostat sections (6µm) of PFA-fixed tissues were cut, air dried, and wrapped in aluminium foil and stored at -20°C for immunohistochemistry. Anti-human CD45, CD25 (interleukin-2 receptor chain α), and CD4 antibodies were purchased from Becton

Dickinson (San Jose, California). Anti-human CD45RO and CD45RA were from Dako (Glostrup, Denmark), anti human Foxp3 was from Abcam (Cambridge, UK), anti-human IL-4, IL-5 and IL-10 were from Pharmingen (San Diego, CA), and anti-human IFN-γ antibody was from Ibt (Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands). Fast Red (Fast Red/naphtol ASMX tablets) was from Sigma, St Quentin Fallavier, France. For all antibodies except anti-human IL-4, IL-5 and Il-10 antibodies, immunochemistry was performed using a modified Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase method as previously described (26). Briefly, PFA-fixed cryostat sections were incubated in 0.3% Triton X-100 for 20 minutes, washed in Tris-buffered saline and incubated with the primary antibody overnight at $^{+}$4°C, and successively incubated 30 min with rabbit anti-mouse Ig and then monoclonal alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase antibodies, both from Dako diluted in 20% normal human AB^{+} serum. The coloration was developed using Fast Red and sections were counterstained using hematoxylin. Irrelevant primary antibody of the same species was used as negative control. For IL-4, IL-5 and IL-10, immunohistochemistry was performed by using a modified avidine complex method, as previously described (14). Briefly, PFA-fixed sections were incubated in 0.3% Triton X-100 for 20 min and with PBS containing 1% hydrogen peroxide. Endogenous biotin was quenched by using a Vector Laboratory kit (Peterborough, UK). Sections were preincubated with rabbit serum and incubated overnight with the anti-cytokine antibodies in PBS containing 0.1% saponin (Sigma). Sections were treated with the ABC Vectastain Elite kit (Vector) and the color developed by using diaminobenzidine tetrahydrochloride-nickel (Vector). Substitution of the primary antibody with an irrelevant antibody of the same species was used as a negative control. Anti-human antibodies displayed no cross-reactivity with murine structures, as verified by immunohistochemistry on cryostat sections from biopsies performed at the border between human and murine tissue. Slides were encoded and counted in a blinded fashion at x 250 magnification using an eyepiece graticule. For skin sections, the upper edge of the grid was placed at the epidermal junction. For each specimen, at least three sections were evaluated, from which 3 to 6 fields were counted for immunohistochemistry. Absolute numbers of positive cells were counted per mm2.

Statistical analysis

Statistical analysis was first performed within the subgroups by using one way analysis of variance tests and, when significant, followed by post hoc multiple comparison tests. *p* values of less than 0.05 were considered as statistically significant. Statistical analysis

was performed using the Graphpad prism 4 software (GraphPad Software, La Jolla).

Results

CCL18 attracts human $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ regulatory T cells but not Tr1 clones *in vitro*

To investigate whether CCL18 can attract human Treg, chemotaxis assays were performed on different models of human Treg at different concentrations of CCL18 ranging from 10^{-11} to 10^{-7} M. The constitutive expression of CD25 on $CD4^+$ T cells is a marker of Treg (2), although this receptor is also transiently up-regulated by activated effector T cells. A low expression of IL-7 receptor CD127 has been shown to discriminate $CD4^+CD25^+$ Treg from activated effector $CD4^+CD25^+$ T cells (30). Therefore, highly purified flow cytometry sorted memory $CD4^+CD25^{high}$ and $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg were assessed, as well as polarized Tr1 type cells, i.e. *in vitro* anti-CD3/CD46 polarized IL-10 secreting Treg (31) and IL-10 producing Tr1 clones. For flow cytometry sorting, purified memory $CD45RO^+$ T cells were used in order to discard naïve T cells, which are strongly attracted by CCL18, and because most Treg are memory cells. For $CD4^+CD25^{high}$ and $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ cells, we used $CD4^+CD25^-$ and $CD4^+CD25^-CD127^+$ cells as negative controls respectively. As shown in Fig. 1A and 1B, sorted $CD4^+CD25^{high}$ and $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ cells dose-dependently migrated in response to CCL18 with a maximal effect at 10^{-7}M and 10^{-8}M, whereas control cells did not. In contrast, polarized Treg were not attracted by CCL18 either at 24 or 48h of differentiation (Fig 1C). To assess more physiological Tr1 type cells, clones derived from skin and PBMC were evaluated in chemotaxis assays. However, as for the differentiated cells, CCL18 was not able to attract such cells either in a resting state or after antiCD3/CD28 stimulation (data not shown). It has been shown that human Treg can preferentially express the chemokine receptors CCR4 and CCR8 (9-12). Therefore, the migration of sorted memory $CD4^+CCR4^+$ cells in response to CCL18 was also assessed. As shown in figure 1D, $CD4^+CCR4^+$ were dose-dependently attracted by CCL18 with a maximal effect at 10^{-7} M. We were unable to evaluate the attraction of $CD4^+CCR8^+$ cells by CCL18 because of the lack of specificity of the commercially available anti-CCR8 antibodies, which did not allow cell sorting, at least in our hands. Altogether, these findings suggest that CCL18 attracts memory T cells expressing CCR4 and highly purified $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ Treg but not Tr1 clones.

Human memory CD4$^+$ T cells attracted by CCL18 *in vitro* display some phenotypic characteristics of regulatory T cells but do not express Foxp3

To assess if CCL18 was able to preferentially recruit regulatory T cells in a competitive T cell environment, we performed experiments the other way around, i.e. evaluated the phenotype of T cells attracted by CCL18 among non selected memory T cells. For this purpose, CD4$^+$CD45RO$^+$ T cells were isolated by magnetic cell separation and allowed to migrate in a transwell system in response to 10^{-11}, 10^{-9}, and 10^{-7} M CCL18 or controls (medium and CXCL12 at 10^{-7} M). After 2h30, cells were harvested from the lower compartment. As previously described (20), a moderate but significant and dose-dependent attraction of memory CD4$^+$ T cells by CCL18 was obtained (43,2 ± 5,7% increase at CCL18 10^{-7} M as compared with medium, $p< 0.001$), which was more important for CXCL12 (226 ± 44% increase) (data not shown). The harvested cells were allowed to recover for 24h before flow cytometry phenotyping. As baseline, memory T cells maintained in the same conditions but not allowed to migrate were used. Even though there is no clear specific cell surface marker of Treg, some markers have been shown to be preferentially expressed on human Treg in particular CD25^{high} (2), CD25^{high}CD127^{low} (30), LAP/TGF-β1 (32), CD103 (αEβ7 integrin) (33) and CTLA-4 (3). As shown in Fig. 2A, in memory CD4$^+$ cells recruited by CCL18 at 10^{-7} M and 10^{-9} M as compared with baseline level before migration, there was a small but significant increased percentage of cells expressing CD25^{high} (5.35 ± 1.1% and 4.69 ± 0.86% versus 3.91 ± 0.63% respectively), CD25^{high}CD127^{low} (6.9 ± 1.7% and 5.67 ± 0.56% versus 4.73 ± 0.9%), and LAP/TGF-ß1 (6.34 ± 1.9% and 5.88 ± 1.37% versus 2.87 ± 0.45%), corresponding to approximately 30% enrichment for the two first populations and 100% for the last one. Memory T cells recruited by medium and CXCL12 at 10^{-7} M were not enriched in these populations. In contrast, there was no differential expression of the surface markers CD103 and CTLA-4 (Fig 2B). Although there was no elevation of the number of CD4$^+$CCR4$^+$ T cells (data not shown), we observed a strong up-regulation of CCR4 mean fluorescence intensity (MFI) in the CCL18-recruited cells population, suggesting a preferential recruitment highly expressing CCR4 cells (504.4 ± 182.3 MFI for CCL18 at 10^{-9}M compared with baseline (214.1 ± 62.4 MFI) (Fig. 2B). As another readout of Treg, the T cell transcription factor Foxp3, was assessed by intracellular staining. However, as shown in Fig. 2C, there was no increase in the percentage of CD4$^+$CD25^{high}Foxp3$^+$ cells, whatever the attracting molecule. To confirm these data, mRNA expression for Foxp3 was evaluated by Q-RT-PCR. As at the protein level, Foxp3

mRNA was not increased in CCL18-recruited cells (data not shown). Although CCL18 putative receptor(s) (CCL18R) remains unknown, we checked its expression by flow cytometry on memory $CD4^{+}CD25^{high}$ cells using a biotinylated ligand. As shown in figure 2D, only few memory $CD4^{+}CD25^{-}$ T cells bound CCL18 (4.28 ± 0.72 %), whereas the percentage of CCL18 binding cells was doubled in $CD4^{+}CD25^{high}$ cells (8.25 ± 1.4%). Thus, CCL18-recruited memory $CD4^{+}$ T cells display some characteristics of Treg, i.e. high expression of CD25 and LAP/TGF-ß1, low expression of CD127, but no expression of Foxp3.

Human memory $CD4^{+}$ T cells attracted by CCL18 *in vitro* produce IL-10 and TGF-β1 upon activation

To evaluate the polarization profile of memory T cells recruited by CCL18, cytokine production was examined. The same transwell system described above was used, the recovered cells were stimulated by anti CD3/CD28 antibodies for 3 days and the supernatants harvested and analyzed for IL-4, IFN-γ, IL-10, TGF-β1, and IL-17 production by ELISA. As baseline, memory T cells stimulated in the same conditions but having not migrated were used. As compared with this baseline, memory T cells non specifically recruited in response to culture medium, exhibited a general 50% increase in their cytokine production, showing that transmigration non specifically activated these cells (Fig. 3A). Cells recruited by CXCL12 exhibited an increased production of IL-4, IL-10 and IL-17 as compared with medium, consistent with the ubiquitous chemoattractant effect of CXCL12 on diverse T cell subpopulations. In contrast, memory T cells recruited in response to CCL18 exhibited a significant increase of regulatory cytokines, i.e. IL-10 and TGF-β1 at the highest concentration of CCL18 (respectively 169.2 ± 75.1 and 122 ± 27.4% increase). IL-4 producing cells were also more attracted by CCL18 at 10^{-9} M concentration (161.9 ± 44.4% increase), although to a lesser extent than for CXCL12 (284.9 ± 76.9% increase), whereas no significant difference was observed for IFN-γ and IL-17 producing cells. In order to evaluate the proportion of cells expressing CCL18R in IL-10 and IL-4 producing cells double immunostaining was performed on baseline memory $CD4^{+}$ T cells stimulated with PMA and ionomycin and evaluated by flow cytometry. Double immunostaining was also performed for cell surface CCL18R and LAP/TGF-β1 on non stimulated memory T cells. Representative dot plots of double immunostaining are shown in figure 3B, along with the individual percentages of CCL18R found among IL-4, IL-10, and LAP/TGF-β1 positive cells in 5-6 subjects. The

mean percentage of CCL18R$^+$ cells was 14.5 ± 2.9 in IL-4$^+$ cells, 26.3 ± 5.8 in IL-10$^+$ cells, and 15.3 ± 0.8 % in LAP/TGF-β1$^+$ cells.

These data show that besides the known chemoattraction of Th2 cells (14), CCL18 also recruits cells able to produce immunosuppressive cytokines.

Human CD4$^+$ T cells attracted by CCL18 in vivo express CD25 but not Foxp3 and produce IL-10

In order to confirm the phenotype of CCL18-recruited CD4$^+$ T cells *in vivo,* we used a humanized model consisting in a SCID mouse model grafted with human skin and reconstituted with autologous mononuclear cells. CCL18, as well as its diluent, were injected into the skin grafts and biopsies were performed 24 hours later and analyzed by immunohistochemistry. First, the cell infiltrate generated by the injection of CCL18 was assessed as compared with the control diluent. T cells recruited by CCL18 included naïve (CD45RA$^+$), memory (CD45RO$^+$) (Fig. 4A) and CD4$^+$ T cells whereas CD8$^+$ T cells were not found (data not shown). Consistent with the *in vitro* findings, the CD25 marker was up-regulated in CCL18-injected graft, whereas no Foxp3 positive cells were evidenced (Fig.4A). Next, we examined the cytokine profile expression of CCL18-injected grafts and found an elevated percentage of IL-4$^+$ and IL-10$^+$ cells in comparison with the diluent-injected site (Fig. 4B). In contrast, no increased immunostaining was observed for IL-5 and IFN-γ. Examples of immunostaining are shown in Fig 5. These results confirm the ability of CCL18 to recruit *in vivo* CD4$^+$ T cells having a phenotype compatible with a regulatory function.

Human memory CD4$^+$ T cells attracted by CCL18 suppress T cell proliferation through an IL-10-dependent mechanism

To definitively assess if the cells recruited by CCL18 were truly regulatory cells, functional assays were performed. The ability of *in vitro* CCL18-recruited memory CD4$^+$ T cells to suppress effector CD4$^+$CD25$^-$ T cell proliferation was evaluated. Highly purified flow cytometry sorted CD4$^+$CD25$^+$ and CD4$^+$CD25$^-$ T cells, as well as memory CD4$^+$ T cells recruited by medium, CXCL12 or CCL18 were added at increasing ratio to a fixed number of irradiated PBMC and autologous CD4$^+$CD25$^-$ effector cells stimulated with soluble anti-CD3 and CD28 antibodies. The addition of CD4$^+$CD25$^-$ effector cells (negative control) resulted in increased T cell proliferation whereas the addition of CD4$^+$CD25^{high} Treg (positive control) resulted in a ratio-dependent suppression of proliferation (60.25% inhibition at 1:1 ratio) (Fig. 6A). Addition of memory CD4$^+$CD25$^-$

T cells recruited by medium or CXCL12 did not significantly suppress T cell proliferation compared with the negative control. In contrast, addition of CCL18-recruited memory $CD4^+$ T cells significantly suppressed proliferation compared with the negative control (42.7% inhibition at a 1:1 ratio) (Fig. 6A). Two main mechanisms are demonstrated to contribute to Treg suppression, cell contact and soluble inhibitory molecules, such as IL-10 and TGF-β (34). To investigate the mechanism involved in the suppressive effect of CCL18-recruited memory $CD4^+CD25^-$ T cells, inhibition and cell contact experiments were performed. Blocking anti-IL-10 antibodies completely reversed the suppression of responder T cell proliferation at all ratio (Fig.6B). The addition of blocking anti-TGF-β antibodies induced a small recovery of T cell proliferation, which was not statistically significant (Fig.6B). To determine whether part of the suppressive effect was cell-contact dependent, CCL18-recruited memory $CD4^+$T cells were separated from $CD4^+CD25^-$ effector cells by a 0.4-µm pore size membrane in a transwell. Under this condition, the proliferation of $CD4^+CD25^-$ effector cell remained inhibited (40.8% inhibition at a ratio of 1:1) (Fig.6B). These data indicate that CCL18 recruits Treg, which inhibit $CD4^+CD25^-$ effector cell proliferation through IL-10- but not cell contact-dependent mechanisms.

Collectively, these findings show that CCL18 is able to recruit Treg, which act through IL-10 production but do not express Foxp3.

Discussion

In this study, we show for the first time that CCL18 recruits a particular subset of Treg expressing CD25, LAP/TGF-ß1 but not Foxp3, and acting through IL-10. Hitherto, a number of Treg subsets have been reported including natural and adaptive T cells. $CD4^+$ T cells expressing constitutively CD25 were firstly described as natural Treg conferring self-tolerance. However, the IL-2 receptor CD25 is expressed by activated effector T cells as well. Human T cells expressing high levels of CD25, rather than cells expressing low levels of CD25, were shown to support Treg activity (2). The expression of IL-7 receptor CD127 was demonstrated to help in discriminating $CD4^+CD25^+$ Treg, which down-regulate CD127 ($CD127^{low}$), from activated effector $CD4^+CD25^+$ T cells, which up-regulate CD127 ($CD127^{high}$) (30). In the present study, CCL18 induced a clear recruitment of highly purified $CD4^+CD25^{high}$ and $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$ T cells, whereas these cell populations appeared less recruited when non selected total memory T cells were used, arguing for a competition within different responding sub populations.

However, these cells did not express Foxp3 at the protein and the mRNA levels. Although not expressing Foxp3, CCL18-recruited T cells were truly Treg as shown by their functional ability to inhibit T cell proliferation. This particular phenotype was also observed *in vivo* in a physiological setting of human skin leukocyte recruitment, showing that the observed phenotype was not linked to an *in vitro* artefact. Expression of the transcription factor Foxp3 is a defining feature of natural Treg (1), which arises during thymic development through high-affinity recognition of self antigens (35, 36). Therefore, these data suggest that CCL18-recruited Treg are not natural but adaptive Treg. CCL18-recruited Treg were demonstrated to act through IL-10. The production of IL-10 by $CD4^+$ T cells has been associated with different subsets of Treg including $Foxp3^-$ cells, in particular in humans and among the peripherally induced adaptive Treg. The best characterized of the latter subset are T regulatory type 1 cells (Tr1 cells), originally described as a product of naive CD4+ T cells activated *ex vivo* in the presence of IL-10 or by IL-10-conditioned dendritic cells (37, 38). Tr1 cells are characterized by abundant production of IL-10 and produce suppression by a cell contact–independent, cytokine-dependent mechanism that involves both IL-10 and TGF-ß (7). These characteristics fitted with the general properties of CCL18-recruited Treg cells, however, CCL18 did not attract Tr1 clones, or antiCD3/CD46 differentiated T cells. It is of note that the Tr1 clones that we used in this study did express Foxp3 (24), feature that was missing in the cells recruited by CCL18. Regarding antiCD3/CD46 differentiated T cells, they were originally considered as Tr1 type cells linked to their ability to suppress T cell proliferation and produce the suppressive cytokine IL-10 (31), however, more recently their mechanism of action has been shown to involve granzyme mediated cytotoxicity (39). Among other Treg populations not expressing Foxp3, a subset of $CD69^+CD4^+$ T cells has been described to suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-ß□□ in mice (40). However, in contrast with CCL18-recruited Treg, that subpopulation does not express CD25 and does not produce IL-10, ruling out a potential similarity between them. CCL18-recruited Treg expressed increased levels of LAP/TGF-ß1. The latent form of TGF-ß1 has been previously detected on the surface of activated human and mouse $Foxp3^+$ Treg and shown to convert $Foxp3^-$ T cells into $Foxp3^+$ Treg (41-43). Very recently, this marker has been shown to characterize in humans another subset of $CD4^+$ Treg not expressing $Foxp3^-$ (44). In the latter study, LAP/TGF-ß1 expressing cells were found mainly within the $CD4^+CD25^{high}$ T cells as compared to the $CD4^+CD25^{int}$ and $CD4^+CD25^{low}$ populations. This $CD4^+$LAP/TGF-ß1^+Foxp3^- subset produced IL-10 and

TGF-ß1 upon stimulation, and exhibited TGF-ß1- and IL-10- dependent suppressive activity *in vitro*, therefore exhibiting characteristics very similar to those of CCL18-recruited Treg, and suggesting that CCL18 may recruit part of this sub population. We have recently shown that CCL18 was also able to generate adaptive Treg from $CD4^{+}CD25^{-}$ effector T cells (22). In contrast with the present findings, 72 to 96h were necessary to generate these cells, which expressed Foxp3 and acted through both cytokine and contact dependent mechanisms. Therefore, CCL18 has a double effect, immediately by recruiting a particular subset of Treg and after a few days by generating them.

The suppression of ongoing immune responses in diverse tissues requires that Treg express a diverse array of adhesion and chemokine receptors (45, 46). The appropriate localization of Treg into distinct tissues is essential for their *in vivo* activity. The receptor(s) binding CCL18 remains unidentified today. However, the present data suggest that some Treg express CCL18 receptor(s) since they migrate in response to the molecule and are able to bind the labelled ligand. Of interest, the chemokine receptor CCR4 is also expressed by Treg (9-12, 47), and found in the lung (48) . Although CCR4 is not a receptor for CCL18 (14, 49), it appears to be richly expressed on the membrane of the cells recruited by CCL18. CCR4 expression on Treg cells is functionally active *in vivo*. Indeed, mice with a complete loss of CCR4 in the Treg compartment develop severe inflammatory disease in the lungs related to a lack of Treg accumulation in this organ (50). Altogether, these data suggest that coexpression of CCL18R and CCR4 on Treg may favour their localization to the lung. Moreover, CCL18 is highly expressed by healthy alveolar macrophages and by alternatively activated macrophages, which are well documented to have anti-inflammatory properties. A recent study has shown that Treg steer monocytes toward alternatively activated monocyte/macrophages which secrete high levels of CCL18 (51). Altogether, these data suggest that CCL18 could play a crucial role in maintaining lung tolerance by attracting Treg into the lung and by contributing to Treg - alternatively activated macrophage mutual interactions.

However, there are evidences that CCL18 is also implicated in allergic diseases. We and others have shown that CCL18 is up-regulated by allergen stimulation and overexpressed in a number of allergic diseases including allergic asthma, atopic dermatitis and vernal keratoconjonctivitis (14, 52, 53). Furthermore, CCL18 exhibits a chemotactic activity toward Th2 cells, which are the cornerstone of the allergic reaction (14). This ability was confirmed in the present study, where, beside Treg recruitment, Th2 type cells were also

attracted, as shown by the IL-4 production of the recruited cells *in vitro* and *in vivo*, and by the binding of CCL18 to IL-4 producing cells. Although the ability of CCL18 to attract both Th2 and Treg cells can appear contradictory, a differential attraction cannot be excluded. CCL18-mediated Th2 versus Treg cell recruitment may be affected by a competitive effect linked to a different chemokine receptor, by microenvironmental factors such as endothelial integrins and glycosaminoglycans, by homo or heterodimerization of CCL18 and/or its receptor. Interestingly, these two cell subsets have been proposed to derive from the same cell population as they both overexpress a number of similar gene transcripts, including the chemokine receptors CCR4 and CCR8, which might explain a conserved chemokine receptor expression on the two subsets (54). Accordingly, it has recently been shown that Th2 memory cells can be converted into Treg able to suppress allergic asthma (55). On the other hand, some reports show the coexistence of these two subsets at sites of allergic inflammation (56).

This overlap of CCL18 receptor expression on Treg and Th2 subsets may allow their colocalization in the lung in order to act as a regulatory feedback mechanism in allergic inflammatory conditions. In basal conditions, as observed in our study, the global effect of CCL18-recruited cells is a suppression of T cell proliferation, suggesting a regulatory function of this chemokine in healthy humans.

In conclusion, this study shows that CCL18 activates migration of human Treg. Then, CCL18 may contribute to maintain tolerance and/or suppress deleterious inflammation by attracting Treg into tissues, acting in particular in the major host-environment interface that is the lung, where it is highly and constitutively expressed. Therefore, CCL18 may be an attractive therapeutic target, in particular in inflammatory pulmonary diseases.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge Dr Claudia Kemper for her kind gift of anti-CD46 antibody and Dr Stan Tomavo for the gift of the purified *P. falciparum* TAF10 protein.

References

1. Zheng, Y., et A. Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol* 8: 457-462.
2. Sakaguchi, S., M. Toda, M. Asano, M. Itoh, S. S. Morse, et N. Sakaguchi. 1996. T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J. Autoimmun* 9: 211-220.
3. Read, S., V. Malmström, et F. Powrie. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med* 192: 295-302.
4. Izcue, A., J. L. Coombes, et F. Powrie. 2006. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol. Rev* 212: 256-271.

5. von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol* 6: 338-344.
6. Weaver, C. T., L. E. Harrington, P. R. Mangan, M. Gavrieli, et K. M. Murphy. 2006. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 24: 677-688.
7. Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, et M. K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev* 212: 28-50.
8. Bromley, S. K., T. R. Mempel, et A. D. Luster. 2008. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol* 9: 970-980.
9. 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, et R. Kolbeck. 2006. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes. *J. Immunol* 177: 6940-6951.
10. Sebastiani, S., P. Allavena, C. Albanesi, F. Nasorri, G. Bianchi, C. Traidl, S. Sozzani, G. Girolomoni, et A. Cavani. 2001. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J. Immunol* 166: 996-1002.
11. Colantonio, L., A. Iellem, F. Sinigaglia, et D. D'Ambrosio. 2002. Skin-homing CLA+ T cells and regulatory CD25+ T cells represent major subsets of human peripheral blood memory T cells migrating in response to CCL1/I-309. *Eur. J. Immunol* 32: 3506-3514.
12. Iellem, A., M. Mariani, R. Lang, H. Recalde, P. Panina-Bordignon, F. Sinigaglia, et D. D'Ambrosio. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Exp. Med* 194: 847-853.
13. Schutyser, E., S. Struyf, A. Wuyts, W. Put, K. Geboes, B. Grillet, G. Opdenakker, et 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: 3755-3762.
14. de Nadaï, P., A. Charbonnier, C. Chenivesse, S. Sénéchal, C. Fournier, J. Gilet, H. Vorng, Y. Chang, P. Gosset, B. Wallaert, A. Tonnel, P. Lassalle, et A. Tsicopoulos. 2006. Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J. Immunol* 176: 6286-6293.
15. Kodelja, V., C. Müller, O. Politz, N. Hakij, C. E. Orfanos, et S. Goerdt. 1998. 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: 1411-1418.
16. Schutyser, E., A. Richmond, et J. Van Damme. 2005. Involvement of CC chemokine ligand 18 (CCL18) in normal and pathological processes. *J. Leukoc. Biol* 78: 14-26.
17. Tasaki, Y., S. Fukuda, M. Iio, R. Miura, T. Imai, S. Sugano, O. Yoshie, A. L. Hughes, et H. Nomiyama. 1999. Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes. *Genomics* 55: 353-357.
18. Schraufstatter, I., H. Takamori, L. Sikora, P. Sriramarao, et 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: L494-501.
19. Hieshima, K., T. Imai, M. Baba, K. Shoudai, K. Ishizuka, T. Nakagawa, J. Tsuruta, M. Takeya, Y. Sakaki, K. Takatsuki, R. Miura, G. Opdenakker, J. Van Damme, O. Yoshie, et 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: 1140-1149.
20. 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, et C. G. Figdor. 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387: 713-717.
21. 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, et S. Sozzani. 2003. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J. Immunol* 170: 3843-3849.
22. Chang, Y., P. de Nadai, I. Azzaoui, O. Morales, N. Delhem, H. Vorng, S. Tomavo, S. Ait Yahia, G. Zhang, B. Wallaert, C. Chenivesse, et A. Tsicopoulos. 2010. The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4+ T cells of healthy but not allergic subjects. *FASEB J* , 2010 August [Epub ahead of print]
23. Lécart, S., V. Boulay, N. Raison-Peyron, J. Bousquet, L. Meunier, H. Yssel, et J. Pène. 2001. Phenotypic characterization of human CD4+ regulatory T cells obtained from cutaneous dinitrochlorobenzene-induced delayed type hypersensitivity reactions. *J. Invest. Dermatol* 117: 318-325.
24. Brun, V., H. Bastian, V. Neveu, et A. Foussat. 2009. Clinical grade production of IL-10 producing regulatory Tr1 lymphocytes for cell therapy of chronic inflammatory diseases. *Int. Immunopharmacol* 9: 609-613.
25. Chang, Y., S. Sénéchal, P. de Nadai, C. Chenivesse, J. Gilet, H. Vorng, B. Legendre, A. Tonnel, B. Wallaert, P. Lassalle, et A. Tsicopoulos. 2006. Diesel exhaust exposure favors TH2 cell recruitment in nonatopic subjects by differentially regulating chemokine production. *J. Allergy Clin. Immunol* 118: 354-360.
26. Gilet, J., Y. Chang, C. Chenivesse, B. Legendre, H. Vorng, C. Duez, B. Wallaert, H. Porte, S.

Senechal, et A. Tsicopoulos. 2009. Role of CCL17 in the generation of cutaneous inflammatory reactions in Hu-PBMC-SCID mice grafted with human skin. *J. Invest. Dermatol* 129: 879-890.
27. Callebaut, I., K. Prat, E. Meurice, J. Mornon, et S. Tomavo. 2005. Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in Plasmodium falciparum: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics* 6: 100.
28. Sénéchal, S., O. Fahy, T. Gentina, H. Vorng, M. Capron, A. F. Walls, A. R. McEuen, M. G. Buckley, Q. Hamid, B. Wallaert, A. B. Tonnel, et A. Tsicopoulos. 2002. CCR3-blocking antibody inhibits allergen-induced eosinophil recruitment in human skin xenografts from allergic patients. *Lab. Invest* 82: 929-939.
29. de Nadaï, P., C. Chenivesse, J. Gilet, H. Porte, H. Vorng, Y. Chang, A. F. Walls, B. Wallaert, A. Tonnel, A. Tsicopoulos, et H. Zerwes. 2006. CCR5 usage by CCL5 induces a selective leukocyte recruitment in human skin xenografts in vivo. *J. Invest. Dermatol* 126: 2057-2064.
30. Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, et B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med* 203: 1693-1700.
31. Kemper, C., A. C. Chan, J. M. Green, K. A. Brett, K. M. Murphy, et J. P. Atkinson. 2003. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421: 388-392.
32. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, et H. L. Weiner. 2003. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J. Immunol* 170: 2516-2522.
33. Allakhverdi, Z., D. Fitzpatrick, A. Boisvert, N. Baba, S. Bouguermouh, M. Sarfati, et G. Delespesse. 2006. Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol* 118: 1342-1349.
34. Nakamura, K., A. Kitani, et 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: 629-644.
35. Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, et A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol* 2: 301-306.
36. Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, et H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat. Immunol* 3: 756-763.
37. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, et M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389: 737-742.
38. Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. Breittmayer, F. Cottrez, et H. Groux. 2003. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18: 605-617.
39. Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, et T. J. Ley. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21: 589-601.
40. Han, Y., Q. Guo, M. Zhang, Z. Chen, et X. Cao. 2009. CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J. Immunol* 182: 111-120.
41. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, et D. Sacks. 2007. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J. Exp. Med* 204: 285-297.
42. Chen, M., B. Yan, Y. Bando, V. K. Kuchroo, et H. L. Weiner. 2008. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol* 180: 7327-7337.
43. Tran, D. Q., J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G. G. Illei, et E. M. Shevach. 2009. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113: 5125-5133.
44. Gandhi, R., M. F. Farez, Y. Wang, D. Kozoriz, F. J. Quintana, et H. L. Weiner. 2010. Cutting edge: human latency-associated peptide+ T cells: a novel regulatory T cell subset. *J. Immunol* 184: 4620-4624.
45. Huehn, J., et A. Hamann. 2005. Homing to suppress: address codes for Treg migration. *Trends Immunol* 26: 632-636.
46. Wei, S., I. Kryczek, et W. Zou. 2006. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108: 426-431.
47. Baatar, D., P. Olkhanud, K. Sumitomo, D. Taub, R. Gress, et A. Biragyn. 2007. Human peripheral blood T regulatory cells (Tregs), functionally primed CCR4+ Tregs and unprimed CCR4- Tregs, regulate effector T cells using FasL. *J. Immunol* 178: 4891-4900.
48. Mikhak, Z., M. Fukui, A. Farsidjani, B. D. Medoff, A. M. Tager, et A. D. Luster. 2009. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J. Allergy*

Clin. Immunol 123: 67-73.e3.
49. Hieshima, K., T. Imai, M. Baba, K. Shoudai, K. Ishizuka, T. Nakagawa, J. Tsuruta, M. Takeya, Y. Sakaki, K. Takatsuki, R. Miura, G. Opdenakker, J. Van Damme, O. Yoshie, et 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: 1140-1149.
50. Sather, B. D., P. Treuting, N. Perdue, M. Miazgowicz, J. D. Fontenot, A. Y. Rudensky, et D. J. Campbell. 2007. Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *J. Exp. Med* 204: 1335-1347.
51. Tiemessen, M. M., A. L. Jagger, H. G. Evans, M. J. C. van Herwijnen, S. John, et L. S. Taams. 2007. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104: 19446-19451.
52. Günther, C., C. Bello-Fernandez, T. Kopp, J. Kund, N. Carballido-Perrig, S. Hinteregger, S. Fassl, C. Schwärzler, G. Lametschwandtner, G. Stingl, T. Biedermann, et J. M. Carballido. 2005. CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells. *J. Immunol* 174: 1723-1728.
53. El-Asrar, A. M. A., S. Struyf, S. A. Al-Kharashi, L. Missotten, J. Van Damme, et K. Geboes. 2002. Expression of T lymphocyte chemoattractants and activation markers in vernal keratoconjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 86: 1175-1180.
54. Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, et R. H. DeKruyff. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol* 3: 715-720.
55. Kim, B., I. Kim, Y. Park, Y. Kim, Y. Kim, W. Chang, Y. Lee, M. Kweon, Y. Chung, et C. Kang. 2010. Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107: 8742-8747.
56. Curotto de Lafaille, M. A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, et J. J. Lafaille. 2008. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29: 114-126.

Legends to figures

Figure 1. Chemotactic effect of CCL18 on different CD4$^+$ Treg subpopulations. (A) Flow cytometry sorted CD4$^+$CD25^{high} T cells compared with CD4$^+$CD25$^-$ T cells, (B) Flow cytometry sorted CD4$^+$CD25^{high}CD127^{low} T cells compared with CD4$^+$CD25$^-$ CD127$^+$ cells, (C) *in vitro* differentiated anti CD3/CD46 Treg after 24 and 48h of differentiation, (D) flow cytometry sorted CD4$^+$CCR4$^+$ cells compared with CD4$^+$CCR4$^-$ cells. Chemotaxis assays were performed using a Boyden chamber, with CCL18 at different doses, RPMI medium as negative control and CXCL12 as positive control. Results are expressed as mean index of chemotaxis related to medium ± SEM of n = 6 experiments for each subpopulation.*$p<0.05$, **$p<0.01$.

Figure 2. Phenotype of memory CD4$^+$ T cells from healthy subjects recruited by CCL18. Peripheral memory CD4$^+$ T cells were allowed to migrate in a transwell system against culture medium, CXCL12 or CCL18 for 2h30. Recovered cells were rested overnight and stained for expression of the surface molecules CD25, CD127, LAP/TGF-β1, CD103, CTLA-4 and CCR4, and for intracellular expression of Foxp3. Results are expressed as (A) mean % of positive cells ± SEM for n=9-11 subjects, (B) mean Mean Fluorescence Intensity (MFI) ± SEM for n=7-11 subjects, and (C) mean % of positive cells ± SEM for n=9 subjects, * $p<0.05$ compared with medium, # $p<0.05$ compared with

baseline non transmigrated cells. (D) Cell surface binding of CCL18 on purified memory $CD4^+CD25^+$ cells versus $CD4^+CD25^-$ T cells. Results are expressed as mean % of positive cells ± SEM for n=6 subjects.

Figure 3. **Cytokine profile of memory $CD4^+$ T cells recruited by CCL18.** (A) Peripheral memory $CD4^+$ T cells were allowed to migrate in a transwell system against culture medium, CXCL12, or CCL18 for 2h30. Recovered cells were rested overnight and stimulated for 3 days. The production level of IL-10**,** TGF-β1**,** IL-4**,** IFN-γ and IL-17 was evaluated by ELISA. Results are expressed as mean % increase ± SEM as compared to stimulated baseline cells for n=8-12 subjects, *p<0.05 **p<0.01 compared with medium. (B) Peripheral memory $CD4^+$ T cells were double stained with labelled CCL18, and intra cellular anti IL-4 or IL-10 antibodies. Representative dot blots are shown on the left with the % of positive cells indicated in each quadrant, and the mean % of CCL18R positive cells ± SEM among IL-4^+ and IL-10^+ cells on the right. n = 5-7 subjects.

Figure 4. Human T cell subpopulation and cytokine expressing cell recruitment in skin xenografts from humanized SCID mice 24 hours after i.d. CCL18 versus diluent injections.

CCL18 was injected into human skin xenografts immediately after i.p. reconstitution with autologous PBMC. Cryostat sections of human skin biopsies were immunostained with (A) monoclonal antibodies against human $CD45RA^+$ naive T cells, $CD45RO^+$ memory T cells, $CD25^+$ and $Foxp3^+$ cell subpopulations. Results are expressed as mean number of positive cells ± SEM per mm2 for n=3 mice. (B) with antibodies against human cytokines. Results are expressed as above.

Figure 5. **Microphotographs of immunohistochemistry on cryostat sections.**

Human skin graft 24 hours after diluent injection immunostained with anti-CD4 antibody (A), or after CCL18 intradermal injection immunostained with anti-CD4 antibody (B), anti-CD25 antibody (C) or anti-IL-10 antibody (D). Arrows point out positive cells. Original magnification x250.

Figure 6. Inhibitory effect of CCL18-recruited memory $CD4^+$ T cells on proliferation of $CD4^+CD25^-$ effector cells. (A) Memory $CD4^+$ T cells recruited by CXCL12 or CCL18 were added at suppressor/responder ratios of 1:4, 1:2 and 1:1 to autologous $CD4^+CD25^-$ effector cells stimulated with soluble anti-CD3 and CD28 antibodies. Irradiated autologous PBMC were used as APC. Proliferation was measured

by incorporation of ^{3}H-thymidine at 48h. The $CD4^{+}CD25^{-}$ and $CD4^{+}CD25^{+}$ T cells were used as negative and positive controls respectively. The results are presented as mean percentages ± SEM of proliferation of $CD4^{+}CD25^{-}$ cells alone, *$p<0.05$, **$p<0.01$ *** $p<0.001$ compared with the negative control. n=6 experiments with triplicate wells for each condition. (B) Mechanisms involved in the inhibitory effect of CCL18-recruited cells on the proliferation of $CD4^{+}CD25^{-}$ effector cells. Isotype, anti-IL-10 or anti-TGF-ß1 neutralizing antibodies were added to the co-culture system, and a transwell system was used to abrogate the cell contact between the suppressor and responder cells. Results are expressed as above *$p<0.05$ **$p<0.01$ compared with isotype treated memory T cells. n=4 experiments with triplicate wells for each condition.

Figure 1

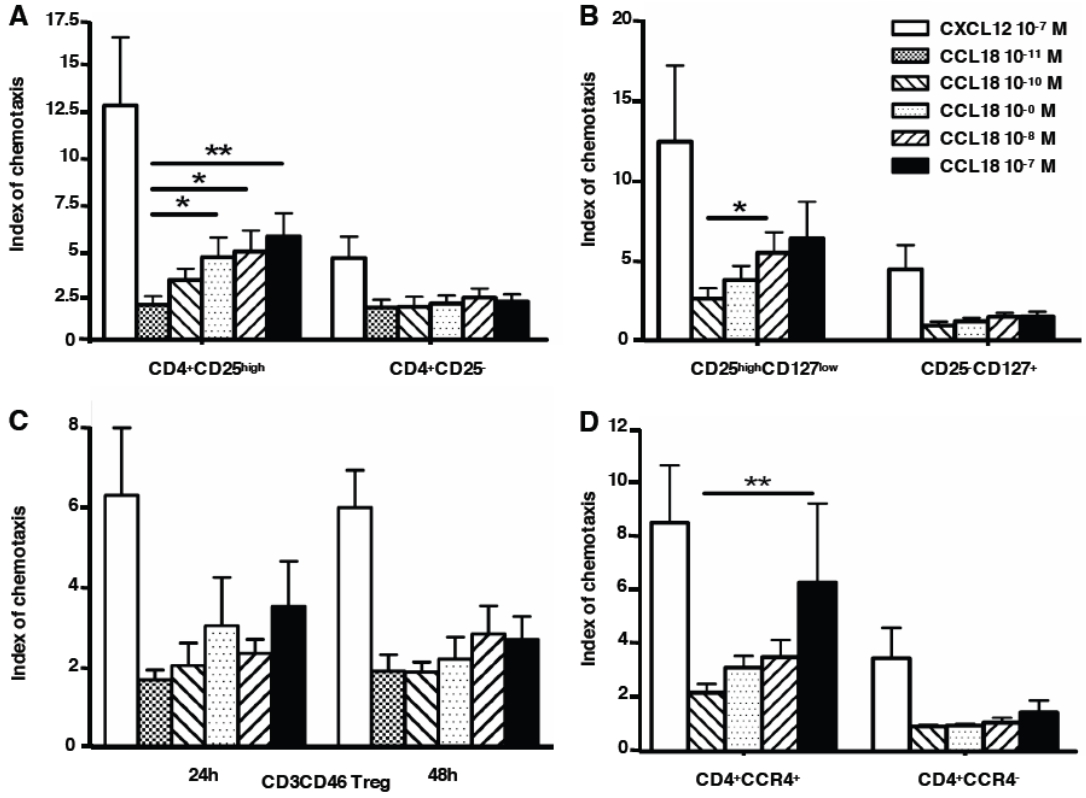

A
B
C
D
Index of chemotaxis
CXCL12 10-7 M
CCL18 10-11 M
CCL18 10-10 M
CCL18 10-0 M
CCL18 10-8 M
CCL18 10-7 M
CD4+CD25high
CD4+CD25-
CD25highCD127low
CD25-CD127+
24h
CD3CD46 Treg
48h
CD4+CCR4+
CD4+CCR4-

Figure 2

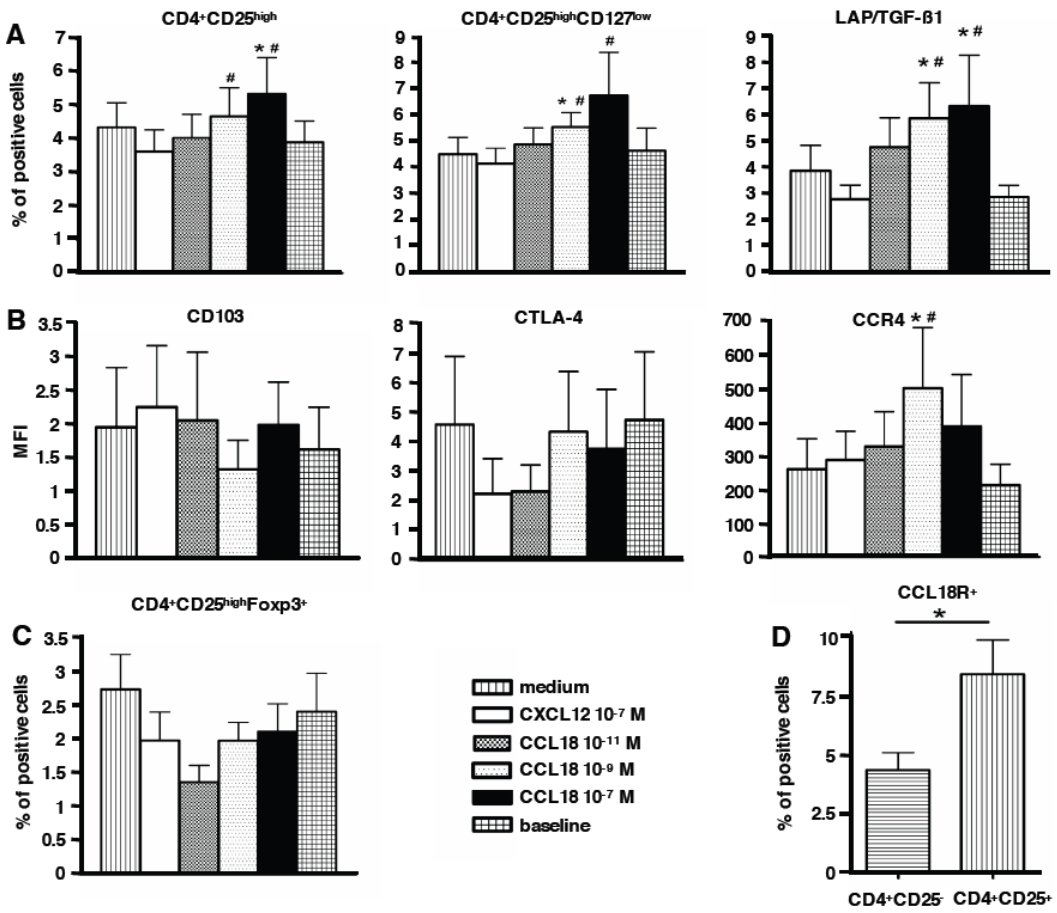

A
CD4+CD25high
CD4+CD25highCD127low
LAP/TGF-β1
% of positive cells
B
CD103
CTLA-4
CCR4
MFI
C
CD4+CD25highFoxp3+
% of positive cells
medium
CXCL12 10-7 M
CCL18 10-11 M
CCL18 10-9 M
CCL18 10-7 M
baseline
D
CCL18R+
% of positive cells
CD4+CD25-
CD4+CD25+

Figure 3

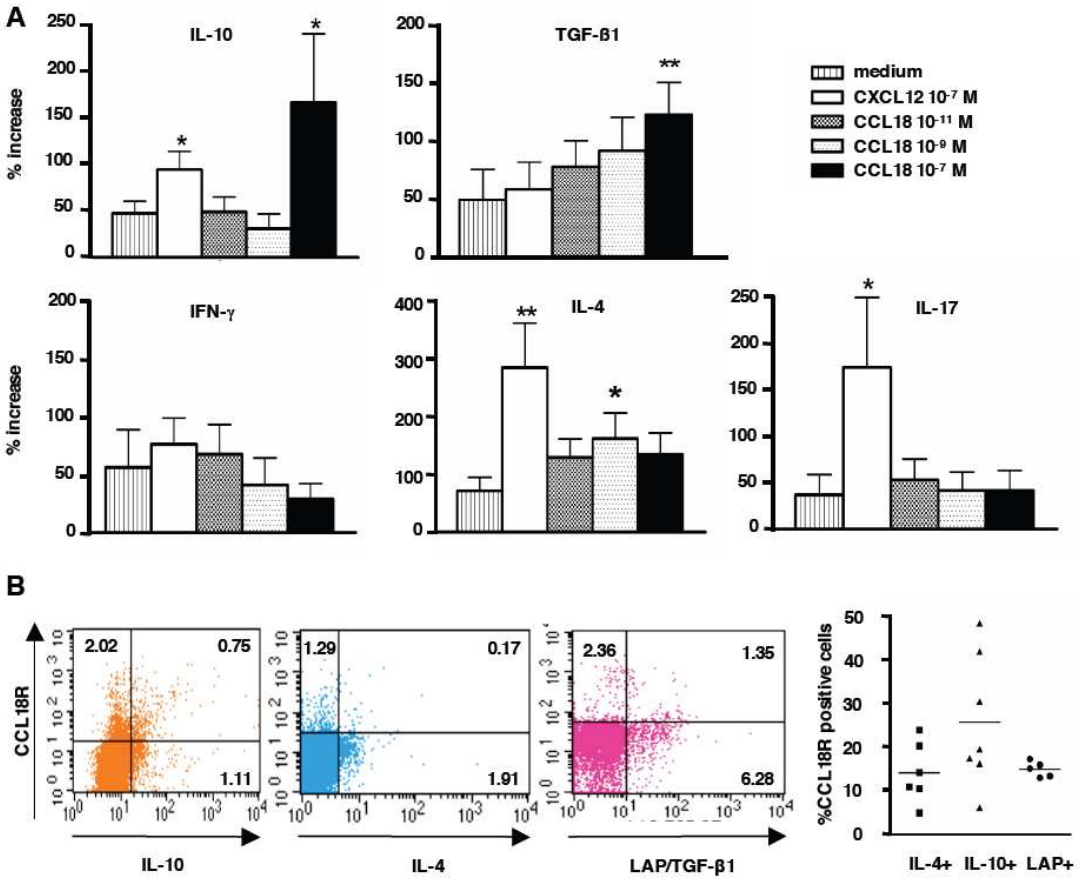

A
IL-10
TGF-β1
IFN-γ
IL-4
IL-17
% increase
medium
CXCL12 10-7 M
CCL18 10-11 M
CCL18 10-9 M
CCL18 10-7 M
B
CCL18R
IL-10
IL-4
LAP/TGF-β1
2.02
0.75
1.11
1.29
0.17
1.91
2.36
1.35
6.28
%CCL18R positive cells
IL-4+
IL-10+
LAP+

Figure 4

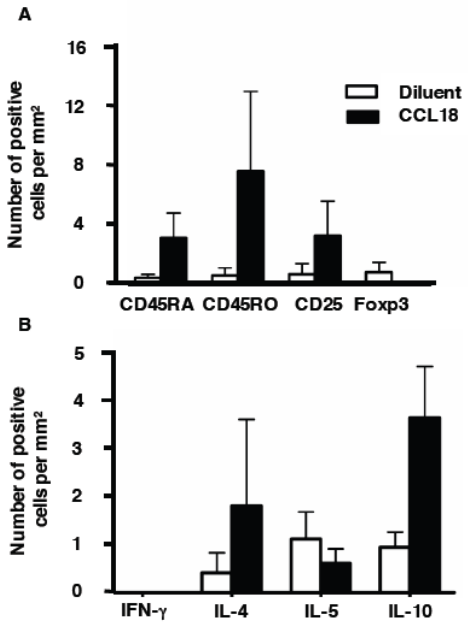


Figure 5

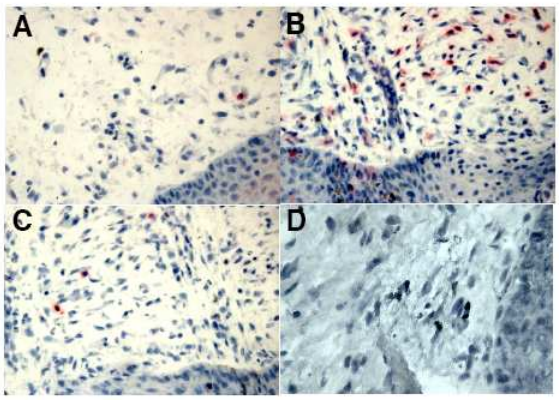
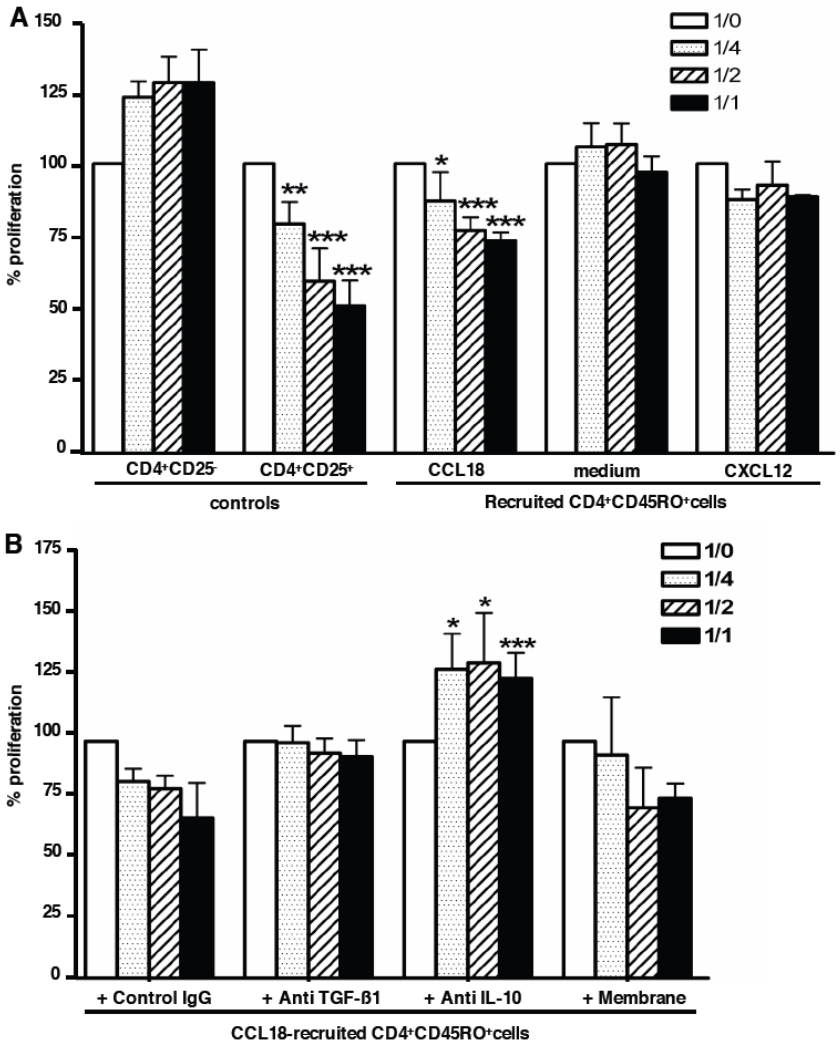


Figure 6


A
150
125
100
75
50
25
0
% proliferation
1/0
1/4
1/2
1/1
**
***
***
*
***
***
CD4+CD25-
CD4+CD25+
CCL18
medium
CXCL12
controls
Recruited CD4+CD45RO+cells
B
175
150
125
100
75
50
25
0
% proliferation
1/0
1/4
1/2
1/1
*
*
***
+ Control IgG
+ Anti TGF-ß1
+ Anti IL-10
+ Membrane
CCL18-recruited CD4+CD45RO+cells

Article IV

La chimiokine CCL18 inhibe l'asthme allergique expérimental

Jules Gilet, Ying Chang, **Imane Azzaoui**, Saliha Ait Yahia, Philippe Marquillies**,** Han Vorng, Benoit Wallaert, and Anne Tsicopoulos.

En préparation

Problématique et approche expérimentale

CCL18 est produite au niveau pulmonaire et est induite par les cytokines Th2. Cette chimiokine permet *in vitro* de recruter des Lc Th2, des polynucléaires basophiles et induit une histaminolibération par ces cellules. Un antagonisme spécifique du CCR3, ainsi que la capacité de recruter des lymphocytes T à fonctionnalité suppressive prêtent toutefois des propriétés anti-inflammatoires à cette chimiokine. Même si il n'existe pas d'homologue de séquence de CCL18 chez la souris, son récepteur putatif y est présent comme montré par l'effet chimiotactique de CCL18 humain sur diverses populations murines Un modèle d'asthme allergique chez la souris, avec administration intratrachéale de la chimiokine pour mimer une expression préférentielle pulmonaire, a permis d'évaluer le rôle de CCL18 dans l'inflammation asthmatique.

Résultats de l'article

L'administration de CCL18 par voie intratrachéale à des souris Balb/cBYJ sensibilises permet d'inhiber le développement de la réaction asthmatique, en diminuant l'inflammation pulmonaire (réduction de l'infiltration éosinophilique, inhibition de la production locale de cytokines Th2, inhibition de la production de mucus) et protège ces derniers contre l'altération de leur fonction respiratoire (protection contre l'hyperréactivité bronchique, avec inhibition de l'hypersécrétion de mucus). Cependant, on n'observe pas de modifications de la réponse humorale, mais on met en évidence une attraction de Lc et de DC au niveau pulmonaire. Les mécanismes étudiés n'ont pas mis en évidence d'augmentation de Treg ou de pDC.

Conclusions

L'administration du CCL18 inhibe nettement les paramètres de l'asthme expérimental. Toutefois, les mécanismes cellulaires à l'origine de cette protection semblent indépendants des grandes voies de régulation de la réaction.

CCL18 inhibits experimental allergic asthma

Jules Gilet[(1)], Ying Chang[(2)], **Imane Azzaoui**[(1)], Saliha Ait Yahia[(1)], Philippe Marquillies[(1)], Han Vorng[(1)], Benoit Wallaert[(1) (3)], and Anne Tsicopoulos[(1) (3)].

[(1)]Equipe « Immunité Pulmonaire » du Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, France. [(2)]Meakins-Christie Laboratories and Respiratory Division, Department of Medicine McGill University, 3626 rue St, Urbain, Montreal, QC, H2X 2P2 Canada. [(3)]Clinique des maladies respiratoires de Lille, hôpital Calmette de Lille, France.

Introduction

The prevalence of asthma has shown a remarkable raise in the last past two decades, especially in western countries. This disease is a chronic inflammatory reaction induced by environmental factors in genetically predisposed individuals. Asthma is characterized by lung recruitment and activation of Th2 lymphocytes, eosinophils and basophils [1], and is associated to an extensive production of allergen-specific IgE. These antibodies bind lung granulocytes through a high-affinity specific receptor (FcεRI) and trigger cell exocytosis when allergen is inhaled [2]. This phenomenon leads to the generation of oxidative stress that is extremely destructive for the cells of the lung mucosa, and to the release of numerous lipidic and proteic factors such as leukotrienes and histamine. These inflammatory mediators promote mucus hypersecretion by goblet cells and potentiate contractility of smooth muscles in the tracheobronchial tree in response to external stimuli [3], leading to bronchial hyperreactivity that is a characteristic of allergic asthma. Functionally, the asthmatic reaction is organized through a very complex network of low-molecular-weight proteins: the chemokines. These proteins are secreted in part by cells of the immune system, and by tissues such as bronchial epithelium and vascular endothelium, allowing the specific recruitment to inflammatory sites of the different cellular actors driving the asthmatic reaction, including Th2 lymphocytes and eosinophils [4]. Chemokines are classified in four subfamilies depending on the position of conserved cystein residues in the amino-terminal part of the proteins: CXC, CC, C and CX3C. Most of the chemokines involved in the asthmatic reaction belong to the CC-chemokine family [5]. CCL18 is a human chemokine, also know as DC-CK1 [6], PARC [7], AMAC-1 [8], and MIP-4 [9]. It is mainly expressed in the lung [7], secreted by antigen presenting-cells (alveolar macrophages and dendritic cells), and its expression is induced by Th2 type cytokines [8]. Recently, we demonstrated that CCL18 attracted Th2 lymphocytes and basophils, and induced basophil histamine release [10]. Higher levels of CCL18 were also observed in broncho-alveolar lavage fluids from untreated asthmatic patients

than from non asthmatic patients. Altogether, these data suggested that CCL18 was involved in the asthmatic reaction, and may potentially increase the pathological features of asthma.

However, we also observed that *in vitro*, the allergen-induced secretion of CCL18 by PBMC of allergic patient was late (starting at 48 hours), suggesting that CCL18 might be involved in the very last stages of the asthmatic reaction. Moreover, the expression of CCL18 by antigen-presenting cells is strongly induced by IL10 [8] [11], a suppressive cytokine able to inhibit the functions of DC [12] as well as Th2 cells [13]. Furthermore, it has been shown that CCL18 has an antagonistic activity on CCR3 [14], a chemokine receptor which allow the recruitment of lung eosinophils and basophils during the asthmatic reaction. These results suggest that, despite its Th2-associated pattern of expression, CCL18 may be related to the process of resolution of asthma.

In order to define the physiological function of CCL18 during the asthmatic reaction, the use of animal models is of first interest. Nevertheless, no rodent ortholog of CCL18 has been identified yet. Most of the human CC chemokine genes, including CCL18, are mapped in a specific cluster on chromosome 17, and have been generated during the evolutional process by gene duplication and partial deletion [15]. Thus, it has been suggested that the genetic events leading to the generation of CCL18 gene, likely have happened after the diversification of rodents and primates [16]. However, many works have demonstrated that recombinant human CCL18 is biologically active on murine cells, inducing chemotaxis of mouse leukocytes *in vitro*, as well as *in vivo*, into the peritoneum of CCL18 injected mice [17] [9]. CCL18 attracts T and B murine lymphocytes and preferentially attracts naive T cells rather than memory T cells [17]. Interestingly, this activity on murine cells is very similar to that observed on human cells [6, 18], indicating that despite the apparent absence of sequence ortholog, CCL18 receptor, as well as a functional homolog of this chemokine, probably exist in mice.

To evaluate *in vivo* the function of CCL18 during the asthmatic reaction, we used a murine model of OVA-induced asthma. In order to mimic a local pulmonary secretion of CCL18, we administered recombinant human CCL18 to mice by the intratracheal route. We report here that the administration of CCL18 induced a strong inhibition of the experimental features of asthma.

Methods

Chemotaxis assays

Spleens from naïve Balb/cBYJ mice (Janvier, Le Genest St Isle, France) were smashed in

a potter. After RBC lysis using an hypotonic solution (155 mM NH_4Cl, 10 mM $NaHCO_3$,0.1 mM EDTA, pH = 7,4), splenocytes were filtered through a 70 µm nylon mesh and resuspended in complete medium consisting in RPMI 1640 + 10% FCS, 1mM supplemental L-glutamine and 1 g/L ticarcylin (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). $TCD4^+$ (purity > 98 %) and $B220^+$ (purity > 90 %) lymphocytes were then obtained from splenocytes after cellular enrichment using Miltenyi purification kits (Miltenyi biotech, Paris, France). After purification, cells were resuspended at a concentration of $2x10^6$ cells/mL for use in a chemotaxis assay. CCL18 (at a concentration of 10^{-8} to 10^{-6} M) and control RPMI 1640 were added in a 48-well micro chemotaxis chamber (NeuroProbe, Cabin John, MD) with 5-µm pore polycarbonate filters (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA) during 2-3hr at 37°C in 5% CO2. Human CXCL12 as well as murine CCL11 at a concentration of 10^{-7} M (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France) were used as positive and negative controls respectively. Each condition was performed in triplicate. Cells that had migrated through the filter were counted in the inferior well, and results were expressed as mean number of cells per well.

F actin polymerization assays

Splenocytes were obtained as described above. Total splenocytes were washed and resuspended at a concentration of $5x10^6$ cells/mL in red-phenol free RPMI (Gibco, Cergy Pontoise, France) + 1 mM $CaCl_2/MgCl_2$ and incubated 15 min at 37°C. Cells (100 µL of suspension) were stimulated with CCL18 (at 10^{-7}M), or with CXCL12 (at 10^{-7}M) as a positive control during different time (10 sec, 20 sec, 30 sec, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min). Stimulation was stopped by fixing cells with 300 µL of 4 % buffered paraformaldehyde during 10-15 minutes at room temperature. Cells were then thoroughly washed before being surface stained with appropriate antibodies (Clinisciences, Montrouge, France). $TCD4^+$ cells were defined as $CD3\varepsilon^+$ $CD4^+$ cells, $TCD8^+$ as $CD3\square^+$ $CD8\square^+$ cells, and DC as $CD11c^+$ $Ia^{d\ hi}$ $F4/80^-$ cells. The content of F-actin was visualized by intracellular staining with Phalloidin-Alexa647 (Invitrogen) in permeabilization buffer (0.1% saponin, 1% BSA) during 30 minutes at room temperature. The mean fluorescence intensity of cells gated according to their surface staining was measured by flow cytometry. For each cellular subset, results were expressed as the ratio of the mean fluorescence intensity of the chemokine- and buffer- stimulated samples.

Dose response effect of in vivo intratracheal administration of CCL18

Naive mice were anaesthetised with a mix of analgesic (Medetomidin Domitor Orion Pharma, 10 µg per mouse) and sedative (ketamin Imalgène 1000, Rhône-Mérieux, 1 mg

per mouse) in sterile phosphate buffered saline by the intraperitoneal route. Mice were then hanged up by incisor teeth using a gallows to allow the deposit of 50 µL of CCL18 solution (carrier-free recombinant CCL18, R&D Systems) at different concentrations using a pipette at the entrance of the trachea. 24 to 48 hours after a single CCL18 administration, mice were sacrificed using a lethal injection of pentobarbital (Sanofi Santé Animale, France, 60 µg per mice). Lungs were then sampled for further histological or flow-cytometry analysis.

Histological preparations and immunostaining

After sampling, small pieces of lung biopsies were fixed in an aldehyde-free, Zn^{2+}-dependant fixative reagent (Immunohistofix, Aphase, Mormont, Belgium) during 48 hours, then dehydrated through several bathes of alcohol of increasing concentration (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 30 minutes each). Biopsies were then embedded in a resin with low-melting point (Immunohistowax, Aphase) at 37°C during 24 hours. 5 µm slides were prepared using a microtome (Leitz) and transferred on histological glass slides house-coated with a 2 % solution of 3-Aminopropyl-Triethoxysilane (TESPA, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). For CD25 immunostaining, slides were dewaxed in an acetone bath during 3 minutes. Unspecific staining was first prevented by biotin quenching (Avidin-Biotin blocking kit, Vector, Peterborough, UK) and incubation with normal mice serum (1:50, 30 minutes) before staining. Biotinylated rat anti-mouse CD25 antibody (clone 7D4, BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) was then incubated on slides at a concentration of 0.31 µg/mL, overnight at +4°C. Biotinylated Rat IgM antibody (clone R4-22, BD Pharmingen) was used at the same concentration as negative control on each slide. Red staining of positive cells was developed with a combinaison of Extravidin/Fast-red (Sigma-Aldricht) according to the manufacturer instructions. Counterstaining was then performed with a 30 second bath of Harry's haematoxylin (Labonord, Templemars, France) and slides were mounted in a solvent-free mounting medium (Aquamount/Polymount, Polysciences, Eppelheim, Germany).

Experimental model of acute asthma and CCL18 administration

Balb/cBYJ mice aged 6 to 8 weeks (Janvier) were sensitized twice at 10 days interval by intraperitoneal injections of a saline physiological solution (NaCl 0,9 %, Aguettant France) containing 20 µg ovalbumin (Sigma-Aldrich) and 100 µL aluminum hydroxide as adjuvant (Rehydragel Alum Reheis, Gentek, Parsippany, USA). Ten days after the last injection, mice were exposed three consecutive days to aerosolized ovalbumin (2 % in phosphate buffered saline) for 20 minutes. The aerosols were generated by a sonic

nebulisator (Ultramed Medicalia, Italia). Control groups (not sensitized) did not receive intraperitoneal injections, but were exposed to ovalbumin aerosols. Carrier-free human recombinant CCL18 (10 µg) was injected intratracheally to mice as described above, three consecutive days 20 to 30 minutes before each ovalbumin aerosol. After inhalation of the droplet solution, mice were awaken using a sub-cutaneous administration of the specific antagonist of the analgesic (Atipamézole Antisedan Orion Pharma, 50 µg per mouse). Mice were then exposed to ovalbumin aerosols 10 to 15 minutes after being fully awake. The control groups were injected intratracheally with 50 µL of sterile phosphate buffered saline containing 1.31% acetonitrile and 0.004 % trifluoroacetic acid, solvents present in the commercially provided solution of CCL18. Airways hyperresponsiveness (AHR) of mice was evaluated 48 hours after the last allergenic challenge, and mice were then sacrificed to evaluate the parameters of inflammation.

Airway hyperresponsiveness

Airway responsiveness was assessed using whole body plethysmography (Buxco Electronics, Sharon, Conn, USA), as originally described by Hammelmann et al. [19]. Enhanced pause (Penh), which reflects airways resistance, was used to assess AHR in this study. Mice were exposed for 2 minutes to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized methacholine (1,5 to 12 g/L in PBS, Sigma-Aldrich) using an Aerosonic ultrasonic nebulizer (Systam, Villeneuve sur Lot, France). After each nebulization, data were recorded for 3 minutes. The Penh values measured during each 3-minute sequence were averaged and were expressed for each Metacholine concentration. As no significant differences were observed in baseline (PBS) Penh between the treated groups, values were expressed as raw PenH.

Bronchoalveolar lavage fluid

After airway hyperresponsiveness assessment, mice were sacrificed as described above. Mice thorax was opened and trachea isolated by dissection. A cannula was then introduced in the trachea and held using forceps, to allow the injection of 1 mL of cold PBS in the lung. Thereafter, the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was recovered and reinjected in the airways three consecutive times, and stored on ice. Total number of cells in the BAL was assessed using a Thoma's cell counting chamber. Cytospins of BAL cells were performed at 1500 rpm during 5 minutes (cytospin Shandon-Eliott). Finally, cells were fixed with methanol and stained with eosin and methylene blue (RAL 555, Labonord). Differential cell counts were performed by optic microscopy at high magnification in mineral oil (Sigma-Aldricht).

Flow cytometry assays

After sampling, lung and lymph nodes were dissociated mechanically. Lungs were digested in the presence of collagenase III (Amersham-GE Healthcare, Orsay, France) and DNase I (Sigma) during 45 minutes. Cellular debris were then eliminated using centrifugation on Percoll (Amersham) density gradient (d = 1,075 g/mL, centrifugation at 950 g during 20 min). Mediastinal lymph nodes from naive mice were pooled in order to obtain a sufficient number of cells. After enumeration and adjustment of cellular concentration between samples, cells were cell surface stained with specific antibodies. Antibodies were provided by BD Pharmingen, except when other manufacturers are specified. nTreg were identified by two different staining protocols: GITR-FITC (R&D Systems), CD25-PE, CD3-Cy5, CD4-APC or CD127-FITC (eBiosciences), CD25-PE, CD3ε-Cy5, CD4-APC. nTreg were then defined as $CD3\varepsilon^+$ $CD4^+$ $CD25^+$ $GITR^+$ cells, or $CD3\varepsilon^+$ $CD4^+$ $CD25^+$ $CD127^-$ cells. As no notable differences were observed depending of the staining procedure, results reported here represent only $CD3\varepsilon^+CD4^+CD25^+CD127^-$ cells. Conventional TCD4+ cells were defined as total $CD3\varepsilon^+$ $CD4^+$ minus nTreg cells. Expression of membrane-bound TGFβ1 was evaluated with TGFβ1-PE (IQ-products, Groningen, The Netherlands), CD3ε-Cy5 and CD4-APC. DC subsets were identified with quadruple staining: SiglecH-FITC (Hycult Biotechnology), Ia^d-PE, 120G8(biot)-Cy5, CD11c-APC. 120G8 hybridoma was a generous gift from Dr Asselin-Paturel. Antibodies were purified from hybridoma supernatant with G-protein loaded column, and were house-biotinylated with a BiotinTag™ Micro Biotinylation Kit (Sigma). pDC were defined as $CD11c^+$ $Ia^{d\,hi}120G8^+$ $SiglecH^+$ cells, mDC as $CD11c^+$ $Ia^{d\,hi}$ $120G8^-$ $SiglecH^-$ cells. For intracellular expression of cytokines, leukocytes were first stimulated during 10 hours with PMA / Ionomycin in the presence of protein secretion inhibitors (BD Golgistop). Cells were then permeabilized using the BD Cytofix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions, and intracellularly stained with antibodies directed against cytokines (IL10-PE and IL12p40-PE).

Histological staining

Histological slides from lung biopsies were prepared as described above. For the evaluation of peribronchic inflammation, slides were stained with a standard Haematoxylin-Eosin stain (HES). Briefly, slides were stained 5 minutes with Harris haematoxylin, dipped in bluing solution (0.5 % ammoniac), then stained with 30 dips in a 2 % aqueous solution of eosin (Sigma-Aldrich). Slides were then properly washed and dehydrated in ethanol prior mounting in a hydrophobic resin (Coverquick, Labonord). In

order to evaluate the mucus production in the bronchi, a Periodic-Acid with Schiff's Reagent staining was used (PAS, Sigma-Aldrich). Slides were first incubated 2x5 minutes in periodic acid, and then glycopyranosic residues in the mucus were revealed in a 30 minutes bath of Schiff's reagent in the dark. Slides were then counterstained in haematoxylin prior mounting.

Gene expression analysis

Total RNA from sampled lungs was isolated using Trizol solution (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA integrity was determined by visualizing the 18S and 28S ribosomal RNA bands after gel electrophoresis in 0.8% agarose after Gelstar nucleic acid staining (Cambrex, Milan, Italia). For semi-quantitative PCR, cDNA synthesis was performed as described previously [10]. Amplified PCR products were separated by gel electrophoresis in 1.5% agarose after Gelstar nucleic acid staining, and analyzed using a video acquisition system. The intensity of each spot was calculated by densitometry analysis, and results were expressed as the ratio of the optical density spot on the corresponding GAPDH housekeeping gene (Gel Analyst, Clara Vision, Orsay, France). Oligonucleotide sequences were the following: IL4FP 5'-AGGAGAAGGGACGCCATGCACGGA-3' IL4RP 5'-ATCGAAAAGCCCGAAAGAGTCTCT-3' (Tm = 55°C, x32 cycles); IL5FP 5'-GAGCACAGTGGTGAAAGAGACCTT-3' IL5RP 5'-ATGACAGGTTTTGGAATAGCATTT-3' (Tm = 56°C, x34 cycles); IL10FP 5'-TGGTAGAAGTGATGCCCCA-3' IL10RP 5'-GAGAAATCGATGACAGCGC-3' (Tm = 60.5 °C, x32 cycles); IL13FP 5'-ATCACACAAGACCAGACTCCC-3' IL13RP 5'-GTCCTGTAGATGGCATTGGCA-3' (Tm = 59°C, x32 cycles); IFNγFP 5'-CTGTTTCTGGCTGTTACTGCCA-3' IFNγRP 5'-TTGCCAGTTCCTCCAGATATCC-3' (Tm = 60°C, x40 cycles); CCL11 FP 5'-TTCTATTCCTGCTGCTCACGG-3' RP 5'-AGGGTGCATCTGTTGTTGGTG-3' (Tm = 58°C, x 30 cycles); GAPDHFP 5'-GCTTTCACCACCATGGAGA -3' GAPDHRP 5'- CCAAAGTTGTCATGGATGACC -3' (Tm = 55°C, x26 cycles). For quantitative PCR, two-step PCR (Applied Biosystems, Paris, France) was performed according to manufacturer's recommendations. Amplification of each sample was measured in triplicate in real time with a StepOnePlus Instrumentation in a 96-well plate (Applied Biosystems). The relative expression of each gene was evaluated from the threshold cycle value (Ct) with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Sample calibrator was defined as the non sensitized, solvent-treated group. Relative expression was then expressed as fold increase in transcript amounts compared with the

naïve/solvent group. Specific oligonucleotide sequences were designed and validated in specificity and efficiency with appropriate positive samples. Sequences were the following: qGAPDHFP 5'-TGCCCAGAACATCATCCCTG-3' qGAPDHRP 5'-TCAGATCCACGACGGACACA-3' (E = 102.96 %); qTGFβ1FP 5'-ACCGCAACAACGCCATCTAT-3' qTGFβ1RP 5'-TCCCGAATGTCTGACGTATTGA-3' (E = 97.44 %). A predesigned Taqman probe assay (Applied Biosystems) was used for Foxp3 gene expression quantification.

Quantification of the humoral response

Serum levels of total IgE, OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a were assayed by ELISA technique. For total and anti-OVA IgE levels, 96-well plates (Immulon 2, Dynatech, Chantilly, Va, USA) were coated with purified anti-IgE (clone 02111D, Pharmingen). After addition of serum samples, a biotinylated anti-IgE antibody (clone 02122D, Pharmingen) or house-biotinylated ovalbumin (OVA Sigma, biotym-N-hydroxysuccinimide ester Calbiochem Sigma) was used as detecting reagent, and the reaction amplified with avidin-horseradish peroxidase (Zymed, San Francisco, USA). For anti-OVA IgG1 and IgG2a, microplates were coated with 100 g/L ovalbumin. After addition of serum samples, a horseradish-peroxydase coupled anti-IgG1 or anti IgG2a (Southern biotechnologies, Birmingham, USA) was added to the samples and the reaction revealed by the addition of tetramethylbenzidine (Uptima TMB solution, Interchim, Montluçon, France). The OVA-specific antibody titers of the samples were related to pooled standards that were generated in the laboratory and expressed as dilution factor able to induce 50 % of the signal from a naive serum. Total IgE levels were calculated by comparison with known mouse IgE standards (BD Pharmingen). The limit of detection was 100 pg/mL for total IgE.

Quantification of chemokine and cytokine protein levels

After sampling, lung biopsies were frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until proteic extraction. Frozen lung were then smashed in 1 mL of an extraction buffer consisting in 0.5 % nonidet P40 (Roche, Meylan, France) and antiproteases (Complete, Protease inhibitor cocktail with EDTA, Roche). Total lung protein levels were assayed in microplates using a detergent-compatible kit (DC protein assay, Biorad, Hercules, USA), with a standard curve based on a BSA solution (total lung protein concentration ranged from 7.59 to 15.28 g/L). Concentrations of CCL18, IL-5, IL-10, IL-13, IL17A, IFNγ and TGFβ1 were measured by ELISA (Duoset kits, R&D Systems) according to the manufacturer's recommendations. Threshold sensitivities were: 33 pg/mL (CCL18), 33

pg/mL (IL5), 33 pg/mL (IL10), 66 pg/mL (IL13), 15 pg/mL (IL17A), 33 pg/mL (IFNγ), and 15 pg/mL (TGFβ1).

Statistical analysis

The different results obtained were expressed as mean +/- SEM. Differences between groups were evaluated using Friedman multiple comparison test, followed by Dunn's post-hoc test for airway hyperresponsiveness, and Kruskal-Wallis multiple comparison test (non parametric ANOVA) followed by Mann-Whitney as post-test for other cases. All tests were applied in a two-tailed fashion. p values were considered significant below a value of 0.05. All statistical data were obtained using GraphPad Prism software v4.

Results

Recombinant human CCL18 attracts in vivo different murine leukocytes

In order to study the effect of CCL18 on experimental murine asthma, we used recombinant human CCL18. We first evaluated its biological activity on murine cells using chemotaxis tests in Boyden's chamber. As previously described [17], CCL18 was able to attract $CD4^+$ T and B lymphocytes, in a dose dependent manner, with a maximal effect at the concentration of 10^{-7} M (fig 1a). In order to identify new murine cellular targets of CCL18, we also evaluated cell activation using F-actin polymerization assays. Experiments showed that CCL18 activated similarly helper $CD4^+$ and cytotoxic $CD8\beta^+$ T cells, although to a lesser extent than human CXCL12 used as positive control (fig 1b). As CCL18 has been shown to attract human dendritic cells [11], we evaluated the activity of CCL18 on murine dendritic cells (DC). *In vitro*, CCL18 induced a rapid cytoskeleton mobilization of murine DC. We next evaluated the recruitment of murine cells *in vivo* to the lung using flow cytometry, after a single intratracheal administration of CCL18 (fig 1c). A notable recruitment of $CD3^+$ cells was observed starting at 5 µg of CCL18, and 48 hours after administration. We also evaluated the recruitment of $CD25^+$ cells to the lungs of naive mice by CCL18 using immunohistochemistry (fig 1d & e). Chemokine administration led to an accumulation of peribronchial $CD25^+$ cells starting at 5 µg, with a more potent effect at 48 hours after injection. In order to get a maximal effect in the murine model of allergic asthma, we chose to inject 10 µg of CCL18 per mice.

CCL18 administration decreases lung inflammation, BAL eosinophilia, and mucus production

In order to evaluate the efficiency of the intratracheal chemokine administration, the

presence of recombinant human CCL18 was assayed by ELISA in sera and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from mice. As expected, high levels of CCL18 were found in BAL of mice that received the chemokine (fig 2a), whereas little or no CCL18 were found in the corresponding control sera (26.52 ± 13.38 pg/mL), suggesting that CCL18 do not or weakly diffuse to the systemic compartment, and that the effects of the chemokine observed in this model must be mainly related to a pulmonary localization. In non sensitized (naive) groups, administration of CCL18 had negligible effect on the recruitment of BAL eosinophils, or mucus hypersecretion (fig2b, 3f). On the other hand, the treatment induced an important recruitment of peribronchial cells (fig 3b) and of lymphocytes in BAL (Fig 2b). Untreated sensitized mice developed BAL eosinophilia and an important mucus hypersecretion and peribronchial inflammation (fig 3c & 3g). In sensitized mice, CCL18 induced a strong inhibition of broncho alveolar eosinophil recruitment (about 45 % of inhibition, fig 2b) but increased the recruitment of lymphocytes. Moreover, the chemokine treatment completely inhibited mucus hypersecretion (fig 3h). This phenomenon was associated with the residual presence of peribronchial cellular infiltrates exhibiting a lymphocytic morphology (fig 3d).

CCL18 inhibits Th2 cytokine lung expression but not the humoral response

To understand the mechanisms by which CCL18 inhibits the inflammation, we evaluated the profile of cytokines produced in the lung of treated mice, in terms of transcripts (fig 4) and protein levels (fig 5). Semi-quantitative PCR on total lung transcripts revealed that the chemokine treatment inhibited the expression of the Th2 cytokines IL4, IL5, IL13, and to a lesser extent the expression of CCL11, a pro-Th2 chemokine known to potently attract eosinophils. In contrast no important variation in IFNγ expression was observed in the lungs of sensitized mice. In order to confirm that the transcriptional repression of the Th2 cytokine genes induced a decrease in protein secretion, cytokine levels were assayed in mice lung extracts (fig 5). Sensitization of mice led to a moderate increase in the amount of Th2 cytokines detected in the lung extracts. However, similarly to the transcripts levels, CCL18 treatment induced a decrease in the proteic level of IL5 (20 %) and IL13 (27 %), and no variation of IFNγ and IL17 production.

As the inhibition of the Th2 response may evoke a poor cellular activation state, the transcriptional activity of isolated lung leukocytes was evaluated (fig 4b). The amount of mRNA isolated per million of lung leucocytes showed that the Th2-driven inflammation induced by the experimental asthma led to an increase in the transcriptional activity of 30 %. Surprisingly, beside the inhibition of Th2 cytokines, CCL18 treatment in sensitized

mice increased by 100 % the amount of transcripts in lung leukocytes, suggesting an active mechanism of repression induced by the chemokine.

Sensitization of mice with ovalbumin induced a strong humoral response (fig 6), with elevated total and OVA-specific seric IgE, concomitantly with an allergen-specific IgG response. According to the Th2 sensitization model, the IgG response was markedly characterized by a preferential production of the IgG1 isotype compared with IgG2a. IgG1 titers were 28 fold higher in sensitized mice than IgG2a, but were comparable in naive mice (IgG1/IgG2a ratio = 1.39 ± 0.90). Administration of CCL18 in naive mice had no effect on the humoral response, with no modification of the immunoglobulin titers. However, CCL18 increased the seric level of total IgE in sensitized mice (+70 %, fig 6a), but had no effect on the titers of allergen-specific IgE. Moreover, the chemokine induced no elevation in the allergen specific IgG response, and no modification in the IgG1/IgG2a ratio (fig 6c).

CCL18 administration abolishes airway hyperresponsiveness

As CCL18 induced a potent inhibition of the Th2-driven inflammation in our model of asthma, it was of first importance to determine if the chemokine treatment was able to confer a protection against airways hyperreactivity (AHR). This major feature of asthma was evaluated using whole-body plethysmography (fig 7) after increasing doses of methacholine challenge. As no difference in the PenH value (an arbitrary value that reflects the resistance of mice airways) was observed after PBS challenge (ie. during baseline assay), the values are indicated as raw PenH. In the experimental model of asthma, metacholine challenges induced a potent and statistically significant increase in the PenH value. In contrast, sensitized mice treated with CCL18 showed an impaired AHR compared with solvent treated mice, with a maximal PenH value statistically comparable to naive mice.

Involvement of nTreg cells

As the administration of CCL18 induced the recruitment of T lymphocytes in naive mice (fig 1a-c) and in BAL from sensitized mice (fig 2b), and because the repression of the Th2 driven inflammation seemed to result from an active mechanism of repression (fig 4b), we evaluated the presence of regulatory T lymphocytes in the lungs and draining lymph nodes of mice. Flow cytometry analysis confirmed the recruitment of $CD4^+$ T cells in both lung and mediastinal lymph nodes (Fig 8a) in CCL18 treated sensitized mice as compared with solvent treated sensitized mice. However, there was no notable increase in the absolute number of T cells bearing a natural regulatory phenotype (ie. cells

$CD3\varepsilon^{+}CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$) in the lung or in mediastinal lymph nodes after CCL18 administration. It is of note that in the lung, a moderate increase in the percentage of nTreg cells among T CD4+ lymphocytes is induced after CCL18 administration that is significant in sensitized mice. However, no increase in this percentage is observed in lymphocytes from lymph nodes. To ascertain the presence of nTreg cells in the lung, the expression of Foxp3, a transcription factor known to drive natural Treg cell differentiation and function, was evaluated by quantitative PCR. No increase in FoxP3 gene expression was observed in lung leucocytes from CCL18 treated sensitized mice compared to solvent treated sensitized mice (fig 8c). This observation Thus, the immune repression observed in our model seemed to act independently of natural regulatory T cells.

Involvement of suppressive mediators

Because immune repression may occur independently of naturally occurring Treg cells under the control of specific mediators, we evaluated the expression of the suppressive cytokines IL10 and TGFβ1. As assessed by RT-PCR in the lung, CCL18 administration to sensitized mice led to the downregulation of the IL10 gene, with a decrease in the amount of transcript compared to solvent-treated mice that is very close to the significant level (fig 9a), whereas the moderate increase in IL10 mRNA in naive groups is not ($p = 0.2000$). Moreover, the proteic expression of IL10 was also inhibited in the lung of sensitized mice after treatment with CCL18. In the lymph nodes, only few $CD4^{+}$ cells expressed intracellular IL10 (fig9b), and no significant increase in the fraction of cells expressing the cytokine was observed in the CCL18 treated sensitized group (solvent: 0.18 ± 0.34; CCL18: 0.53 ± 0.71). Moreover, the ex-vivo culture of lymph nodes in presence of allergen showed a defect in the production of IL10 after CCL18 administration (fig9c). This defect exhibits a profile comparable to the inhibition of IL10 production in the lung, even if it did not reach the significant threshold. For TGFβ1, quantitative PCR demonstrated no induction of TGFβ1 gene in the lung after CCL18 treatment (fig 9d), and no increase in TGFβ1 protein level (either in the active or latent form) in the lung tissue extracts of mice. Moreover, no elevation in the fraction of $CD4^{+}$ T cells expressing membrane-bound TGFβ1 was observed in the lymph nodes (fig 9e), and the ex vivo stimulation of lymph nodes with ovalbumin failed to induce any TGFβ1 secretion in CCL18 treated mice (fig 9f). As for IL10, administration of CCL18 in mice led to impairment in cytokine production after ex-vivo stimulation of the draining lymph nodes. These results suggest that the immune repression of the Th2 response by CCL18

appears independent of TGFβ1 expression.

Involvement of dendritic cells

DCs are central cells involved in the immune response to allergen challenge. CCL18 activates DC as shown by F-actin polymerization. Thus, this chemokine may potentially attract murine DC in vivo. We evaluated the presence and phenotype of these cells in the lung using flow cytometry. Experiments showed an important recruitment of DC to the lung of sensitized mice, strongly increased after CCL18 treatment (fig 10a). Whereas the chemokine attracts DC to the lung, we noticed a significant decrease in the percentage of DC in the draining lymph nodes after CCL18 administration (sensitized, solvent treated mice: 0.69 % ± 0.09; sensitized, CCL18 treated mice: 0.34 % ± 0.07; p = 0.0071; absolute number of DC -43 %). Thus, CCL18 is able to recruit in vivo murine DC, notably by attracting them from draining lymph nodes. Double staining of dendritic cells with SiglecH and 120G8 antibodies to identify pDC showed that there was a modification in the ratio of DC subsets, with more pDC in sensitized than in naive mice. However, a comparable proportion of pDC and mDC were attracted to the lung in CCL18 treated sensitized mice (pDC 93% ± 53, p = 0.0400 vs solvent; mDC 72% ± 4, p = 0.0142 vs solvent), suggesting that CCL18 recruits both DC subsets equally. MHC class II molecule is strongly upregulated in DC during their maturation process, thus we evaluated the presence of poorly mature/mature dendritic cells by differential expression of MHC class II molecules at the surface of DC (fig 10b). According to the sensitization protocol, DC present in the lung of sensitized mice 48 hours after allergenic challenge exhibited a more mature phenotype compared with naive mice, with higher amount of MHC class II molecule at their surface (mean fluorescence intensity +40%). CCL18 treatment did not significantly modify the phenotype of these cells. However, CCL18 treated sensitized mice showed a moderate decrease in the expression of MHC class II at the surface of DC, even if it did not reach statistical significance. Finally, we next evaluated the type of cytokines produced by DC in the lung using intracellular staining (fig 10c). Administration of CCL18 decreased the proportion of lung DC expressing intracellular IL12. This effect was particularly marked in sensitized mice where the chemokine almost completely abolished IL-12 expression. In contrast, chemokine treated mice showed a small but not significant increase in the proportion of lung DC expressing the immunosuppressive cytokine IL10.

Discussion

CCL18 is specifically expressed in the lung and shows ambivalent properties. On one hand, it is found at elevated levels in BAL fluids from allergic asthmatic patients, [10] as well as in the sera and in the lesional skin biopsies from atopic dermatitis patients [20, 21]. Moreover, its secretion is induced *in vitro* in a Th2 cytokine environment, and it attracts Th2 lymphocytes and basophils, suggesting that CCL18 might be an inducer of the asthmatic reaction. On the other hand, CCL18 is produced at late time points by PBMC after allergenic stimulation (48-72 hours), and shows an antagonistic activity on CCR3 at physiologically relevant concentrations [14]. These results indicate that CCL18 might inhibit the eosinophilic recruitment during the late stages of the asthmatic reaction. Moreover, CCL18 production by DC can be induced by the immunosuppressive cytokine IL10 [8, 11], supporting the idea that CCL18 might play a role in an anti-inflammatory context.

Despite the fact that to date, no rodent ortholog of CCL18 has been described, we confirm here previous data showing that CCL18 is able *in vitro* and in vivo to attract murine lymphocytes, demonstrating that a functional receptor for CCL18 exists in mice. In vivo, CCL18 administration led to the recruitment of $CD3^+$ cells, and allowed the accumulation of peribronchial $CD25^+$ cells in naive mice. Moreover, CCL18 was able to induce murine DC cytoskeleton mobilization, suggesting that CCL18 may *in vitro* attract murine DC. As CCL18 has been described to potently attract immature DC [11], these results support the idea that CCL18 has on murine cells chemotactics effects comparable to humans cells, and reenforce the interest of exploring the functionality of this chemokine in a murine model of asthma.

In humans, despite the fact that CCL18 is produced mainly in the lung and that elevated levels of the chemokine are found in sera of patients [21, 22], in mice CCL18 administration did not generate any detectable levels of the chemokine in sera. Two different mechanisms may explain this phenomenon. First, CCL18 may weakly or not diffuse to the systemic compartment, explaining why it was not detectable 48 hours after the last administration. Secondly, CCL18 may diffuse, but remain undetectable because of a strong binding on the tissular/endothelial glycoaminoglycans and/or because of consumption by target cells. Its constitutive expression in human lung probably facilitates the diffusion of the chemokine to the serum, in contrast to an acute administration in mice.

We show in this work that the exogenous administration of CCL18 during allergenic challenge strongly protected sensitized mice from the development of experimental

asthma. This protection was characterized by the repression of the Th2 cytokines, lung inflammation, BAL eosinophilia, mucus hypersecretion, and finally inhibition of AHR. In order to understand the mechanisms of protection induced by CCL18 administration, we evaluated different potential ways of inhibition.

As CCL18 injections induced the accumulation of peribronchial $CD25^+$ cells in naive mice, we considered an active recruitment of natural Treg cells. Indeed, the in vivo recruitment of $CD25^+$ may be related to three possible chemotaxis mechanisms: the first hypothesis is the recruitment of activated T cells in non sensitized mice, despite the fact that CCL18 is known to preferentially recruit naive murine T cells; the second is an active recruitment of non regulatory lymphocytes bearing the CD25+ cell marker (eg. B lymphocytes that are attracted by CCL18); the last one involves the recruitment of natural Treg cells strongly expressing the IL2R. Natural Treg cells have been described to participate in the resolution of the asthmatic reaction in mice [23]. Moreover, the adoptive transfer of $TCD4^+CD25^+$ nTreg is sufficient to reverse a model of experimental murine asthma [24]. In our model, we did not found any specific recruitment of nTreg cells (ie. $TCD4^+CD25^+CD127^-$ cells) in the lung and in the draining lymph nodes of mice that received CCL18. Indeed, despite a moderate increase in the percentage of nTreg among T $CD4^+$ lymphocytes in the lung, no increase in the absolute number of nTreg in the lung of lymph nodes is observed. In addition, we didn't notice any increase in the expression of the Foxp3 gene among the lung leukocytes. This transcription factor is involved in nTreg cell development and function [25], but is also expressed by adaptive Treg cells which are able to suppress lung allergic inflammation [26].

An important mechanism of suppression of the allergic models of asthma by Treg cells is mediated through the synthesis of suppressive cytokines, such as IL10 [23, 24]. IL10 is also expressed in a Th2 context and is known for years to inhibit experimental models of asthma [27] in several ways, including the specific repression of Th2 cytokines, and the inhibition of granulocyte functions [28]. In our model, the IL10 gene was repressed in sensitized mice treated by CCL18 administration, and no increase in the proteic level of this cytokine was observed in the lung. Moreover, the ex-vivo stimulation of the draining lymph nodes with the allergen didn't induce any secretion of IL10, indicating that the mechanisms of protection induced by CCL18 seemed independent of the recruitment or activation of IL10 secreting cells. One another important suppressive mediator described

in murine models of inflammation is TGFβ1. This cytokine appears to be involved in the mechanisms of tolerance towards the aeroallergens, by down-regulating the inflammation especially when expressed in the membrane-bound form by $CD4^+$ T cells [29], but also by converting non regulatory T cells directly [30] or indirectly through antigen presentating cells [31] towards a regulatory or unresponsive phenotype. Recently, a study by Luzina *et al*. showed that adenoviral expression of CCL18 in mouse lung induced the recruitment of immature T lymphocytes that induced a local synthesis of TGFβ by lung fibroblasts [32]. However, in a complementary study, Pochetuhen *et al*. confirmed an ambivalent role of CCL18 in a model of lung fibrosis. On one hand, CCL18 seemed able per se to promote a mild fibrosis without induction of total lung TGFβ, but on the other hand in bleomycine-induced fibrosis, CCL18 inhibited the fibrosis as well as the TGFβ production [33]. In addition to an ambivalent effect depending on the lung inflammatory level, these results show that CCL18 does not seem to be a potent inducer of TGFβ1 in the lung of mice. In our model of Th2 inflammation, we did not find any induction in the production of the suppressive cytokine TGFβ1, at the transcript level, cytokine secretion, or in the membrane-bound form at the surface of $TCD4^+$ cells. Furthermore, no induction of the secretion of TGFβ1 was observed in the draining lymph nodes after administration of CCL18. In our model, CCL18 administrations tended to repress the expression of such cytokines. Thus, the immune suppression seems to act independently of any TGFβ1 or IL10 expression, or of specific recruitment of regulatory T cells.

Another mechanism that might explain the inhibition of the Th2 inflammation is through a modification of the immune polarization. Indeed, it is well-establish that Th1 cells secrete cytokines that antagonize Th2 cell development and function. Moreover, it has been shown that the adoptive transfer of polarized Th1 cells concomitantly with Th2 cells can repress the development of allergic asthma in mice, in an IFNγ-dependent manner [34]. It has been shown that alveolar macrophages stimulated with ovalbumin can promote an inhibitory Th1 response through an IFNγ dependent mechanism, antagonizing the Th2-driven response during the allergenic challenge [35]. Thus, another hypothesis might be a specific activation or sequestration of alveolar macrophages that down-regulate Th2 inflammation by an IFNγ dependent mechanism. However, in our model no switch from a Th2 to a Th1 response seemed to be involved. Indeed beside the

repression of the Th2 cytokines, no increase in IFNγ gene expression or protein secretion was induced in the lung after CCL18 administration. Finally, as DC are pivot cells responsible of the immune polarization, and because IL12 producing DC are known to polarize T lymphocytes towards a Th1 response, even in pre-polarized memory Th2 cells [36], we evaluated the presence of such cells in the lung of mice. However, CCL18 administrations did not increase the amount of IL12 producing DC in the lung, supporting the idea that the inhibition of the Th2 lung inflammation was not related to an increased Th1 response.

More recently, a new subset of polarized lymphocytes, named Th17, has been described. These lymphocytes preferentially secrete IL17, and exhibit pro-inflammatory properties in human allergic asthma [37]. Interestingly in mice, IL17 shows dual properties. Firstly, mice deficient for the IL17 receptor showed a defect in the development of Th2 lung inflammation. Secondly, exogenous administration of IL17 during the effector phase of the model of asthma (ie. during allergen challenge) protected mice from the development of lung eosinophilia and AHR [38]. Because we administered CCL18 prior allergenic challenge, and because the protective effect of the chemokine wasduring the effector phase of the asthma model, we evaluated the potential recruitment of Th17 cells by assaying the level of IL17 in lung extracts. No induction of IL17 secretion was induced by CCL18 treatment.

Surprisingly, despite the transcriptional and proteic repression by CCL18 of most of the assessed cytokines in the lung, the total transcriptional activity of the tissue leukocytes was clearly increased in sensitized mice treated with CCL18. This result suggests the transcriptional activation of target genes, and probably the secretion of specific factors in the lung of mice. It also supports the hypothesis of an active mechanism of suppression of the inflammation located in the lungs, which appears to be independent of any of the suppressive cytokines evaluated in this work.

It is of note that despite a strong inhibition of the Th2 inflammation in the lung no modification of the humoral response was induced by CCL18 administration. In this experimental model of asthma, the primary clonal expansion of anti ovalbumin Th2 cells as well as the class switch and specific IgE and IgG1 synthesis mainly occur during the sensitization phase. During the effector phase of the model (which occurs 20 days after

the first allergenic sensitization), aeroallergens induce a secondary proliferative response of Th2 cells, and the activation of lung mast cells through membrane-bound IgE that promotes lung inflammation. As CCL18 was administered only during the effector phase of the model, it is conceivable to have no modification of the pre-established humoral response.

In this work, we show an active recruitment of murine DC by CCL18. Firstly, CCL18 was able to induce in vitro a rapid mobilization of the cytoskeleton; secondly intratracheal CCL18 administration induced in naive and in sensitized mice the in vivo recruitment of DC. These lungs DC (about 75 000 cells attracted) provided in part from the mediastinal draining lymph nodes where a strong decrease in the number of DC is observed (about 20 000 cells), whereas the rest of the recruited DC might come from the periphery. In humans, CCL18 attracts immature DC [11], and its secretion by these cells is downregulated after DC maturation. Immature DC that weakly express costimulation molecules such as CD80 or CD86 are known to generate poor allergen T cell responsiveness ([39]). In our model, lung DC from CCL18 treated sensitized mice expressed less MHC class II molecules than non treated mice , suggesting that the weak Th2 response in CCL18 treated sensitized mice might in part be related to an immature phenotype of the DC. During the past few years, works have demonstrated that a specific subpopulation of DC, plasmacytoid DC, can potently inhibit asthma. pDC are strong producers of type I IFN after stimulation with viral particles, and thus are mainly involved in antiviral responses [40]. A recent study in mice has demonstrated that pDC can actively uptake aeroallergens in the lung, and migrate to the draining lymph nodes to present antigen to lymphocytes [41]. Interestingly, in this model pDC actively suppressed Th2 responses in the lymph nodes, as well as lung inflammation. The authors of this work suggested that pDC could either induce a poor activation of lymphocytes in relation with their weak expression of costimulatory molecules, or induce the differentiation or activation of Treg cells. It is of note that we previously shown in humans a preferential secretion of CCL18 by pDC rather than by mDC after allergen stimulation. For those reasons, we evaluated if CCL18 may specifically recruit pDC to the lung. In our model, CCL18 induced a potent recruitment of both mDC and pDC, but without predominant effect on a subset.

The last point to consider is a specific cytokine production by DC in our model. We already evoked the pivot role of DC in T cell polarization, depending on its cytokine profile. Even if IL12 producing DC have been suggested to have a central role in Th1 polarization [42], recent works point out the possibility that IL12 may actively favour Th2 lung inflammation, especially during the effector phase of the asthmatic reaction. Indeed, specific neutralization of IL12 during that phase strongly inhibited lung eosinophilia and AHR in mice [43]. In is important to note that in our model, CCL18 administration in sensitized mice induced a strong recruitment of DC that showed very low levels of intracellular IL12. However, in the study by Meyts et al., the active engagement of IL12 in Th2 inflammation is clearly dependent on the secretion of IFNγ, as neutralization of IL12 in IFNγ-/- mice didn't affect the Th2 inflammation. In our study, the absence of a strong decrease in the IFNγ expression in the lung of mice prevents us to clearly link the inhibition of the asthmatic features with a reduced production of IL12 by lung DC. Another way of inhibition dependent on DC phenotype is through the secretion of IL10. Indeed, DC are potentially potent producers of IL10, and a defect in this secretion has been proposed as a worsening mechanism of the allergic responses [44, 45]. Moreover, a localized secretion of IL10 in DC might be undetected by assays on total lung and may explain a down regulation of the Th2 response. However, no important secretion of IL10 by DC attracted by CCL18 was observed in our results. However, the strong accumulation of DC after CCL18 treatment suggests that these cells may constitute an active part of the mechanisms involved in the protective effect.

Finally, the most likely explanation for the inhibition of our model of asthma might be the specific inhibition of eosinophil lung recruitment. Nibbs *et al*. described a specific antagonistic activity of CCL18 on human CCR3, pointing out the potential inhibitory effect of CCL18 in human lung allergic responses. In our model, intratracheal administration of CCL18 in sensitized mice reduced by 45 % the amount of eosinophils in BAL fluids, compared with solvent treated mice. This result suggests that CCL18 may in vivo efficiently inhibit eosinophil recruitment through chemotactic axes such as CCL11/CCR3. Additionally to this eosinophil inhibition, we observed the repression of Th2 cytokines in the lung. Despite an apparent correlation between eosinophilia and Th2 inflammation in our model, it is difficult in our case, however, to clearly identify which

one is the cause or the consequence. Indeed, eosinophils are an abundant source of Th2 cytokines, can present antigen in the draining lymph nodes and promote Th2 inflammation in the lung [46]. However, eosinophils are generally believed to be the very late effectors of the asthmatic reaction, and promote the final alteration of the bronchial epithelium, as well as the tissue remodeling in case of chronic injury. Moreover, neutralization of Th2 cytokines, especially IL5, is known to strongly inhibit eosinophilic recruitment in some models of experimental asthma [47]. Furthermore, the inhibition of eosinophilia in our model was associated with a decrease in mucus hypersecretion, and the inhibition of AHR. The link between eosinophil infiltrates and these two features of asthma has often been a subject of debate. Indeed, the use of mice genetically engineered to be deficient in eosinophils was described to impair mucus hypersecretion and AHR in some reports [48], whereas no relationship between eosinophils and AHR was reported by others [49], maybe in relationship with background strain. However, the inhibition of eosinophil chemotaxis as a cause of the protective effect induced by CCL18 might be an explanation in our experimental model.

In conclusion, this work shows for the first time that human CCL18 can inhibit the cardinal features of asthma, namely lung eosinophilia, mucus hypersecretion and AHR. Moreover, this inhibition is associated with a decrease in the production of Th2 cytokines, such as IL5 and IL13, but also in the suppressive cytokine IL10, whereas no increase in the production of TGFβ1, or any specific recruitment of nTreg cells is observed. Furthermore, we show for the first time that CCL18 can efficiently attract in vivo pDC and mDC. Altogether, these data support the idea that CCL18 has a very complex role in the development of allergic asthma. Until the discovery of the human and murine receptor for CCL18, which will facilitate the understanding of the complex role of this chemokine, complementary exhaustive studies must be performed to evaluate the mechanisms and mediators involved in the suppressive effect that we report her

Legends

Figure 1

Chemotactic activity of recombinant human CCL18 on murine cells. (a) *In vitro* chemotaxis of murine cells. Murine T helper ($CD4^+$ cells) and B ($B220^+$ cells) lymphocytes were purified from spleen from naive Balb/cBYJ mice. Recruitment of cells was evaluated in Boyden's chamber after 2 hours of migration (n = 4 to 6). Hu-CXCL12 and mu-CCL11 were used as positive and negative controls respectively. (b) Cytoskeleton mobilization assessed by F-actin polymerization. Balb/cBYJ splenocytes were activated with huCXCL12 (10^{-8}M) or CCL18 (10^{-8}M), then fixed at different time and stained with Alexa687-Phalloidin and appropriate antibodies. $CD4^+$, CD8□$^+$ and dendritic cells were fluorescence-gated before analysis for phalloidin staining by flow cytometry. Data show one representative experiment out of two. (c) *In vivo* lung recruitment of murine lymphocytes. The percentage of T lymphocytes (CD3□$^+$ cells) present in the lungs was evaluated by flow cytometry 24 and 48 hour after a single intratracheal administration of different doses of CCL18 (n = 2 to 4). (d) Peribronchial recruitment of $CD25^+$ cells. Recruitment of $CD25^+$ cells was evaluated 24 to 48 hours after a single administration of CCL18 by immunohistochemistry using 7D4 mAb (n = 2). (e) Representative sections of lung after immunostaining (magnification : x400). All results are expressed as mean ± SEM.

Figure 2

Effects of intratracheal administrations of CCL18 on experimental murine asthma. (a) Levels of CCL18 found in mice BAL fluids. Samples were obtained 48 hours after the last CCL18 administration, chemokine concentration was evaluated by ELISA (n = 20). (b) BAL fluid cytology. Cells from BAL were enumerated after cytospin and MGG staining (n = 25 to 27).

Figure 3

Histological evaluation of peribronchial lung inflammation and mucus hypersecretion. (a, e) naive mice + solvent. (b, f) naive mice + CCL18. (c, g) sensitized mice + solvent. (d, h) sensitized mice + CCL18. (a-d) HE stain, magnification x500. Arrows underline peribronchial cellular infiltrates. (e-h) PAS stain, magnification x125. Glycogen-rich mucus in the bronchial lumen appears in dark pink (one representative sample out of four per group).

Figure 4

mRNA expression of lung cytokines. (a) Th2, Th1 and CCL11 mRNA expression. 48 hours after the last allergenic challenge, total lung RNA was extracted and evaluated for cytokine expression using RT-PCR. After migration on agarose gel, signal intensity was measured and normalized versus GAPDH expression (n = 4). (b). Transcriptional activity of lung leukocytes. 48 hours after challenge, lung leukocytes were isolated by mechanical and enzymatic dissociation of lung tissue. Total RNA was then extracted and amount of transcripts evaluated using spectrometry assay (n = 10). All results are expressed as mean ± SEM.

Figure 5

Protein levels of lung cytokines. Frozen lungs sampled 48 hours after the last allergenic challenge were minced with detergent/antiproteases. Cytokine levels were then assayed using ELISA technique and are expressed as the percentage of total extracted proteins (n = 5).

Figure 6

Humoral response. (a) Seric total and anti-OVA IgE levels (n = 17 to 20). (b) Anti-OVA IgG1 and IgG2a titers (n = 8 to 12). Bars represent mean of each group (c) Polarization of the humoral response expressed as IgG1/IgG2a seric titer ratio. The results are expressed as mean ± SEM (n = 6 to 12).

Figure 7

Airway hyperreactivity. 48 hours after the last allergenic challenge / CCL18 administration, airway reactivity was evaluated after inhalation of increasing doses of methacholine by whole body plethysmography and Penh (enhanced pause) measurement. Results are expressed as mean ± SEM of raw Penh values (n = 25-27).

Figure 8

Amount of natural occurring Treg cells in the lung and draining lymph nodes. (a) Flow cytometry phenotyping of $CD4^+$ T cells in lung and lymph nodes. After sampling, leukocytes isolated from lung and mediastinal lymph nodes were stained with appropriate antibodies. Treg cells were defined as $CD4^+$ T cells expressing CD25 but not CD127 (n = 13-15). For the lymph nodes of naive mice, bars represent mean value of 3 pools of 4 to 5 mice. (b) Fraction of nTreg cells among T CD4+ lymphocytes (n = 13 to 15). For the lymph nodes of naive mice, each point represents pooled cells from 4-5 mice. (c) Lung

expression of Foxp3. After total lung RNA isolation, two step quantitative RT-PCR was performed using a specific Taqman probe targeting the Foxp3 gene transcript (n = 5-8).

Figure 9

Expression of immunosuppressive cytokines. (a) Lung IL10 expression, evaluated by RT-PCR (n = 4), and ELISA assay (n = 5). (b) Fraction of $CD4^+$ T cells expressing IL10 in draining lymph nodes. In naive mice, each point represents pooled cells from 4-5 mice. After isolation, leukocytes were ex vivo stimulated using PMA/Ionomycine during 3 hours. Cells were then extracellularly stained for CD3 and CD4 expression, and intracellularly stained for IL10 before analysis by flow-cytometry. (n = 13 to 15). (c) Ex-vivo secretion of IL10 by draining lymph nodes. 48 hours after sacrifice, intact LN were cultured in the presence of allergen during 48 hours. IL10 levels were assayed in the culture supernatants by ELISA (n = 5). (d) Lung TGFβ1 expression, evaluated by quantitative RT-PCR (n = 5) and ELISA assay (n = 5). Active and latent forms were differentially evaluated after activation in acidic condition. (e) Fraction of $CD4^+$ T cells expressing membrane-bound TGFβ1. Non stimulated leukocytes isolated from draining lymph nodes were extracellularly stained for CD3 CD4 and TGFβ1 (n = 13 to 15). (f) TGFβ1 production by draining lymph nodes stimulated ex vivo by allergen. LN were sampled and cultured ex vivo as in (c). Latent TGFβ1 was assayed by ELISA. Active TGFβ1 represented only about 0.0001 % of total TGFβ1 detected and thus is not represented (n = 5).

Figure 10

Dendritic cell lung recruitment. (a) Phenotype of DC recruited to the lung. The number of lung DC was determined using flow cytometry. DCs were defined as $CD11c^+$ Ia^{dhi} cells. pDC were defined as the subpopulation of double positive DCs expressing 120G8 and Siglec-H, whereas mDC were defined as double negative cells (n = 7 to 10). (b) Expression of MHC class II at the surface of lung dendritic cells. Level of Ia^d expression on DC is expressed as the mean fluorescence intensity (n = 7 to 10). (c) Intracellular expression of IL12 and IL10 by lung DC. After lung isolation and extracellular staining, non stimulated leukocytes were intracellularly stained for IL10 and IL12 (n = 4).

Figure 1

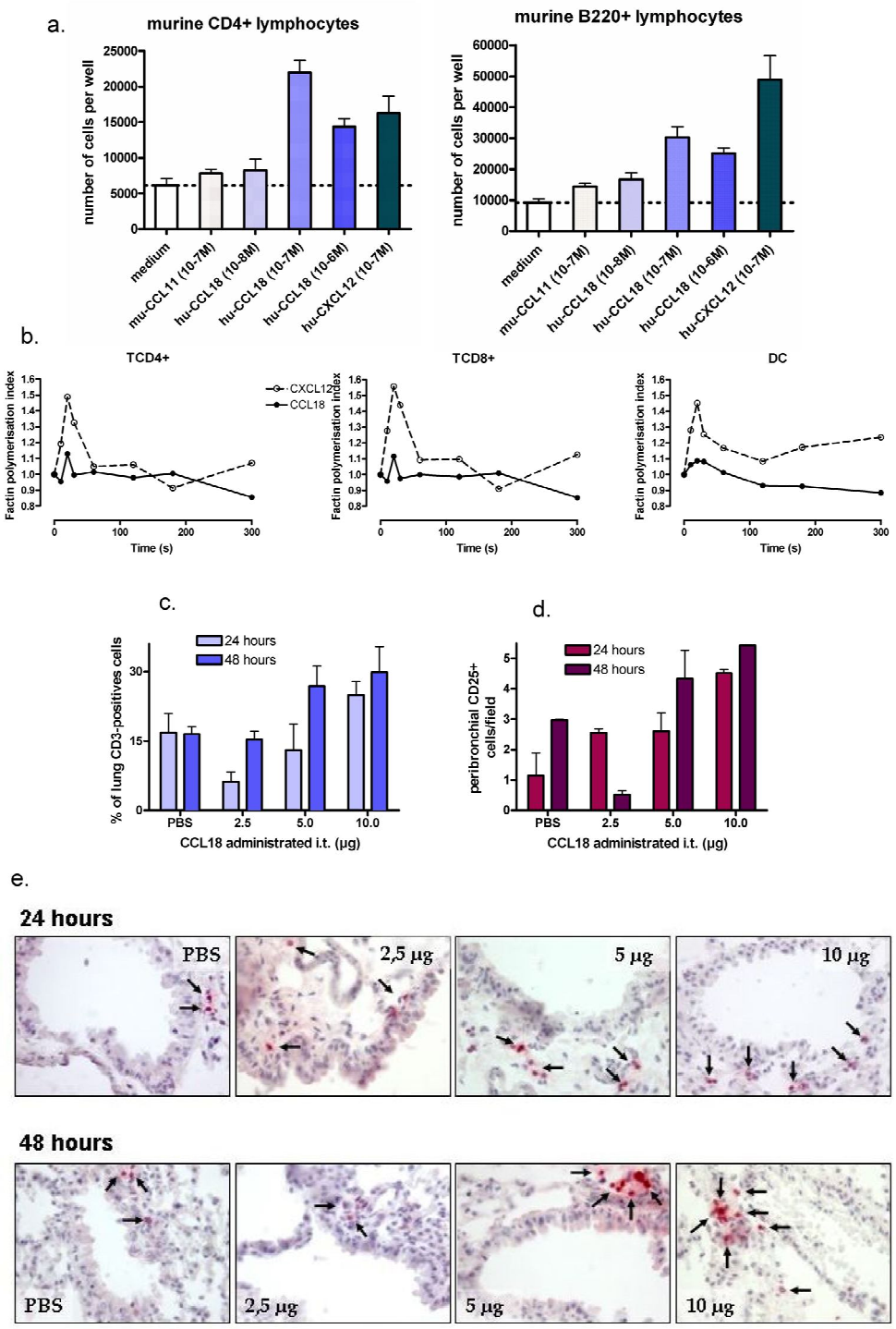
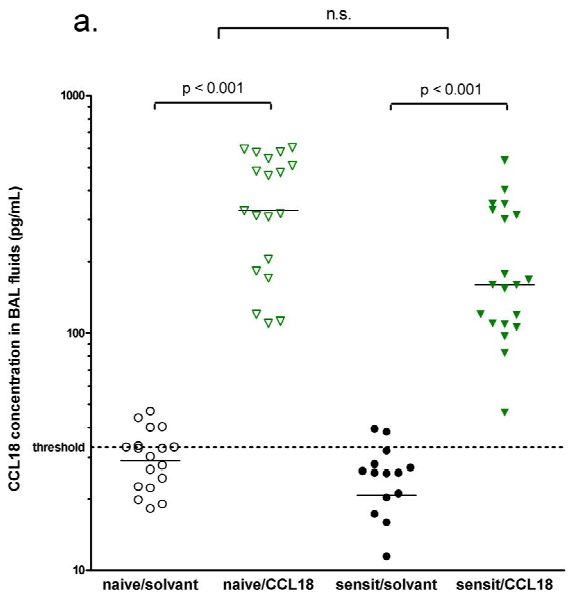

a.
murine CD4+ lymphocytes
number of cells per well
medium
mu-CCL11 (10-7M)
hu-CCL18 (10-8M)
hu-CCL18 (10-7M)
hu-CCL18 (10-6M)
hu-CXCL12 (10-7M)
murine B220+ lymphocytes
b.
TCD4+
TCD8+
DC
CXCL12
CCL18
Factin polymerisation index
Time (s)
c.
24 hours
48 hours
% of lung CD3-positives cells
PBS
2.5
5.0
10.0
CCL18 administrated i.t. (µg)
d.
peribronchial CD25+ cells/field
e.
24 hours
PBS
2,5 µg
5 µg
10 µg
48 hours

Figure 2


a.
n.s.
p < 0.001
p < 0.001
1000
100
threshold
10
CCL18 concentration in BAL fluids (pg/mL)
naive/solvant
naive/CCL18
sensit/solvant
sensit/CCL18

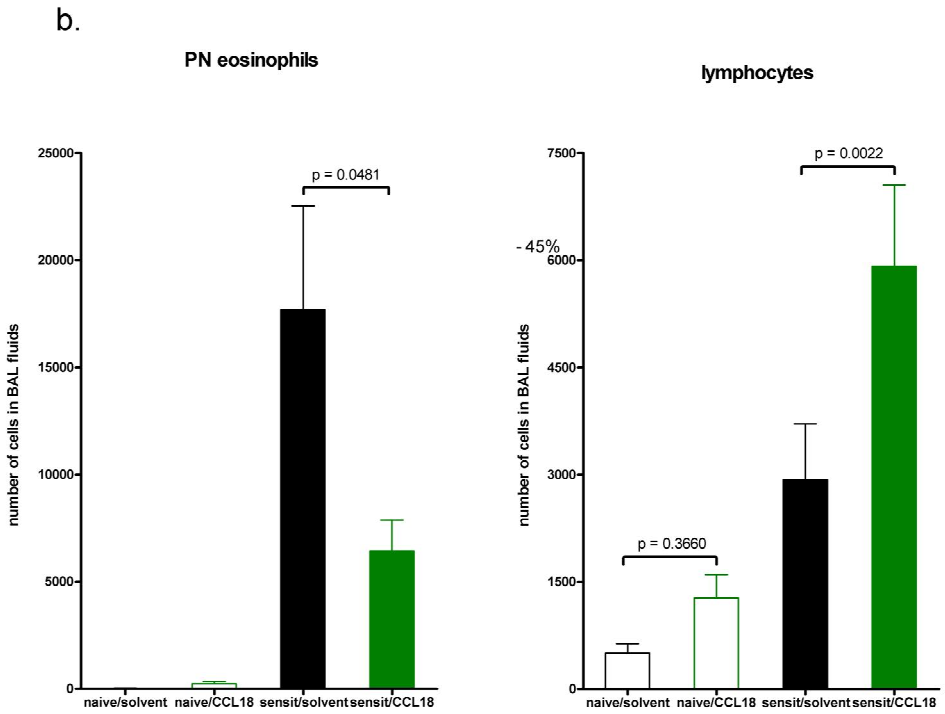

b.
PN eosinophils
lymphocytes
p = 0.0481
p = 0.0022
p = 0.3660
- 45%
25000
20000
15000
10000
5000
0
7500
6000
4500
3000
1500
0
number of cells in BAL fluids
naive/solvant
naive/CCL18
sensit/solvant
sensit/CCL18

Figure 3

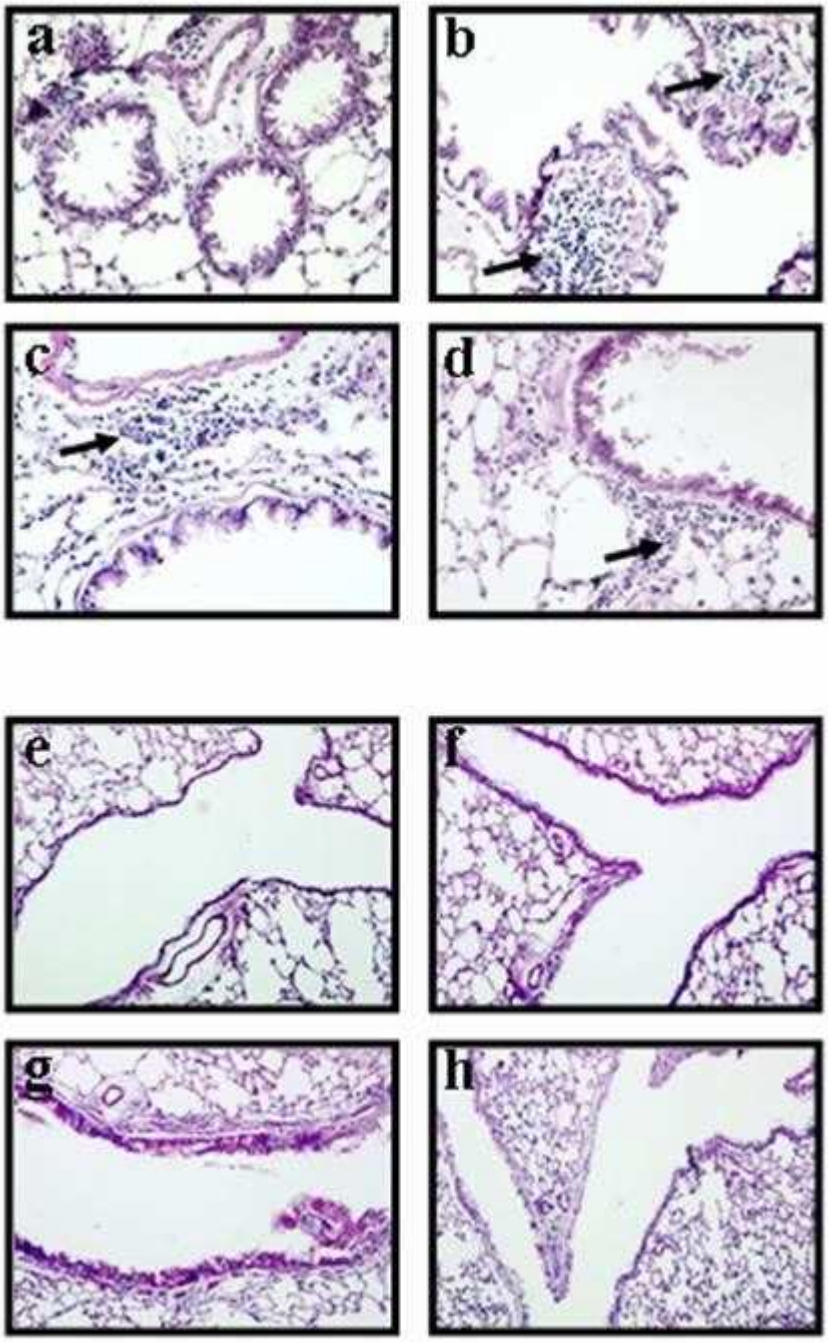


Figure 4

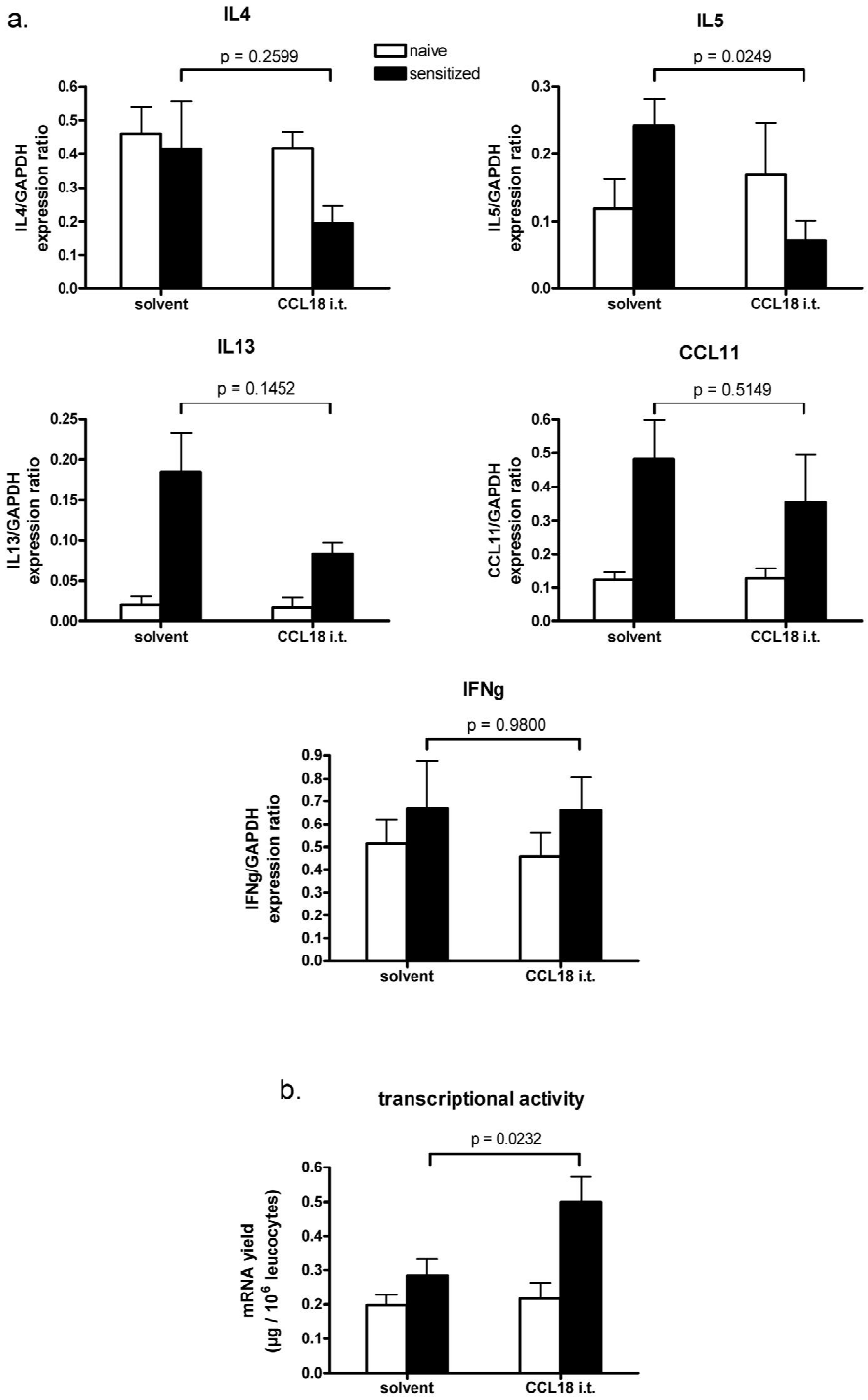

a.
IL4
p = 0.2599
naive
sensitized
IL4/GAPDH expression ratio
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
solvent
CCL18 i.t.
IL5
p = 0.0249
IL5/GAPDH expression ratio
0.3
0.2
0.1
0.0
solvent
CCL18 i.t.
IL13
p = 0.1452
IL13/GAPDH expression ratio
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
solvent
CCL18 i.t.
CCL11
p = 0.5149
CCL11/GAPDH expression ratio
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
solvent
CCL18 i.t.
IFNg
p = 0.9800
IFNg/GAPDH expression ratio
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
solvent
CCL18 i.t.
b.
transcriptional activity
p = 0.0232
mRNA yield
(µg / 10^6 leucocytes)
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
solvent
CCL18 i.t.

Figure 5

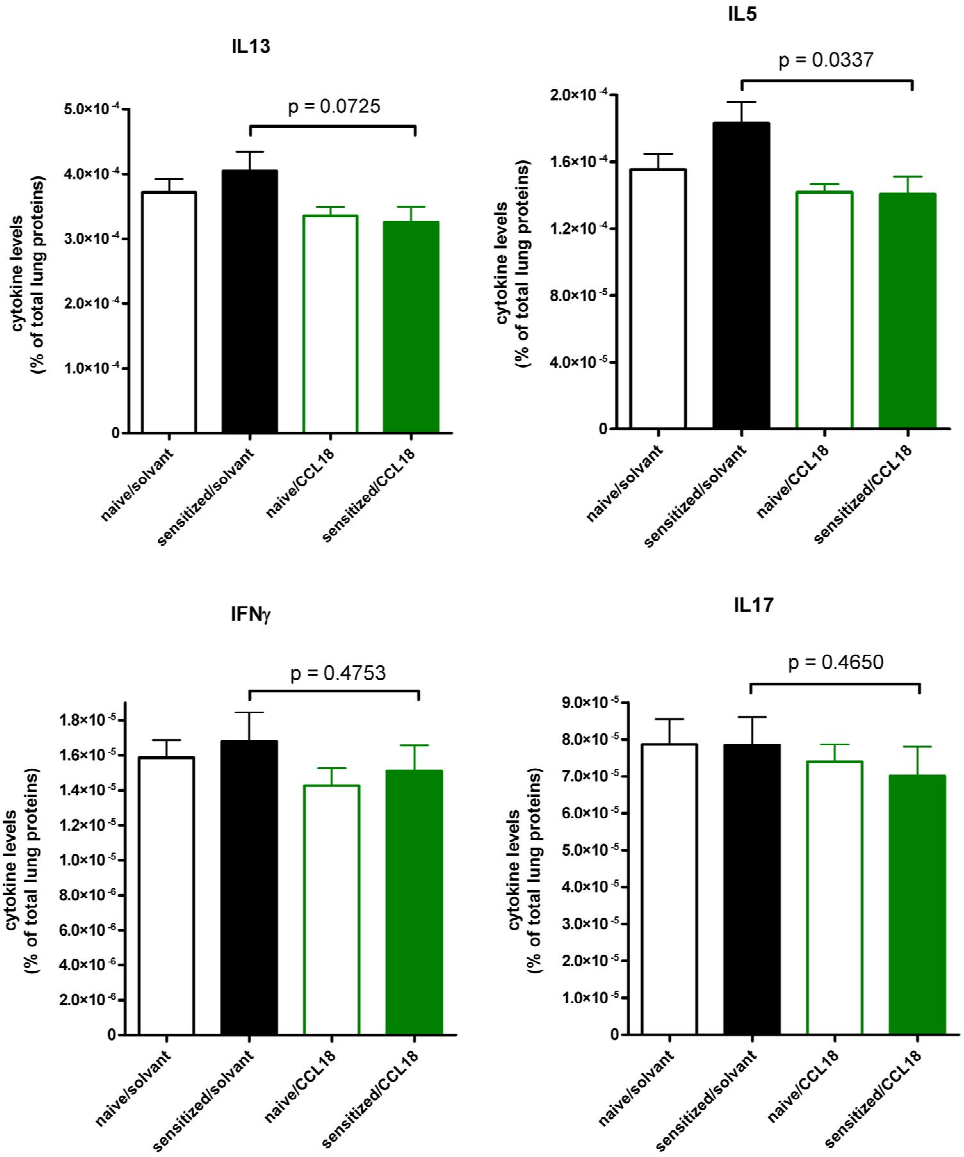

IL13
p = 0.0725
cytokine levels
(% of total lung proteins)
5.0×10⁻⁴
4.0×10⁻⁴
3.0×10⁻⁴
2.0×10⁻⁴
1.0×10⁻⁴
0
naive/solvant
sensitized/solvant
naive/CCL18
sensitized/CCL18
IL5
p = 0.0337
2.0×10⁻⁴
1.6×10⁻⁴
1.2×10⁻⁴
8.0×10⁻⁵
4.0×10⁻⁵
IFNγ
p = 0.4753
1.8×10⁻⁵
1.6×10⁻⁵
1.4×10⁻⁵
1.2×10⁻⁵
1.0×10⁻⁵
8.0×10⁻⁶
6.0×10⁻⁶
4.0×10⁻⁶
2.0×10⁻⁶
IL17
p = 0.4650
9.0×10⁻⁵
8.0×10⁻⁵
7.0×10⁻⁵
6.0×10⁻⁵
5.0×10⁻⁵
4.0×10⁻⁵
3.0×10⁻⁵
2.0×10⁻⁵
1.0×10⁻⁵

Figure 6

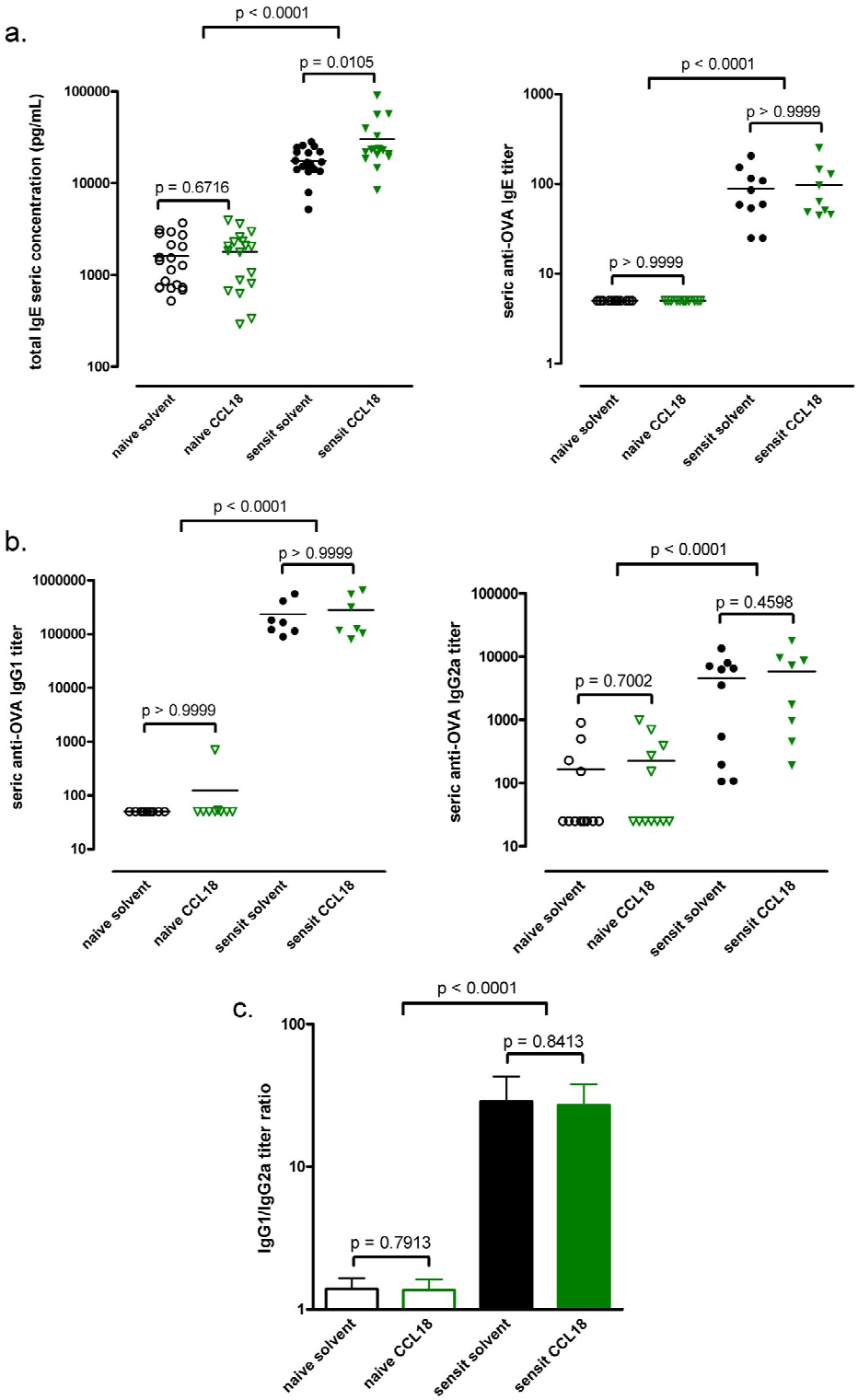

a.
p < 0.0001
p = 0.0105
p = 0.6716
total IgE seric concentration (pg/mL)
100000
10000
1000
100
naive solvent
naive CCL18
sensit solvent
sensit CCL18
p < 0.0001
p > 0.9999
p > 0.9999
seric anti-OVA IgE titer
1000
100
10
1
b.
p < 0.0001
p > 0.9999
p > 0.9999
seric anti-OVA IgG1 titer
1000000
100000
10000
1000
100
10
p < 0.0001
p = 0.4598
p = 0.7002
seric anti-OVA IgG2a titer
100000
10000
1000
100
10
c.
p < 0.0001
p = 0.8413
p = 0.7913
IgG1/IgG2a titer ratio
100
10
1

Figure 7

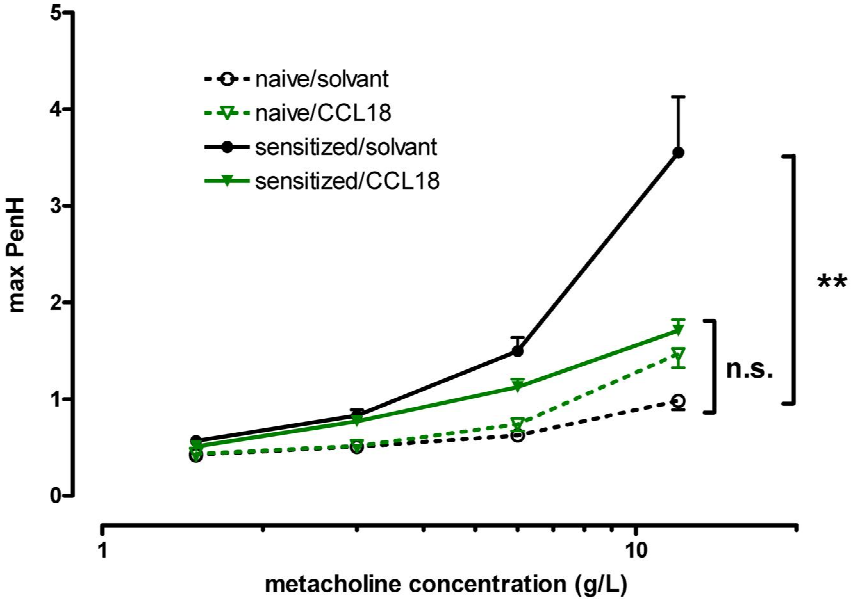

naive/solvant
naive/CCL18
sensitized/solvant
sensitized/CCL18
max PenH
0
1
2
3
4
5
1
10
metacholine concentration (g/L)
n.s.
**

Figure 8

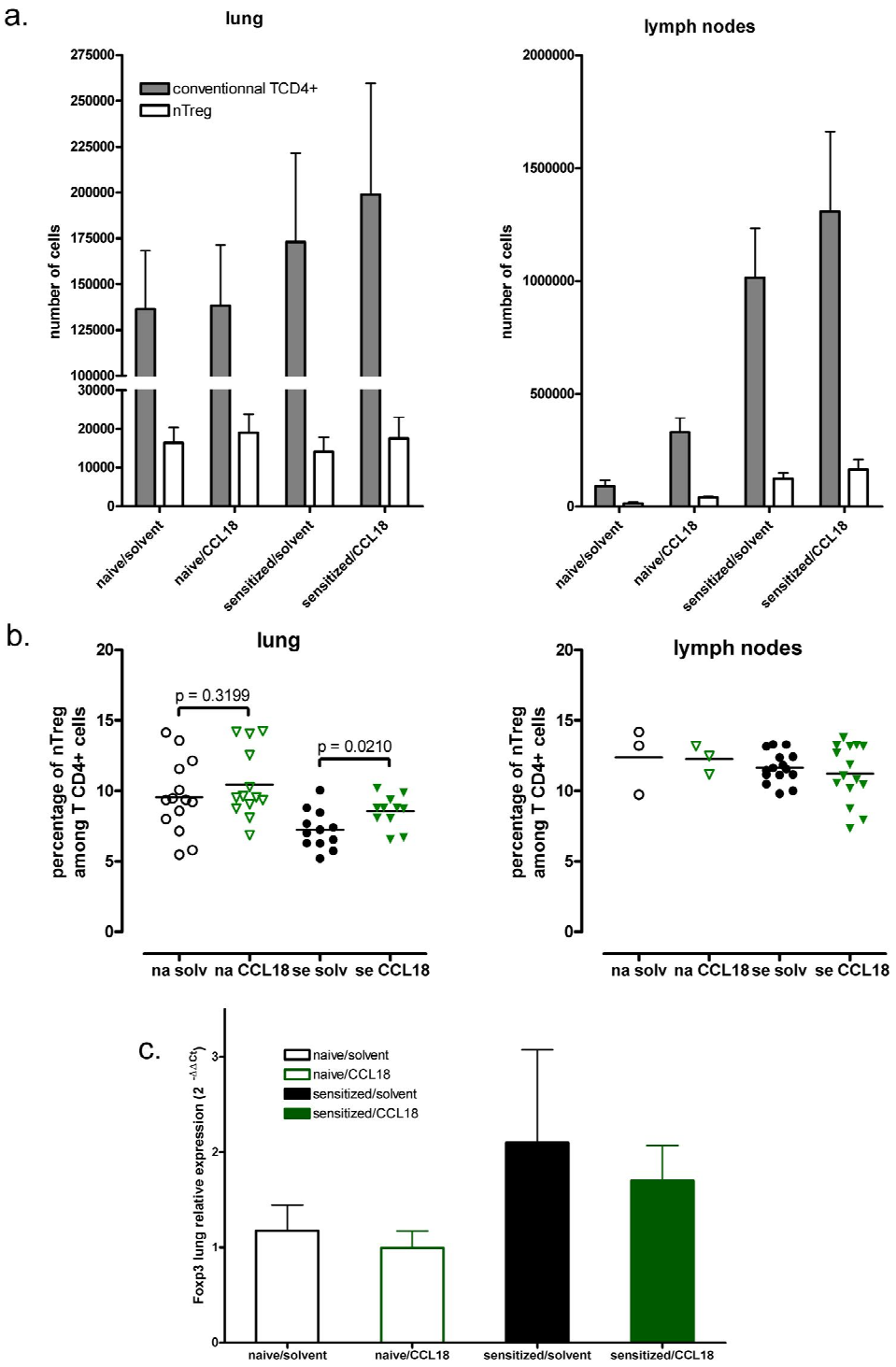

a.
lung
lymph nodes
conventionnal TCD4+
nTreg
number of cells
naive/solvent
naive/CCL18
sensitized/solvent
sensitized/CCL18
b.
lung
lymph nodes
percentage of nTreg among T CD4+ cells
p = 0.3199
p = 0.0210
na solv
na CCL18
se solv
se CCL18
c.
Foxp3 lung relative expression (2 -ΔΔCt)
naive/solvent
naive/CCL18
sensitized/solvent
sensitized/CCL18

Figure 9

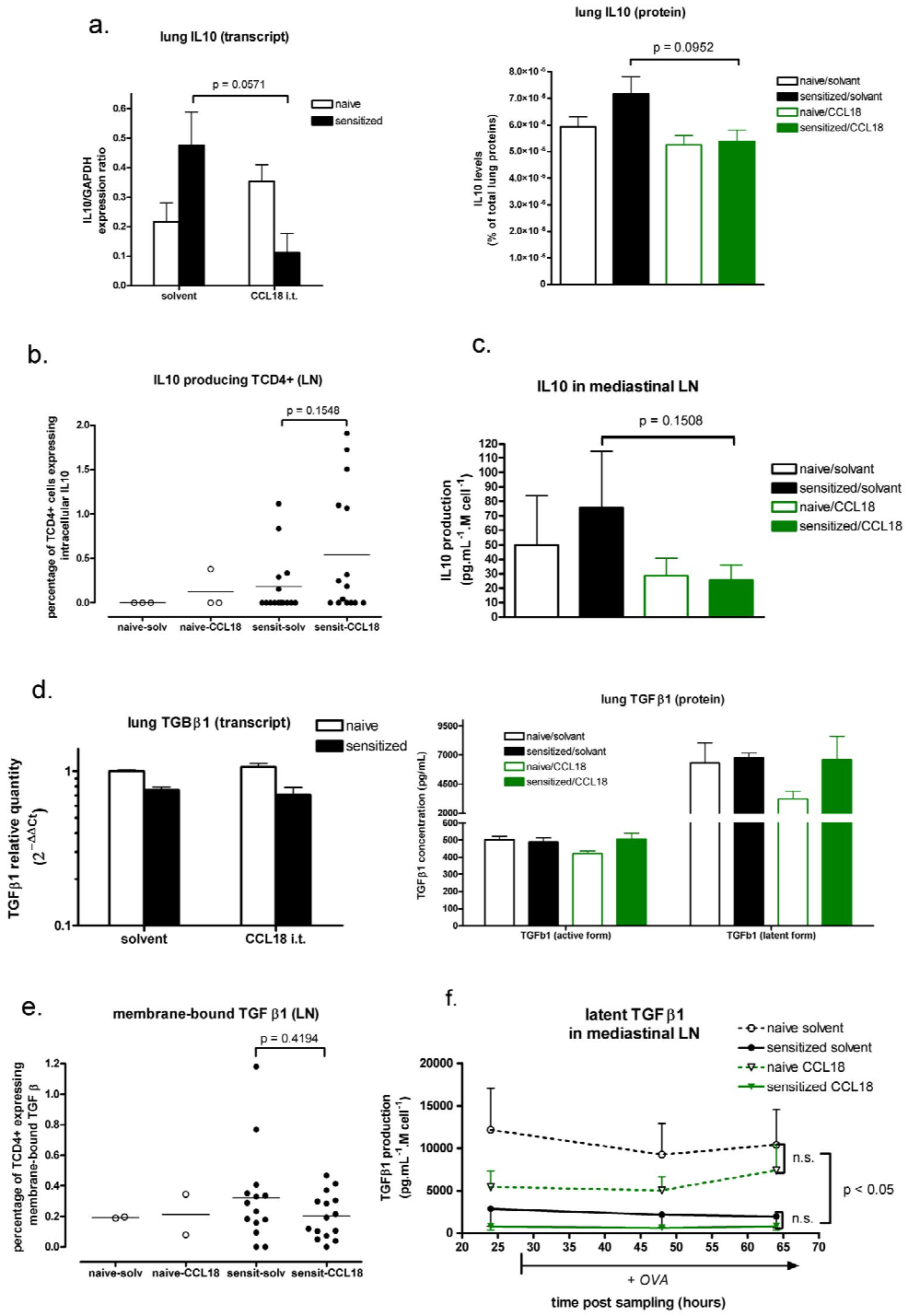
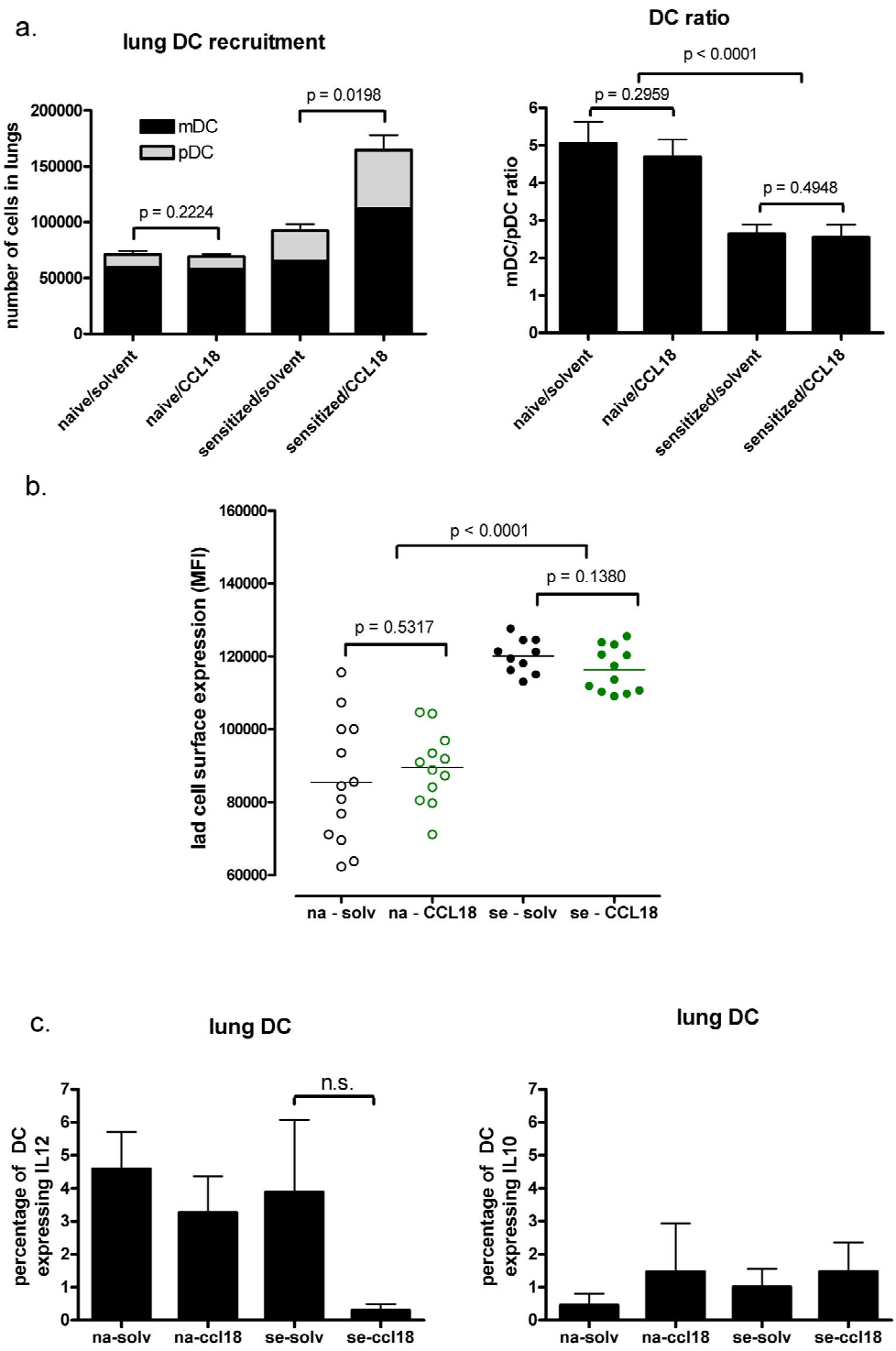

a.
lung IL10 (transcript)
p = 0.0571
naive
sensitized
IL10/GAPDH expression ratio
solvent
CCL18 i.t.
lung IL10 (protein)
p = 0.0952
naive/solvant
sensitized/solvant
naive/CCL18
sensitized/CCL18
IL10 levels (% of total lung proteins)
b.
IL10 producing TCD4+ (LN)
p = 0.1548
percentage of TCD4+ cells expressing intracelluiar IL10
naive-solv
naive-CCL18
sensit-solv
sensit-CCL18
c.
IL10 in mediastinal LN
p = 0.1508
IL10 production (pg.mL-1.M cell-1)
d.
lung TGBβ1 (transcript)
TGFβ1 relative quantity (2-ΔΔCt)
lung TGFβ1 (protein)
TGFβ1 concentration (pg/mL)
TGFb1 (active form)
TGFb1 (latent form)
e.
membrane-bound TGF β1 (LN)
p = 0.4194
percentage of TCD4+ expressing membrane-bound TGF β
f.
latent TGFβ1 in mediastinal LN
naive solvent
sensitized solvent
naive CCL18
sensitized CCL18
TGFβ1 production (pg.mL-1.M cell-1)
n.s.
p < 0.05
+ OVA
time post sampling (hours)

Figure 10


a.
lung DC recruitment
number of cells in lungs
mDC
pDC
p = 0.2224
p = 0.0198
naive/solvent
naive/CCL18
sensitized/solvent
sensitized/CCL18
DC ratio
mDC/pDC ratio
p < 0.0001
p = 0.2959
p = 0.4948
b.
lad cell surface expression (MFI)
p < 0.0001
p = 0.1380
p = 0.5317
na - solv
na - CCL18
se - solv
se - CCL18
c.
lung DC
percentage of DC expressing IL12
n.s.
na-solv
na-ccl18
se-solv
se-ccl18
lung DC
percentage of DC expressing IL10

Bibliography

1. Barnes, P.J., *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 183-92.
2. Costello, P.S., et al., *Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells.* Oncogene, 1996. **13**(12): p. 2595-605.
3. Jongejan, R.C., et al., *Effects of inflammatory mediators on the responsiveness of isolated human airways to methacholine.* Am Rev Respir Dis, 1990. **142**(5): p.1129-32.
4. Smit, J.J. and N.W. Lukacs, *A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses.* Eur J Pharmacol, 2006. **533**(1-3): p. 277-88.
5. Garcia, G., V. Godot, and M. Humbert, *New chemokine targets for asthma therapy.* Curr Allergy Asthma Rep, 2005. **5**(2): p. 155-60.
6. Adema, G.J., et al., *A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells.* Nature, 1997. **387**(6634): p. 713-7.
7. Hieshima, K., et al., *A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes.* J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1140-9.
8. Kodelja, V., et al., *Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern.* J Immunol, 1998. **160**(3): p. 1411-8.
9. Guan, P., et al., *Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18.* Genomics, 1999. **56**(3): p. 296-302.
10. de Nadai, P., et al., *Involvement of CCL18 in allergic asthma.* J Immunol, 2006. **176**(10): p. 6286-93.
11. Vulcano, M., et al., *Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells.* J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3843-9.
12. Bellinghausen, I., et al., *Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10- treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells.* J Allergy Clin Immunol, 2001. **108**(2): p. 242-9.
13. Adachi, M., et al., *IL-10 induces a Th2 cell tolerance in allergic asthma.* Int Arch Allergy Immunol, 1999. **118**(2-4): p. 391-4.
14. Nibbs, R.J., et al., *C-C chemokine receptor 3 antagonism by the beta-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino- terminal alanine-methionine swap.* J Immunol, 2000. **164**(3): p. 1488-97.
15. Nomiyama, H., et al., *Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC chemokines: diversification between the two species.* Genes Immun, 2001. **2**(2): p. 110-3.
16. Tasaki, Y., et al., *Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes.* Genomics, 1999. **55**(3): p. 353-7.
17. Bruna-Romero, O., et al., *The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell- derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria.* J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3195-203.
18. Lindhout, E., et al., *The dendritic cell-specific CC-chemokine DC-CK1 is expressed by germinal center dendritic cells and attracts CD38-negative mantle zone B lymphocytes.* J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3284-9.
19. Hamelmann, E., et al., *Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography.*Am J Respir Crit Care Med, 1997.**156**(3 Pt 1): p. 766-75.
20. Gunther, C., et al., *CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells.* J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1723-8.
21. Park, C.O., et al., *Increased expression of CC chemokine ligand 18 in extrinsic atopic dermatitis patients.* Exp Dermatol, 2008. **17**(1): p. 24-9.
22. Momohara, S., et al., *High CCL18/PARC expression in articular cartilage and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis.* J Rheumatol, 2007. **34**(2): p. 266-71.
23. Leech, M.D., et al., *Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells.* J Immunol, 2007. **179**(10): p. 7050-8.
24. Kearley, J., D.S. Robinson, and C.M. Lloyd, *CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling.* J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(3): p. 617-24 e6.

25. Ono, M., et al., *Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 685-9.
26. Curotto de Lafaille, M.A., et al., *Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation*. Immunity,2008. **29**(1): p. 114-26.
27. Zuany-Amorim, C., et al., *Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2644-51.
28. Oh, J.W., et al., *CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(3): p. 460-8.
29. Ostroukhova, M., et al., *Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 28-38.
30. Fantini, M.C., et al., *Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7*. J Immunol, 2004. **172**(9): p. 5149-53.
31. Luo, X., et al., *Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A,2007. **104**(8): p. 2821-6.
32. Luzina, I.G., et al., *Induction of prolonged infiltration of T lymphocytes and transient T lymphocyte-dependent collagen deposition in mouse lungs following adenoviral gene transfer of CCL18*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2643-55.
33. Pochetuhen, K., et al., *Complex regulation of pulmonary inflammation and fibrosis by CCL18*. Am J Pathol, 2007. **171**(2): p. 428-37.
34. Cohn, L., et al., *T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production*. J Exp Med, 1999. **190**(9): p. 1309-18.
35. Tang, C., et al., *Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2- mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 1471-81.
36. Radhakrishnan, S., et al., *Induction of a Th1 response from Th2-polarized T cells by activated dendritic cells: dependence on TCR:peptide-MHC interaction, ICAM-1, IL-12, and IFN-gamma*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3583-92.
37. Bullens, D.M., et al., *IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?* Respir Res, 2006. **7**: p. 135.
38. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
39. Delgado, M., et al., *VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1122-30.
40. Wang, H., N. Peters, and J. Schwarze, *Plasmacytoid dendritic cells limit viral replication, pulmonary inflammation, and airway hyperresponsiveness in respiratory syncytial virus infection*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6263-70.
41. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 89-98.
42. Kuipers, H., et al., *Dendritic cells retrovirally overexpressing IL-12 induce strong Th1 responses to inhaled antigen in the lung but fail to revert established Th2 sensitization*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(5): p. 1028-38.
43. Meyts, I., et al., *IL-12 contributes to allergen-induced airway inflammation in experimental asthma*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 6460-70.
44. Chen, X.Q., et al., *Increased expression of CD86 and reduced production of IL-12 and IL-10 by monocyte-derived dendritic cells from allergic asthmatics and their effects on Th1- and Th2-type cytokine balance*. Respiration, 2006. **73**(1): p. 34-40.
45. Hellings, P.W., et al., *IL-10- and IL-12-independent down-regulation of allergic sensitization by stimulation of CD40 signaling*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5138-44.
46. Shi, H.Z., et al., *Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils*. J Clin Invest, 2000. **105**(7): p. 945-53.
47. Tanaka, H., et al., *Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004. **31**(1): p. 62-8.
48. Lee, J.J., et al., *Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils*. Science, 2004. **305**(5691): p. 1773-6.
49. Humbles, A.A., et al., *A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling*. Science, 2004. **305**(5691): p. 1776

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les chimiokines fournissent des indices directionnels qui assurent le trafic cellulaire, permettant le positionnement temporel et spatial des leucocytes. La présence et la distribution dynamique et polarisée des récepteurs aux chimiokines ainsi que les concentrations optimales du ligand assurent une bonne corrélation entre l'amplitude de la réponse et sa spécificité. Ainsi le recrutement différentiel et quantitatif des cellules vers un site précis conditionnent le type de réponse immune déclenchée. Dorénavant, il est évident que les chimiokines jouent un rôle plus large dans la réponse immune en activant et différentiant certaines cellules du système immunitaire [Braun, 2000] [Cappello, 2006] [Marsland, 2005] [Taub, 1996] [Bacon, 1995] [Molon, 2005]. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des effets immunobiologiques et chimio-attractants du CCL18, *in vitro* et *in vivo*. Il a été montré au laboratoire et par d'autres équipes une augmentation du CCL18 dans les maladies allergiques, notamment l'asthme et la dermatite atopique [Gunther, 2005] [de Nadai, 2006] [Hon, 2011]. Par conséquent, nous avons comparé les effets de CCL18 sur la réponse immune selon le statut atopique des donneurs.

Nous avons évalué l'effet direct du CCL18 sur la polarisation de la réponse T [Article I]. Le prétraitement de Lc T mémoires $CD4^+CD25^-$ de sujets non allergiques avec le CCL18 conduit à la génération de Lc T régulateurs $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ produisant de l'IL-10 et du TGF-β et fonctionnellement capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs $CD4^+CD25^-$par un mécanisme dépendant à la fois des cytokines et d'un contact cellulaire. L'effet indirect de CCL18 sur la polarisation de la réponse T via la DC a été également étudié [Article II]. La différenciation de monocytes de sujets sains en présence de GM-CSF et CCL18 conduit au développement de DC de phénotype semi-mature, exprimant le CCR7 et produisant la cytokine immunorégulatrice IL-10 et l'enzyme 2,3-indoleamine dioxygenase. Ces DC en coculture avec les Lc T naïfs allogéniques de sujets non allergiques induisent le développement de Lc T régulateurs de type Tr1 qui produisent de l'IL-10 et sont capables d'inhiber la prolifération de Lc T effecteurs, par un mécanisme dépendant des cytokines. Lorsque les monocytes et les Lc T mémoires proviennent de patients allergiques, l'effet tolérogène de CCL18 est perdu probablement suite à la diminution observée de la fixation de CCL18 à son récepteur

putatif. Nous avons montré qu'un traitement, avec de faibles concentrations (10^{-10}M) et pendant un temps court (2h30), des Lc T mémoires avec du CCL18 était suffisant pour générer des Lc T régulateurs fonctionnels. Le CCL18 est exprimé fortement dans les poumons et de façon moindre dans les organes lymphoïdes secondaires [Hieshima, 1997]. Par conséquent, il est probable qu'*in vivo* un passage rapide dans les organes lymphoïdes et des doses minimes de CCL18 soient suffisants. A contrario, la différenciation des DC régulatrices a nécessité de grandes concentrations de CCL18 (10^{-7}M) et un traitement long (5 Jours). Ces concentrations élevées peuvent être atteintes dans les poumons [Hieshima, 1997], où CCL18 est exprimée de façon constitutive. Ainsi, il a été montré que les macrophages alvéolaires produisent des niveaux élevés de CCL18 [Kodelja, 1998]. Le monocyte est une cellule sanguine immature de la famille des leucocytes, qui provient de la moelle osseuse. Ces cellules se différencient dans les tissus où elles résident, et sont ainsi à l'origine des macrophages et des DC. On peut imaginer que les monocytes recrutées dans le poumon baignent dans un environnement riche en GM-CSF produit par les cellules épithéliales bronchiques et en CCL18 secrété par les macrophages alvéolaires. Ainsi stimulés, ils se différencieraient en DC semi matures, exprimant les molécules de costimulation et de CMH de classe II à des niveaux intermédiaires. Or une stimulation répétée de Lc T naïfs par des DC immatures conduit à la génération de Lc T à activité régulatrice. Ces DC différenciées en présence de CCL18 malgré leur caractère semi-mature sont potentiellement capables de quitter les épithélia pour les organes lymphoïdes grâce à l'expression du CCR7. La présence de ce genre de DC dans les organes lymphoïdes en contact avec les Lc T naïfs conduirait à une réponse régulatrice. De plus, ces DC produisent de l'IL-10 et expriment IDO. Cette enzyme est impliquée dans le catabolisme oxydatif du tryptophane et joue un rôle essentiel dans la régulation des Lc T. Les modifications biochimiques dues au catabolisme du tryptophane ont des effets profonds sur la prolifération, la différenciation, les fonctions effectrices, et la viabilité des Lc T [Chung, 2009] [Mellor, 2004] [Puccetti, 2007]. Nos études montrent donc un effet immunobiologique régulateur d'une chimiokine, un concept très nouveau dans l'étude de ces molécules. Très récemment une autre chimiokine, XCL1, a été impliquée dans le développement de Lc T régulateurs par les DC thymiques. Celles-ci expriment le récepteur XCR1, tandis que les cellules épithéliales thymiques médullaires expriment son ligand XCL1. Les souris déficientes en XCL1 présentent un défaut d'accumulation de DC et de génération de cellules T régulatrices naturelles dans le

thymus [Lei, 2011]. Un rôle régulateur de CCL18 pourrait même être envisagé dans ce contexte, au vue de sa forte expression au niveau thymique [Hieshima, 1997].
En parallèle de ces études extra chimiotactiques de CCL18, nous avons gardé en tête la fonctionnalité d'attraction qui caractérise cette molécule. Nous avons montré *in vitro* que le CCL18 pourrait également jouer un rôle dans la résolution de la réaction allergique par un effet chimiotactique vis-à-vis d'une sous population de Lc T régulateurs $CD4^{+}CD25^{high}CD127^{low}LAP^{+}CCR4^{+}$ qui n'expriment pas le facteur de transcription Foxp3 [Article III]. Ces cellules sont capables de produire de l'IL-10 et du TGF-β1, aussi bien que de l'IL-4. Elles inhibent la prolifération de Lc T effecteurs $CD4^{+}CD25^{-}$ par un mécanisme dépendant de l'IL-10. Cette attraction a été vérifié *in vivo* dans un modèle de souris SCID greffées avec de la peau humaine et reconstituées avec des PBMC autologues. Chez ces souris, l'injection intradermique de CCL18 conduit au recrutement cutané de cellules $CD4^{+}$ $CD25^{+}$ IL-4^{+} et IL-10^{+} mais pas de cellules $Foxp3^{+}$. Ces données suggèrent que CCL18 peut contribuer à maintenir la tolérance et/ou supprimer l'inflammation locale en attirant les Lc T régulateurs dans les tissus. Ainsi, il a été montré que la chimiokine XCL1 pouvait chez l'homme participer à la répression de l'inflammation asthmatique en augmentant l'activité cytotoxique des cellules régulatrices par induction directe de la production de granzyme A [Nguyen, 2008]. Une étude plus exhaustive des médiateurs cytotoxiques dans notre modèle pourrait démontrer la mise en place de voies de régulation impliquant ce type d'intermédiaires moléculaires.

Dans une autre étude *in vivo* utilisant un modèle d'asthme allergique chez la souris, l'administration intratrachéale de la chimiokine, permettant de mimer son expression préférentiellement pulmonaire, a permis d'évaluer son rôle dans l'inflammation asthmatique [Article IV]. Le gène de CCL18 est présent uniquement chez les primates. La capacité de CCL18 humain à recruter des lymphocytes murins a donc été vérifiée expérimentalement *in vitro* et *in vivo* conformément à ce qu'est décrit dans la littérature [Bruna-Romero, 2003]. Après sensibilisation, la présence de CCL18 au niveau pulmonaire permet aux animaux de développer un état de tolérance vis-à-vis de l'allergène inhalé. D'un point de vue fonctionnel, l'administration pulmonaire de CCL18 à des animaux sensibilisés inhibe le développement de la réaction asthmatique en diminuant l'inflammation pulmonaire (réduction de l'infiltration éosinophilique, inhibition de la production locale de cytokines Th2) et les protège contre l'altération de leur fonction respiratoire (inhibition de l'hyperréactivité bronchique et de l'hypersécrétion

de mucus). Toutefois, les mécanismes cellulaires à l'origine de cette protection semblent indépendants des grandes voies de régulations. Effectivement, dans ce modèle aucun recrutement spécifique de Lc T régulateurs n'a été détecté. Les DC sont fortement recrutées, par contre leur type et leur phénotype n'expliquent pas l'effet inhibiteur. Différentes hypothèses peuvent expliquer le mécanisme anti-inflammatoire de CCL18 dans ce modèle. Tout d'abord l'activité antagoniste du CCL18 vis-à-vis du CCR3 [Nibbs, 2000] pourrait empêcher le recrutement des éosinophiles au niveau pulmonaire. Nous avons également détecté une baisse des Lc T $CCR3^+$ après administration du CCL18. En effet, l'attraction des éosinophiles au niveau pulmonaire est spécifique du CCR3 dans un contexte Th2, avec un rôle prépondérant du CCL11 [Fulkerson, 2006]. Or, aucune diminution ou inhibition de CCL11 n'a été observée dans notre modèle. Les éosinophiles constituent une source importante d'IL-5, et donc participent à l'établissement d'une réponse Th2 [Shi HZ, 2004]. Leur absence pourrait ainsi expliquer la baisse des cytokines Th2 dans notre modèle. En marge de l'inhibition du recrutement des éosinophiles et des Lc T Th2, l'accumulation potentielle des Lc T naïfs, préférentiellement attirés par le CCL18 [Adema, 1997], pourrait également limiter le développement d'une réponse inflammatoire. En effet, la proximité de Lc T naïfs et de DC immatures dans un tissu conduit à une tolérance [Jonuleit 2000] [Steinman, 2002] [Dhodapkar, 2001]. Dans notre étude, le nombre de Treg n'est pas augmenté mais il est possible qu'ils soient plus fonctionnels.

Par ses effets immunorégulateurs, le CCL18 pourrait participer à l'effet d'un anti-inflammatoire puissant exploité en clinique : les glucocorticoïdes (GC). Le promoteur du gène CCL18 possède une séquence de liaison au GC récepteur. Les patients traités par la Dexamethasone (Dex) présentent des taux de CCL18 augmentés dans le sérum [de Nadai, 2006]. Nous avons montré que Dex potentialise la sécrétion de CCL18 en réponse à l'IL-4 et l'IL-10 par les PBMC et les monocytes de sujets allergiques ou non allergiques et ceci de façon dose dépendante [article en préparation].

L'ensemble de ces études montre pour la première fois que CCL18 est capable d'induire le développement d'une réponse tolérogénique. Cependant, cette fonction est absente chez les donneurs allergiques qui présentent un défaut de liaison du CCL18 à son récepteur, ce qui pourrait participer à la diminution de la tolérance observée dans les maladies allergiques. Ces données révèlent un potentiel thérapeutique de CCL18 et de

son récepteur. Désormais les efforts devraient se concentrer sur l'identification de ce récepteur et sa régulation. Il pourrait s'agir du PITPNM3 très récemment montré comme étant un récepteur fonctionnel de CCL18 [Chen, 2011] présent sur les cellules cancéreuses mammaires, ce qui n'exclut pas la présence d'autres récepteurs GPCR simples ou en combinaison plus complexe (dimère de la même famille de récepteur de chimiokines, de familles différentes [Sohy, 2009] ou encore un récepteur de chimiokine avec une autre molécule membranaire).

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

Abi-Younes, S., M. Si-Tahar, et al. (2001). "The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation via CCR4." Thromb Res **101**(4): 279-89.

Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-46.

Adachi, T., R. Vita, et al. (2001). "The functional role of rho and rho-associated coiled-coil forming protein kinase in eotaxin signaling of eosinophils." J Immunol **167**(8): 4609-15.

Adema, G. J., F. Hartgers, et al. (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." Nature **387**(6634): 713-7.

Adler, A. J., D. W. Marsh, et al. (1998). "CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells." J Exp Med **187**(10): 1555-64.

Adorini, L., N. Giarratana, et al. (2004). "Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells." Semin Immunol **16**(2): 127-34.

Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem **278**(3): 1910-4.

Akbari, O., R. H. DeKruyff, et al. (2001). "Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen." Nat Immunol **2**(8): 725-31.

Akbari, O., G. J. Freeman, et al. (2002). "Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity." Nat Med **8**(9): 1024-32.

Akdis, C. A., A. Joss, et al. (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, et al. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." J Exp Med **199**(11): 1567-75.

Allavena, P., L. Piemonti, et al. (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.

Allen, S. J., S. E. Crown, et al. (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol **25**: 787-820.

Anderson, H. A., E. M. Hiltbold, et al. (2000). "Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation." Nat Immunol **1**(2): 156-62.

Andrews, R. P., M. B. Ericksen, et al. (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.

Annesi-Maesano, I., S. Kalaboka, et al. (2008). "[Is asthma still a life-threatening disease?]." Presse Med **37**(1 Pt 2): 107-15.

Aoudjehane, L., A. Pissaia, Jr., et al. (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.

Arock, M., C. Zuany-Amorim, et al. (1996). "Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells." Eur J Immunol **26**(1): 166-70.

Atamas, S. P., I. G. Luzina, et al. (2003). "Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(6): 743-9.

Babina, M., S. Guhl, et al. (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.

Bacon, K. B., B. A. Premack, et al. (1995). "Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES." Science **269**(5231): 1727-30.

Balbo, P., M. Silvestri, et al. (2001). "Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma." Clin Exp Allergy **31**(4): 625-36.

Ballesteros, J. A., A. D. Jensen, et al. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J Biol Chem **276**(31): 29171-7.

Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

Bartz, H., T. Rothoeft, et al. (2003). "Large-scale isolation of immature dendritic cells with features of Langerhans cells by sorting CD34+ cord blood stem cells cultured in the presence of TGF-beta1 for cutaneous leukocyte antigen (CLA)." J Immunol Methods **275**(1-2): 137-48.

Bazan, J. F., K. B. Bacon, et al. (1997). "A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif." Nature **385**(6617): 640-4.

Benoit, M., B. Barbarat, et al. (2008). "Coxiella burnetii, the agent of Q fever, stimulates an atypical M2 activation program in human macrophages." Eur J Immunol **38**(4): 1065-70.

Berkman, N., P. J. Jose, et al. (1995). "Corticosteroid inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha in human monocytes and alveolar macrophages." Am J Physiol **269**(4 Pt 1): L443-52.

Bimczok, D., A. Post, et al. (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.

Bishop, B. and C. M. Lloyd (2003). "CC chemokine ligand 1 promotes recruitment of eosinophils but not Th2 cells during the development of allergic airways disease." J Immunol **170**(9): 4810-7.

Blom, B., S. Ho, et al. (2000). "Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(12): 1785-96.

Boasen, J., D. Chisholm, et al. (2005). "House dust extracts elicit Toll-like receptor-dependent dendritic cell responses." J Allergy Clin Immunol **116**(1): 185-91.

Boitano, S., A. N. Flynn, et al. "Alternaria alternata serine proteases induce lung inflammation and airway epithelial cell activation via PAR2." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **300**(4): L605-14.

Boot, R. G., M. Verhoek, et al. (2004). "Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention." Blood **103**(1): 33-9.

Boshoff, C., Y. Endo, et al. (1997). "Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines." Science **278**(5336): 290-4.

Boven, L. A., M. van Meurs, et al. (2004). "Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages." Am J Clin Pathol **122**(3): 359-69.

Braun-Fahrlander, C., J. Riedler, et al. (2002). "Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children." N Engl J Med **347**(12): 869-77.

Braun, M. C., E. Lahey, et al. (2000). "Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants." J Immunol **164**(6): 3009-17.

Brawand, P., D. R. Fitzpatrick, et al. (2002). "Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs." J Immunol **169**(12): 6711-9.

Brinkman, J., F. A. Wijburg, et al. (2005). "Plasma chitotriosidase and CCL18: early biochemical surrogate markers in type B Niemann-Pick disease." J Inherit Metab Dis **28**(1): 13-20.

Broeren, C. P., G. S. Gray, et al. (2000). "Costimulation light: activation of CD4+ T cells with CD80 or CD86 rather than anti-CD28 leads to a Th2 cytokine profile." J Immunol **165**(12): 6908-14.

Bromley, S. K., T. R. Mempel, et al. (2008). "Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic." Nat Immunol **9**(9): 970-80.

Bruna-Romero, O., J. Schmieg, et al. (2003). "The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria." J Immunol **170**(6): 3195-203.

Buentke, E., A. Zargari, et al. (2000). "Uptake of the yeast Malassezia furfur and its allergenic components by human immature CD1a+ dendritic cells." Clin Exp Allergy **30**(12): 1759-70.

Bullens, D. M., E. Truyen, et al. (2006). "IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx?" Respir Res **7**: 135.

Cappello, P., T. Fraone, et al. (2006). "CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **177**(9): 6143-51.

Caproni, M., E. Antiga, et al. (2007). "FoxP3-expressing T regulatory cells in atopic dermatitis lesions." Allergy Asthma Proc **28**(5): 525-8.

Carson, W. F. t., L. A. Guernsey, et al. (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.

Catusse, J., M. Leick, et al. "Role of the atypical chemoattractant receptor CRAM in regulating CCL19 induced CCR7 responses in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Mol Cancer **9**: 297.

Caux, C., B. Vanbervliet, et al. (1994). "B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells." J Exp Med **180**(5): 1841-7.

Chand, A. L., A. S. Murray, et al. (2007). "Laser capture microdissection and cDNA array analysis of endometrium identify CCL16 and CCL21 as epithelial-derived inflammatory mediators associated with endometriosis." Reprod Biol Endocrinol **5**: 18.

Chang, C. Y., Y. H. Lee, et al. "CC-chemokine ligand 18/pulmonary activation-regulated chemokine expression in the CNS with special reference to traumatic brain injuries and neoplastic disorders." Neuroscience **165**(4): 1233-43.

Chen, J., Y. Yao, et al. "CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3." Cancer Cell **19**(4): 541-55.

Chen, X. Q., J. Yang, et al. (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.

Chensue, S. W., N. W. Lukacs, et al. (2001). "Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice." J Exp Med **193**(5): 573-84.

Cheung, P. F., C. K. Wong, et al. (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.

Chirdo, F. G., O. R. Millington, et al. (2005). "Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria." Eur J Immunol **35**(6): 1831-40.

Chomarat, P., J. Banchereau, et al. (2000). "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages." Nat Immunol **1**(6): 510-4.

Chomarat, P., C. Dantin, et al. (2003). "TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells." J Immunol **171**(5): 2262-9.

Chung, C. D., F. Kuo, et al. (2003). "CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease." J Immunol **170**(1): 581-7.

Chung, D. J., M. Rossi, et al. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells." Blood **114**(3): 555-63.

Chvatchko, Y., A. J. Hoogewerf, et al. (2000). "A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock." J Exp Med **191**(10): 1755-64.

Cole, K. E., C. A. Strick, et al. (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.

Condeelis, J. and J. W. Pollard (2006). "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis." Cell **124**(2): 263-6.

Cook, D. N., D. M. Prosser, et al. (2000). "CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue." Immunity **12**(5): 495-503.

Crisi, G. M., I. R. Katz, et al. (1996). "Induction of inhibitory activity for B cell differentiation in human CD8 T cells with pokeweed mitogen, dimaprit, and cAMP upregulating agents: countersuppressive effect of platelet factor 4." Cell Immunol **172**(2): 205-16.

Currie, A. J., G. A. Stewart, et al. (2000). "Alveolar macrophages bind and phagocytose allergen-containing pollen starch granules via C-type lectin and integrin receptors: implications for airway inflammatory disease." J Immunol **164**(7): 3878-86.

de Baey, A. and A. Lanzavecchia (2000). "The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis." J Exp Med **191**(4): 743-8.

de Nadai, P., A. S. Charbonnier, et al. (2006). "Involvement of CCL18 in allergic asthma." J Immunol **176**(10): 6286-93.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, et al. (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-65.

Deb, R., F. Shakib, et al. (2007). "Major house dust mite allergens Dermatophagoides pteronyssinus 1 and Dermatophagoides farinae 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D." J Biol Chem **282**(51): 36808-19.

Delespesse, G., Y. Ohshima, et al. (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.

Derewenda, U., J. Li, et al. (2002). "The crystal structure of a major dust mite allergen Der p 2, and its biological implications." J Mol Biol **318**(1): 189-97.
Deslee, G., A. S. Charbonnier, et al. (2002). "Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells." J Allergy Clin Immunol **110**(5): 763-70.
Dhodapkar, M. V., R. M. Steinman, et al. (2001). "Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): 233-8.
Di Stefano, A., A. Capelli, et al. (2001). "Decreased T lymphocyte infiltration in bronchial biopsies of subjects with severe chronic obstructive pulmonary disease." Clin Exp Allergy **31**(6): 893-902.
Dieckmann, D., C. H. Bruett, et al. (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.
Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, et al. (2000). "Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors." J Exp Med **192**(5): 705-18.
Dong, C. (2008). "IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations." J Immunotoxicol **5**(1): 43-6.
Dong, C., A. Chua, et al. (2005). "Glycosylated recombinant human XCL1/lymphotactin exhibits enhanced biologic activity." J Immunol Methods **302**(1-2): 136-44.
Duan, W., A. K. Mehta, et al. "Innate signals from Nod2 block respiratory tolerance and program T(H)2-driven allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **126**(6): 1284-93 e10.
Duhen, T., R. Geiger, et al. (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.
Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, et al. (2002). "Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen." J Exp Med **196**(12): 1645-51.
Elia, A. R., P. Cappello, et al. (2008). "Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile." J Leukoc Biol **84**(6): 1472-82.
Erpenbeck, V. J., J. M. Hohlfeld, et al. (2003). "Segmental allergen challenge in patients with atopic asthma leads to increased IL-9 expression in bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes." J Allergy Clin Immunol **111**(6): 1319-27.
Eum, S. Y., K. Maghni, et al. (2003). "Involvement of the cysteinyl-leukotrienes in allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness in the mouse." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(1): 25-32.
Eum, S. Y., K. Maghni, et al. (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, et al. (2009). "Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling." J Clin Invest **119**(12): 3573-85.
Fanger, N. A., K. Wardwell, et al. (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." J Immunol **157**(2): 541-8.
Farkas, L., K. Beiske, et al. (2001). "Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon-alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions." Am J Pathol **159**(1): 237-43.

Feuillet, V., B. Lucas, et al. (2005). "Multiple survival signals are delivered by dendritic cells to naive CD4+ T cells." Eur J Immunol **35**(9): 2563-72.
Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (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.
Forssmann, U., M. Uguccioni, et al. (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.
Friedl, P., A. T. den Boer, et al. (2005). "Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse." Nat Rev Immunol **5**(7): 532-45.
Fujisawa, T., H. Katsumata, et al. (2008). "House dust mite extract induces interleukin-9 expression in human eosinophils." Allergol Int **57**(2): 141-6.
Fujita, H., K. E. Nograles, et al. (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, et al. (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.
Galli, S. J., M. Tsai, et al. (2008). "The development of allergic inflammation." Nature **454**(7203): 445-54.
Gearing, A. J. (2007). "Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches." Immunol Cell Biol **85**(6): 490-4.
Gehring, U., W. Bischof, et al. (2002). "House dust endotoxin and allergic sensitization in children." Am J Respir Crit Care Med **166**(7): 939-44.
Geiger, E., R. Magerstaedt, et al. (2000). "IL-4 induces the intracellular expression of the alpha chain of the high-affinity receptor for IgE in in vitro-generated dendritic cells." J Allergy Clin Immunol **105**(1 Pt 1): 150-6.
Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, et al. (2000). "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses." Cell **100**(5): 575-85.
Gengrinovitch, S., S. M. Greenberg, et al. (1995). "Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms." J Biol Chem **270**(25): 15059-65.
Gleich, G. J. (1990). "Why do allergic individuals accumulate more eosinophils at the site of an IgE-mediated reaction than do normal subjects?" Clin Exp Allergy **20**(3): 245-6.
Goebeler, M., A. Trautmann, et al. (2001). "Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity." Am J Pathol **158**(2): 431-40.
Goerdt, S. and C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." Immunity **10**(2): 137-42.
Gondek, D. C., L. F. Lu, et al. (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.
Gonzalo, J. A., Y. Pan, et al. (1999). "Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation." J Immunol **163**(1): 403-11.
Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
Goya, I., R. Villares, et al. (2003). "Absence of CCR8 does not impair the response to ovalbumin-induced allergic airway disease." J Immunol **170**(4): 2138-46.

Graham, G. J., E. G. Wright, et al. (1990). "Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation." Nature **344**(6265): 442-4.

Grindebacke, H., K. Wing, et al. (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.

Grossman, W. J., J. W. Verbsky, et al. (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." Blood **104**(9): 2840-8.

Grouard, G., M. C. Rissoan, et al. (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." J Exp Med **185**(6): 1101-11.

Gruber, A., M. Mancek, et al. (2004). "Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition." J Biol Chem **279**(27): 28475-82.

Gu, L., S. Tseng, et al. (2000). "Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1." Nature **404**(6776): 407-11.

Guan, P., A. H. Burghes, et al. (1999). "Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18." Genomics **56**(3): 296-302.

Guha, S., G. Eibl, et al. (2005). "Broad-spectrum G protein-coupled receptor antagonist, [D-Arg1,D-Trp5,7,9,Leu11]SP: a dual inhibitor of growth and angiogenesis in pancreatic cancer." Cancer Res **65**(7): 2738-45.

Guiducci, C., M. Gong, et al. "TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus." Nature **465**(7300): 937-41.

Gunn, M. D., V. N. Ngo, et al. (1998). "A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1." Nature **391**(6669): 799-803.

Gunther, C., C. Bello-Fernandez, et al. (2005). "CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells." J Immunol **174**(3): 1723-8.

Gunzer, M., S. Janich, et al. (2001). "Dendritic cells and tumor immunity." Semin Immunol **13**(5): 291-302.

Gunzer, M., A. Schafer, et al. (2000). "Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential." Immunity **13**(3): 323-32.

Hammad, H., A. S. Charbonnier, et al. (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, et al. (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 (2008). "Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma." Nat Rev Immunol **8**(3): 193-204.

Hammad, H., B. N. Lambrecht, et al. (2002). "Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7." J Immunol **169**(3): 1524-34.

Hansen, G., V. P. Yeung, et al. (2000). "Vaccination with heat-killed Listeria as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8+ T cells and IL-18." J Immunol **164**(1): 223-30.

Happel, K. I., E. A. Lockhart, et al. (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.

Hartigan-O'Connor, D. J., C. Poon, et al. (2007). "Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing

consistent identification and sorting of live cells." J Immunol Methods **319**(1-2): 41-52.
Hasan, L., L. Mazzucchelli, et al. (2006). "Function of liver activation-regulated chemokine/CC chemokine ligand 20 is differently affected by cathepsin B and cathepsin D processing." J Immunol **176**(11): 6512-22.
Hashimoto, K., J. E. Durbin, et al. (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.
Hayashi, T., L. Beck, et al. (2004). "Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase." J Clin Invest **114**(2): 270-9.
Heaton, T., J. Rowe, et al. (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.
Hesselgesser, J., H. P. Ng, et al. (1998). "Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor." J Biol Chem **273**(25): 15687-92.
Hieshima, K., T. Imai, et al. (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.
Hileman, R. E., J. R. Fromm, et al. (1998). "Glycosaminoglycan-protein interactions: definition of consensus sites in glycosaminoglycan binding proteins." Bioessays **20**(2): 156-67.
Hirota, K., H. Yoshitomi, et al. (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.
Hirsch, E., V. L. Katanaev, et al. (2000). "Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation." Science **287**(5455): 1049-53.
Hohl, T. M., A. Rivera, et al. (2006). "Immunity to fungi." Curr Opin Immunol **18**(4): 465-72.
Hollingsworth, J. W., G. S. Whitehead, et al. (2006). "TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation." J Immunol **176**(10): 5856-62.
Holmberg, E. B., R. E. Hillman, et al. (1995). "Comparisons among aerodynamic, electroglottographic, and acoustic spectral measures of female voice." J Speech Hear Res **38**(6): 1212-23.
Hon, K. L., G. K. Ching, et al. "Exploring CCL18, eczema severity and atopy." Pediatr Allergy Immunol.
Hoogewerf, A. J., G. S. Kuschert, et al. (1997). "Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines." Biochemistry **36**(44): 13570-8.
Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). "A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes." J Exp Med **191**(3): 435-44.
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.
Huh, J. C., D. H. Strickland, et al. (2003). "Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma." J Exp Med **198**(1): 19-30.

Humbles, A. A., B. Lu, et al. (2002). "The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1479-84.

Hwang, E. S., S. J. Szabo, et al. (2005). "T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3." Science **307**(5708): 430-3.

Iellem, A., M. Mariani, et al. (2001). "Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." J Exp Med **194**(6): 847-53.

Imai, T., T. Yoshida, et al. (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.

Inngjerdingen, M., B. Damaj, et al. (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.

Ito, M., K. Ogawa, et al. (2004). "Gene expression of enzymes for tryptophan degradation pathway is upregulated in the skin lesions of patients with atopic dermatitis or psoriasis." J Dermatol Sci **36**(3): 157-64.

Ito, T., R. Amakawa, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs." J Immunol **172**(7): 4253-9.

Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-33.

Iwamoto, S., M. Ishida, et al. (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.

Izadpanah, A., M. B. Dwinell, et al. (2001). "Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **280**(4): G710-9.

Jahnsen, F. L., F. Lund-Johansen, et al. (2000). "Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy." J Immunol **165**(7): 4062-8.

Jahnsen, F. L., E. D. Moloney, et al. (2001). "Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge." Thorax **56**(11): 823-6.

Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2002). "Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells." J Exp Med **196**(2): 255-60.

Jonuleit, H., E. Schmitt, et al. (2000). "Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells." J Exp Med **192**(9): 1213-22.

Julia, V., E. M. Hessel, et al. (2002). "A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure." Immunity **16**(2): 271-83.

Kaminuma, O., F. Kitamura, et al. (2004). "GATA-3 suppresses IFN-gamma promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements." FEBS Lett **570**(1-3): 63-8.

Kapsenberg, M. L. (2003). "Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization." Nat Rev Immunol **3**(12): 984-93.

Karagiannidis, C., M. Akdis, et al. (2004). "Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma." J Allergy Clin Immunol **114**(6): 1425-33.

Karlsson, M. R., J. Rugtveit, et al. (2004). "Allergen-responsive CD4+CD25+ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy." J Exp Med **199**(12): 1679-88.

Karpus, W. J. and K. J. Kennedy (1997). "MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation." J Leukoc Biol **62**(5): 681-7.

Keane, M. P., D. A. Arenberg, et al. (1998). "CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis." Proc Assoc Am Physicians **110**(4): 288-96.

Kearley, J., J. E. Barker, et al. (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.

Kelner, G. S., J. Kennedy, et al. (1994). "Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine." Science **266**(5189): 1395-9.

Kim, P. J., S. Y. Pai, et al. (2006). "GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells." J Immunol **177**(10): 6650-9.

Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, et al. (1998). "Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma." J Immunol **160**(6): 2555-9.

Kodelja, V., S. Kraft, et al. (1998). "Langerhans cells do not express alternative macrophage activation-associated CC chemokine (AMAC)-1." Res Immunol **149**(7-8): 633-7.

Kodelja, V., C. Muller, et al. (1998). "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.

Komiya, A., H. Nagase, et al. (2003). "Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells." Cell Immunol **225**(2): 91-100.

Kouros-Mehr, H., E. M. Slorach, et al. (2006). "GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland." Cell **127**(5): 1041-55.

Kraft, S. and T. Bieber (2001). "Fc epsilon ri-mediated activation of transcription factors in antigen-presenting cells." Int Arch Allergy Immunol **125**(1): 9-15.

Kuchroo, V. K., M. P. Das, et al. (1995). "B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy." Cell **80**(5): 707-18.

Kudlacz, E., C. Whitney, et al. (2002). "Functional effects of eotaxin are selectively upregulated on IL-5 transgenic mouse eosinophils." Inflammation **26**(3): 111-9.

Kurts, C., H. Kosaka, et al. (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." J Exp Med **186**(2): 239-45.

Kusano, F., Y. Tanaka, et al. (2000). "Expression of C-C chemokines is associated with portal and periportal inflammation in the liver of patients with chronic hepatitis C." Lab Invest **80**(3): 415-22.

Lam, D., N. Ng, et al. (2008). "Airway house dust extract exposures modify allergen-induced airway hypersensitivity responses by TLR4-dependent and independent pathways." J Immunol **181**(4): 2925-32.

Lambrecht, B. N. (2005). "Dendritic cells and the regulation of the allergic immune response." Allergy **60**(3): 271-82.

Lambrecht, B. N., R. A. Pauwels, et al. (2000). "Induction of rapid T cell activation, division, and recirculation by intratracheal injection of dendritic cells in a TCR transgenic model." J Immunol **164**(6): 2937-46.

Lambrecht, B. N., R. A. Peleman, et al. (2000). "Sensitization to inhaled antigen by intratracheal instillation of dendritic cells." Clin Exp Allergy **30**(2): 214-24.

Lambrecht, B. N., B. Salomon, et al. (1998). "Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice." J Immunol **160**(8): 4090-7.

Lau, E. K., C. D. Paavola, et al. (2004). "Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo." J Biol Chem **279**(21): 22294-305.

Leech, M. D., R. A. Benson, et al. (2007). "Resolution of Der p1-induced allergic airway inflammation is dependent on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells." J Immunol **179**(10): 7050-8.

Lei, Y., A. M. Ripen, et al. "Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development." J Exp Med **208**(2): 383-94.

Lepelletier, Y., R. Zollinger, et al. "Toll-like receptor control of glucocorticoid-induced apoptosis in human plasmacytoid predendritic cells (pDCs)." Blood **116**(18): 3389-97.

Leung, S. Y., S. T. Yuen, et al. (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, et al. (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.

Lezcano-Meza, D., B. Davila-Davila, et al. (2003). "Interleukin (IL)-4 and to a lesser extent either IL-13 or interferon-gamma regulate the production of eotaxin-2/CCL24 in nasal polyps." Allergy **58**(10): 1011-7.

Li, X., T. Syrovets, et al. (2008). "Mature dendritic cells express functional thrombin receptors triggering chemotaxis and CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine induction." J Immunol **181**(2): 1215-23.

Lindhout, E., J. L. Vissers, et al. (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, et al. (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.

Liu, Z., L. Yang, et al. (2009). "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.

Loercher, A. E., M. A. Nash, et al. (1999). "Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells." J Immunol **163**(11): 6251-60.

Loetscher, P. and I. Clark-Lewis (2001). "Agonistic and antagonistic activities of chemokines." J Leukoc Biol **69**(6): 881-4.

Loetscher, P., A. Pellegrino, et al. (2001). "The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3." J Biol Chem **276**(5): 2986-91.

Lukacs, N. W., A. John, et al. (2002). "E- and P-selectins are essential for the development of cockroach allergen-induced airway responses." J Immunol **169**(4): 2120-5.

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.

Luzina, I. G., S. P. Atamas, et al. (2002). "Gene expression in bronchoalveolar lavage cells from scleroderma patients." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(5): 549-57.

MacGlashan, D., Jr. (2008). "IgE receptor and signal transduction in mast cells and basophils." Curr Opin Immunol **20**(6): 717-23.

MacPhee, I. A., D. R. Turner, et al. (2001). "CD80(B7.1) and CD86(B7.2) do not have distinct roles in setting the Th1/Th2 balance in autoimmunity in rats." Scand J Immunol **54**(5): 486-94.

Mancino, A. and T. Lawrence "Nuclear factor-kappaB and tumor-associated macrophages." Clin Cancer Res **16**(3): 784-9.

Maraskovsky, E., K. Brasel, et al. (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." J Exp Med **184**(5): 1953-62.

Mark, D. A., C. E. Donovan, et al. (2000). "B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) have complementary roles in mediating allergic pulmonary inflammation and airway hyperresponsiveness." Am J Respir Cell Mol Biol **22**(3): 265-71.

Marsland, B. J., P. Battig, et al. (2005). "CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells." Immunity **22**(4): 493-505.

Matsumoto, N., S. Katoh, et al. (2003). "Critical role of IL-5 in antigen-induced pulmonary eosinophilia, but not in lymphocyte activation." Int Arch Allergy Immunol **130**(3): 209-15.

Matsuno, K., T. Ezaki, et al. (1996). "A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph." J Exp Med **183**(4): 1865-78.

Mazouz, N., O. Detournay, et al. (2005). "Immunostimulatory properties of human dendritic cells generated using IFN-beta associated either with IL-3 or GM-CSF." Cancer Immunol Immunother **54**(10): 1010-7.

Medoff, B. D., A. Sauty, et al. (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma." J Immunol **168**(10): 5278-86.

Melichar, B., C. Savary, et al. (1998). "Lineage-negative human leukocyte antigen-DR+ cells with the phenotype of undifferentiated dendritic cells in patients with carcinoma of the abdomen and pelvis." Clin Cancer Res **4**(3): 799-809.

Mellman, I., S. J. Turley, et al. (1998). "Antigen processing for amateurs and professionals." Trends Cell Biol **8**(6): 231-7.

Mellor, A. L. and D. H. Munn (2004). "IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism." Nat Rev Immunol **4**(10): 762-74.

Michel, M. L., A. C. Keller, et al. (2007). "Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia." J Exp Med **204**(5): 995-1001.

Middleton, J., S. Neil, et al. (1997). "Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells." Cell **91**(3): 385-95.

Mionnet, C., V. Buatois, et al. "CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung." Nat Med **16**(11): 1305-12.

Mohamadzadeh, M., F. Berard, et al. (2001). "Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells." J Exp Med **194**(7): 1013-20.

Mohty, M., A. Vialle-Castellano, et al. (2003). "IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities." J Immunol **171**(7): 3385-93.

Molet, S., Q. Hamid, et al. (2001). "IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines." J Allergy Clin Immunol **108**(3): 430-8.

Moller, G. M., S. E. Overbeek, et al. (1996). "Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids." Clin Exp Allergy **26**(5): 517-24.

Molon, B., G. Gri, et al. (2005). "T cell costimulation by chemokine receptors." Nat Immunol **6**(5): 465-71.

Moreira-Teixeira, L., M. Resende, et al. "Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells." J Immunol **186**(10): 5758-65.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-12.

Mukherjee, S., P. K. Maiti, et al. (2002). "Role of CD80, CD86, and CTLA4 on mouse CD4(+) T lymphocytes in enhancing cell-cycle progression and survival after activation with PMA and ionomycin." J Leukoc Biol **72**(5): 921-31.

Nakamura, K., A. Kitani, et al. (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.

Nawijn, M. C., G. M. Dingjan, et al. (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.

Nestle, F. O., C. Conrad, et al. (2005). "Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production." J Exp Med **202**(1): 135-43.

Netea, M. G. and J. W. van der Meer "Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors." N Engl J Med **364**(1): 60-70.

Nguyen, K. D., A. Fohner, et al. (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, et al. (2008). "Increased cytotoxicity of CD4+ invariant NKT cells against CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in allergic asthma." Eur J Immunol **38**(7): 2034-45.

Nibbs, R. J., T. W. Salcedo, et al. (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.

Nograles, K. E., L. C. Zaba, et al. (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.

Noirey, N., N. Rougier, et al. (2000). "Langerhans-like dendritic cells generated from cord blood progenitors internalize pollen allergens by macropinocytosis, and part of the molecules are processed and can activate autologous naive T lymphocytes." J Allergy Clin Immunol **105**(6 Pt 1): 1194-201.

Nomura, I., B. Gao, et al. (2003). "Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis." J Allergy Clin Immunol **112**(6): 1195-202.

Nonaka, M., R. Pawankar, et al. (2004). "Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts." Clin Exp Allergy **34**(5): 804-11.

Novak, N., J. P. Allam, et al. (2004). "Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **114**(2): 364-70.

Ogilvie, P., G. Bardi, et al. (2001). "Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5." Blood **97**(7): 1920-4.

Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, et al. (2004). "Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3." J Clin Invest **114**(1): 28-38.

Otero, K., A. Vecchi, et al. "Nonredundant role of CCRL2 in lung dendritic cell trafficking." Blood **116**(16): 2942-9.

Page, K., J. R. Ledford, et al. (2009). "A TLR2 agonist in German cockroach frass activates MMP-9 release and is protective against allergic inflammation in mice." J Immunol **183**(5): 3400-8.

Page, K., K. M. Lierl, et al. (2008). "TLR2-mediated activation of neutrophils in response to German cockroach frass." J Immunol **180**(9): 6317-24.

Pannellini, T., M. Iezzi, et al. (2004). "The expression of LEC/CCL16, a powerful inflammatory chemokine, is upregulated in ulcerative colitis." Int J Immunopathol Pharmacol **17**(2): 171-80.

Pardo, A., K. M. Smith, et al. (2001). "CCL18/DC-CK-1/PARC up-regulation in hypersensitivity pneumonitis." J Leukoc Biol **70**(4): 610-6.

Pascual, C. Y., J. F. Crespo, et al. (2000). "Food allergy and intolerance in children and adolescents, an update." Eur J Clin Nutr **54 Suppl 1**: S75-8.

Pene, J., S. Chevalier, et al. (2008). "Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes." J Immunol **180**(11): 7423-30.

Perez-Machado, M. A., P. Ashwood, et al. (2003). "Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy." Eur J Immunol **33**(8): 2307-15.

Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, et al. (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.

Pivarcsi, A., M. Gombert, et al. (2004). "CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure." J Immunol **173**(9): 5810-7.

Politz, O., V. Kodelja, et al. (2000). "Pseudoexons and regulatory elements in the genomic sequence of the beta-chemokine, alternative macrophage activation-associated CC-chemokine (AMAC)-1." Cytokine **12**(2): 120-6.

Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." Nat Rev Cancer **4**(1): 71-8.

Proudfoot, A. E., S. Fritchley, et al. (2001). "The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity." J Biol Chem **276**(14): 10620-6.

Proudfoot, A. E., T. M. Handel, et al. (2003). "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1885-90.

Proudfoot, A. E., C. A. Power, et al. (1996). "Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist." J Biol Chem **271**(5): 2599-603.

Puccetti, P. and U. Grohmann (2007). "IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation." Nat Rev Immunol **7**(10): 817-23.

Radstake, T. R., R. van der Voort, et al. (2005). "Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors." Ann Rheum Dis **64**(3): 359-67.

Randolph, G. J., S. Beaulieu, et al. (1998). "Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking." Science **282**(5388): 480-3.

Randolph, G. J., K. Inaba, et al. (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-61.

Redecke, V., H. Hacker, et al. (2004). "Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma." J Immunol **172**(5): 2739-43.

Reefer, A. J., S. M. Satinover, et al. (2008). "Analysis of CD25hiCD4+ "regulatory" T-cell subtypes in atopic dermatitis reveals a novel T(H)2-like population." J Allergy Clin Immunol **121**(2): 415-422 e3.

Reibman, J., Y. Hsu, et al. (2003). "Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(6): 648-54.

Reider, N., D. Reider, et al. (2002). "Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production." J Allergy Clin Immunol **109**(1): 89-95.

Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, et al. (2001). "Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey." Lancet **358**(9288): 1129-33.

Rimaniol, A. C., S. J. Till, et al. (2003). "The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis." J Allergy Clin Immunol **112**(6): 1139-46.

Rodriguez, A., A. Regnault, et al. (1999). "Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells." Nat Cell Biol **1**(6): 362-8.

Roncarolo, M. G., M. K. Levings, et al. (2001). "Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells." J Exp Med **193**(2): F5-9.

Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, et al. (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." Immunity **28**(4): 546-58.

Ruedl, C., M. F. Bachmann, et al. (2000). "The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand." Eur J Immunol **30**(7): 2056-64.

Runswick, S., T. Mitchell, et al. (2007). "Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions." Respirology **12**(6): 834-42.

Rutitzky, L. I. and M. J. Stadecker (2006). "CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **101 Suppl 1**: 327-30.

Sabatini, F., M. Silvestri, et al. (2003). "Modulation of the constitutive or cytokine-induced bronchial epithelial cell functions in vitro by fluticasone propionate." Immunol Lett **89**(2-3): 215-24.

Saito, H., K. Matsumoto, et al. (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, et al. (2006). "Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease." Immunol Rev **212**: 8-27.

Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.

Sallusto, F., B. Palermo, et al. (1999). "Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function." Eur J Immunol **29**(5): 1617-25.

Santeliz, J. V., G. Van Nest, et al. (2002). "Amb a 1-linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma." J Allergy Clin Immunol **109**(3): 455-62.

Sapoznikov, A., J. A. Fischer, et al. (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.

Sauty, A., M. Dziejman, et al. (1999). "The T cell-specific CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC are expressed by activated human bronchial epithelial cells." J Immunol **162**(6): 3549-58.

Schnyder-Candrian, S., D. Togbe, et al. (2006). "Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma." J Exp Med **203**(12): 2715-25.

Schnyder, B., C. Lima, et al. "Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response." Cytokine **50**(2): 220-7.

Schraufstatter, I., H. Takamori, et al. (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.

Schutyser, E., S. Struyf, et al. (2002). "Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma." J Biol Chem **277**(27): 24584-93.

Schutyser, E., S. Struyf, et al. (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.

Schwartz, R. H., D. L. Mueller, et al. (1989). "T-cell clonal anergy." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 2**: 605-10.

Sekiya, T., M. Miyamasu, et al. (2000). "Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells." J Immunol **165**(4): 2205-13.

Sekiya, T., H. Yamada, et al. (2002). "Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in serum and induced sputum of asthmatics." Allergy **57**(2): 173-7.

Senechal, S., O. Fahy, et al. (2002). "CCR3-blocking antibody inhibits allergen-induced eosinophil recruitment in human skin xenografts from allergic patients." Lab Invest **82**(7): 929-39.

Shahrara, S., M. A. Amin, et al. (2003). "Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis." Arthritis Rheum **48**(12): 3568-83.

Shi, H. Z., C. Q. Xiao, et al. (2004). "Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses." Allergy **59**(4): 428-35.

Shortman, K. and S. H. Naik (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." Nat Rev Immunol **7**(1): 19-30.

Siegal, F. P., N. Kadowaki, et al. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." Science **284**(5421): 1835-7.
Simpson, T. R., S. A. Quezada, et al. "Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS)." Curr Opin Immunol **22**(3): 326-32.
Sin, D. D., B. E. Miller, et al. "Serum PARC/CCL-18 concentrations and health outcomes in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **183**(9): 1187-92.
Sitkauskiene, B., M. Radinger, et al. (2005). "Airway allergen exposure stimulates bone marrow eosinophilia partly via IL-9." Respir Res **6**: 33.
Slavin, J., E. Unemori, et al. (1995). "Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA is down-regulated in human dermal fibroblasts by dexamethasone: differential regulation by TGF-beta." Growth Factors **12**(2): 151-7.
Sleeman, M. A., J. K. Fraser, et al. (2000). "B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine." Int Immunol **12**(5): 677-89.
Smith, C. A., T. D. Smith, et al. (1997). "Poxvirus genomes encode a secreted, soluble protein that preferentially inhibits beta chemokine activity yet lacks sequence homology to known chemokine receptors." Virology **236**(2): 316-27.
Sohy, D., H. Yano, et al. (2009). "Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists." J Biol Chem **284**(45): 31270-9.
Soldevila, G., I. Licona, et al. (2004). "Impaired chemokine-induced migration during T-cell development in the absence of Jak 3." Immunology **112**(2): 191-200.
Sonnenberg, G. F., L. A. Fouser, et al. "Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22." Nat Immunol **12**(5): 383-90.
Soruri, A., J. Riggert, et al. (2003). "Anaphylatoxin C5a induces monocyte recruitment and differentiation into dendritic cells by TNF-alpha and prostaglandin E2-dependent mechanisms." J Immunol **171**(5): 2631-6.
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.
Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function." Nat Immunol **6**(2): 163-70.
Steinbrink, K., M. Wolfl, et al. (1997). "Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells." J Immunol **159**(10): 4772-80.
Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 351-8.
Stellato, C., M. E. Brummet, et al. (2001). "Expression of the C-C chemokine receptor CCR3 in human airway epithelial cells." J Immunol **166**(3): 1457-61.
Stellato, C., P. Collins, et al. (1997). "Production of the novel C-C chemokine MCP-4 by airway cells and comparison of its biological activity to other C-C chemokines." J Clin Invest **99**(5): 926-36.
Stellato, C., S. Matsukura, et al. (1999). "Differential regulation of epithelial-derived C-C chemokine expression by IL-4 and the glucocorticoid budesonide." J Immunol **163**(10): 5624-32.

Stine, J. T., C. Wood, et al. (2000). "KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells." Blood **95**(4): 1151-7.

Stock, P., O. Akbari, et al. (2004). "Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity." Nat Immunol **5**(11): 1149-56.

Strickland, D. H., P. A. Stumbles, et al. (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, et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." J Biol Chem **270**(45): 27348-57.

Struyf, S., I. De Meester, et al. (1998). "Natural truncation of RANTES abolishes signaling through the CC chemokine receptors CCR1 and CCR3, impairs its chemotactic potency and generates a CC chemokine inhibitor." Eur J Immunol **28**(4): 1262-71.

Struyf, S., E. Schutyser, et al. (2003). "PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia." Am J Pathol **163**(5): 2065-75.

Sun, J., B. Wong, et al. (2007). "Immunoreactivity profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with ragweed-induced allergic rhinitis." Clin Exp Allergy **37**(6): 901-8.

Sundrud, M. S. and A. Rao (2008). "Regulation of T helper 17 differentiation by orphan nuclear receptors: it's not just ROR gamma t anymore." Immunity **28**(1): 5-7.

Sung, S., C. E. Rose, et al. (2001). "Intratracheal priming with ovalbumin- and ovalbumin 323-339 peptide-pulsed dendritic cells induces airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and inflammation." J Immunol **166**(2): 1261-71.

Sung, S. S., S. M. Fu, et al. (2006). "A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins." J Immunol **176**(4): 2161-72.

Takanaski, S., R. Nonaka, et al. (1994). "Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils." J Exp Med **180**(2): 711-5.

Tan, A. M., H. C. Chen, et al. "TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen." J Immunol **184**(7): 3535-44.

Tanaka, H., C. E. Demeure, et al. (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.

Tasaki, Y., S. Fukuda, et al. (1999). "Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes." Genomics **55**(3): 353-7.

Taub, D. D., S. M. Turcovski-Corrales, et al. (1996). "Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro." J Immunol **156**(6): 2095-2103.

Teran, L. M., M. Mochizuki, et al. (1999). "Th1- and Th2-type cytokines regulate the expression and production of eotaxin and RANTES by human lung fibroblasts." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 777-86.

Toda, M., D. Y. Leung, et al. (2003). "Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 875-81.

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, et al. (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.

Turley, S. J. (2002). "Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity." Curr Opin Immunol **14**(6): 765-70.

Upham, J. W., J. A. Denburg, et al. (2002). "Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects." Clin Exp Allergy **32**(6): 818-23.

van Beelen, A. J., Z. Zelinkova, et al. (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 Coillie, E., P. Proost, et al. (1998). "Functional comparison of two human monocyte chemotactic protein-2 isoforms, role of the amino-terminal pyroglutamic acid and processing by CD26/dipeptidyl peptidase IV." Biochemistry **37**(36): 12672-80.

van den Brule, S., J. Heymans, et al. (2007). "Profibrotic effect of IL-9 overexpression in a model of airway remodeling." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(2): 202-9.

van den Heuvel, M. M., D. D. Vanhee, et al. (1998). "Functional and phenotypic differences of monocyte-derived dendritic cells from allergic and nonallergic patients." J Allergy Clin Immunol **101**(1 Pt 1): 90-5.

van der Voort, R., M. Kramer, et al. (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 Liempt, E., S. J. van Vliet, et al. (2007). "Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation." Mol Immunol **44**(10): 2605-15.

van Lieshout, A. W., P. Barrera, et al. (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., S. Jung, et al. (2005). "In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma." J Exp Med **201**(6): 981-91.

van Rijt, L. S., J. B. Prins, et al. (2002). "Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma." Blood **100**(10): 3663-71.

van Scott, M. R., J. P. Justice, et al. (2000). "IL-10 reduces Th2 cytokine production and eosinophilia but augments airway reactivity in allergic mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **278**(4): L667-74.

van Wijk, F., E. J. Wehrens, et al. (2007). "CD4+CD25+ T cells regulate the intensity of hypersensitivity responses to peanut, but are not decisive in the induction of oral sensitization." Clin Exp Allergy **37**(4): 572-81.

Vasu, C., S. R. Gorla, et al. (2003). "Targeted engagement of CTLA-4 prevents autoimmune thyroiditis." Int Immunol **15**(5): 641-54.

Verhagen, J., M. Akdis, et al. (2006). "Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin." J Allergy Clin Immunol **117**(1): 176-83.

Vermaelen, K. and R. Pauwels (2005). "Pulmonary dendritic cells." Am J Respir Crit Care Med **172**(5): 530-51.

Verreck, F. A., T. de Boer, et al. (2004). "Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(13): 4560-5.

Vicari, A. P., D. J. Figueroa, et al. (1997). "TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development." Immunity **7**(2): 291-301.

Vieira, P. L., E. C. de Jong, et al. (2000). "Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction." J Immunol **164**(9): 4507-12.

Vissers, J. L., F. C. Hartgers, et al. (2001). "Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo." J Leukoc Biol **69**(5): 785-93.

Volpe, E., N. Servant, et al. (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.

Voo, K. S., Y. H. Wang, et al. (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4793-8.

Vosshenrich, C. A., M. E. Garcia-Ojeda, et al. (2006). "A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127." Nat Immunol **7**(11): 1217-24.

Vulcano, M., S. Struyf, et al. (2003). "Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells." J Immunol **170**(7): 3843-9.

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.

Wan, Y., J. P. Jakway, et al. (2002). "Identification of full, partial and inverse CC chemokine receptor 3 agonists using [35S]GTPgammaS binding." Eur J Pharmacol **456**(1-3): 1-10.

Wang, J. H., J. L. Devalia, et al. (1996). "Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(1): 27-35.

Wang, Y. D., Z. J. Gu, et al. (2002). "gp130-linked signal transduction promotes the differentiation and maturation of dendritic cells." Int Immunol **14**(6): 599-603.

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.

Wilbanks, A., S. C. Zondlo, et al. (2001). "Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTRligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines." J Immunol **166**(8): 5145-54.

Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, et al. (2002). "Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome." J Med Genet **39**(8): 537-45.

Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat Immunol **8**(9): 950-7.

Witsch, E. J., M. Peiser, et al. (2002). "ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells." Eur J Immunol **32**(9): 2680-6.

Woltman, A. M. and C. van Kooten (2003). "Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses." J Leukoc Biol **73**(4): 428-41.

Wong, C. K., S. W. Lun, et al. (2009). "Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma." Immunol Invest **38**(7): 652-64.

Woo, C. H. and J. H. Kim (2002). "Rac GTPase activity is essential for lipopolysaccharide signaling to extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase activation in rat-2 fibroblasts." Mol Cells **13**(3): 470-5.

Wulfing, C. and M. M. Davis (1998). "A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation." Science **282**(5397): 2266-9.

Xanthou, G., M. Polihronis, et al. (2001). ""Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation." Arthritis Rheum **44**(2): 408-18.

Zarek, P. E., C. T. Huang, et al. (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, et al. (2009). "Production of biologically active human lymphotactin (XCL1) by Lactococcus lactis." Biotechnol Lett **31**(2): 215-20.

Zeidler, R., G. Reisbach, et al. (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.

Zhao, Y., J. Yang, et al. "Th17 immunity in patients with allergic asthma." Int Arch Allergy Immunol **151**(4): 297-307.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

Zou, J., S. Young, et al. (2002). "Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma." Genome Biol **3**(5): research0020.