



HAL
open science

Rôle des cellules Natural Killer dans l'asthme allergique

Coline Plé

► **To cite this version:**

Coline Plé. Rôle des cellules Natural Killer dans l'asthme allergique. Immunologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT: . tel-00473006

HAL Id: tel-00473006

<https://theses.hal.science/tel-00473006>

Submitted on 13 Apr 2010

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 de Droit et de la Santé de Lille II

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
Discipline : IMMUNOLOGIE

Titre :

ROLE DES CELLULES NATURAL KILLER
DANS L'ASTHME ALLERGIQUE

Présentée et soutenue publiquement le 2 avril 2010 par

Coline PLE

devant le jury composé de :

Professeur Benoît WALLAERT Service de Pneumologie et Immuno-Allergologie, Hôpital A Calmette, Lille	Président
Professeur Hamida HAMMAD Département de Médecine Interne, Université de Gent, Belgique	Rapporteur
Docteur James P. DI SANTO INSERM U668, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Docteur Marc DAERON INSERM U760, Institut Pasteur, Paris	Examineur
Docteur Thierry WALZER INSERM U851, CERVI, Lyon	Examineur
Docteur Catherine DUEZ Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Equipe 11, Lille	Directeur de thèse

**CENTRE D'INFECTION ET D'IMMUNITE DE LILLE – INSERM U1019 – CNRS UMR 8204 –
EQUIPE 11 – UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE – INSTITUT PASTEUR DE LILLE**

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté, en dépit de l'ensemble des rebondissements survenus lors de la fin de ma thèse, d'évaluer mon travail :

Monsieur le Professeur Benoît Wallaert pour avoir accepté de présider ce jury. Je vous remercie également d'avoir été mon directeur officiel de début de thèse.

Madame le Professeur Hamida Hammad et Monsieur le Docteur James P. Di Santo pour avoir accepté la lourde tâche de rapporteur. Je vous remercie également du soutien que vous m'avez apporté en ces moments difficiles.

Monsieur le Docteur Marc Daeron pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour m'avoir apporté tout comme les rapporteurs un soutien qui m'était indispensable.

Monsieur le Docteur Thierry Walzer pour avoir accepté d'être examinateur. Je te remercie également pour ton soutien, ta disponibilité et les conseils que tu m'as apportés au cours de notre collaboration.

Madame le Docteur Catherine Duez dont une dédicace personnelle sera réalisée ultérieurement.

Je tiens tout d'abord à remercier mes parents pour leur soutien quotidien. Je souhaite aussi remercier en particulier Michel (mon tonton). Tout d'abord, tu as eu le courage de lire l'ensemble de mon introduction de thèse : plus de 150 pages tout de même, et ce comme lecture de chevet. Là, je dis chapeau bas ! Outre cette lecture, tu m'as été d'un soutien indispensable durant ces derniers mois. Je te remercie sincèrement de ta disponibilité lors des coups durs. En effet, sans ces longs moments passés ensemble au téléphone où tu m'as soutenue et remise sur le "droit chemin", je ne pense pas que je serais en train d'écrire ces pages de remerciements, ces dernières étant pour moi la finalisation de mon manuscrit et donc le signe d'une soutenance à venir.

Un grand merci également à tous les membres de l'unité 416 devenue 774 puis nouvellement Equipe 11 du Centre d'infection et d'immunité de Lille:

A Monsieur le Professeur André Bernard-Tonnel, Monsieur le Docteur Philippe Lassalle et Madame le Docteur Anne Tscicopoulos, directeurs respectifs de l'U416, de l'U774 et de l'Equipe 11 du Centre d'infection et d'immunité de Lille.

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en m'accueillant au sein de votre unité et pour m'avoir permis d'y réaliser ma thèse.

A Catherine Duez

Alors là, je ne sais pas trop par quoi commencer sinon qu'un simple merci, ce qui est déjà un bon début ! Ces quatre années passées à tes côtés m'ont permises d'évoluer tant sur le plan professionnel que personnel. Eh oui, où est passée la petite étudiante de master que j'étais ! En cas de crise, j'avoue qu'elle aurait tendance à réapparaître mais je pense quand même en moins exacerbée ! Tu en as vu avec moi pendant ces quatre ans et tout particulièrement ces derniers temps où nous sommes encore en train de parcourir tant bien que mal le parcours du combattant (ou le chemin de croix comme tu veux) pour que je puisse soutenir ma thèse. Bref, merci pour ton encadrement, ton soutien, ta disponibilité, ta patience, tes encouragements et ta sympathie.

A Anne Tscicopoulos

Je tiens tout d'abord à te remercier pour ton regard critique et tes conseils sur mes travaux de thèse, ainsi que pour ta disponibilité. Je te remercie également de m'avoir proposé d'intégrer ton équipe en tant que post-doc. En effet, ceci est pour moi une véritable opportunité et c'est pourquoi je t'en suis infiniment reconnaissante.

A Philippe Gosset

Ah M'sieur Gosset ! Je tiens à vous remercier pour les conseils techniques que vous m'avez donnés, même s'il fallait de temps en temps vous harceler pour les obtenir. Mais, tant bien que mal, j'y suis toujours parvenue !!! Même si je vous vouvoie, vous n'avez jamais été à l'abri de mes plaisanteries !

Aux membres de l'équipe Duez : Latiffa Amniai, Mathieu Barrier, Philippe Marquillies et Céline Ratajczak (membre adoptif)

Latiffa, je tiens à te remercier pour ton aide lors des expérimentations animales mais également pour le soutien que tu m'as apporté, et ce notamment lors de mon année de master.

Ah p'tit chef ! Bien sur, je parle de toi Mathieu. Que te dire sinon merci pour ta bonne humeur (quoique de temps en temps, elle se transformait en enfer pour moi, et ce notamment lors des longues expériences où tu devais te lever très tôt), ton aide même le week-end (eh oui, ces fameuses iv du week-end) et ton soutien durant les quatre années que nous avons partagées pour le meilleur et... pour le rire !

A M'sieur Marquillies, mon papa adoptif ! Ceci ne vient pas de moi mais de Han (votre petite dédicace arrive après, ne vous inquiétez pas) qui disait toujours que j'étais orpheline lorsque vous n'étiez pas là. Que vous dire sinon un énorme merci pour avoir été ma deuxième paire de main et ce quelque soit l'heure (7 heures le plus tôt et 22h le plus tard) et le jour de la semaine (je pense à quelques week-ends où vous avez eu la gentillesse de venir m'aider). Merci également de m'avoir soutenu durant ces quatre années et d'avoir eu la patience de me supporter.

Céline, je tiens à te remercier pour le soutien et l'aide que tu m'as apporté lors d'un stage effectué pendant des vacances d'été mais également pour m'avoir également soutenue lors de mon master.

Au duo infernal : Philippe Hauw et Han Vorng

Ne vous inquiétez pas Philippe, je ne vous ai pas oublié. Je tiens à vous remercier pour votre aide lors de certaines expériences mais également pour votre bonne humeur.

M'sieur Vorng, que vous dire sinon merci pour vos conseils techniques, les discussions générales que nous avons eues et votre bonne humeur. Ah oui, j'oubliais ! Attention, j'arrive bientôt dans votre groupe et vous n'êtes pas au bout de vos surprises.

A mes compagnons de paillassé ou de bureau : Cecilia Estrella, Benjamin Legendre, Nathalie de Freitas Caires et Solenne Taront

Cécilia, je te remercie pour tes précieux conseils techniques (en particulier pour la q-PCR), ta gentillesse et ton soutien lorsque nous partagions le bureau.

Nathalie et Ben, je n'oublierais jamais les excellents moments que j'ai eus avec vous et Mathieu, tous les trois formant un trio infernal.

Solenne, je te remercie pour ton aide (tu te rappelles le week-end où tu es venue m'aider pour les souris ?), ton soutien et ton amitié.

Aux autres membres de l'unité (anciens ou actuels) ou assimilés: Saliha Ait-Yahia, Imane Azzaoui, Laetitia Breuilh, Eve de Decker, Maryse Delehedde, Benoist Degonne, Patricia de Nadai, Edith Evrard, Joelle Flipo, Corine Glineur, Gwenola Kervoaze, Guillaume Lesquame, Geneviève Marchandise, Jean Pastré, Muriel Pichavant, Cendrine Prost, Emilie Lefèvre, David Torres, Eva Vilain, Chang Ying.

Je vous remercie tous que ce soit pour vos conseils techniques, votre soutien ou les commandes passées en urgence. J'adresse un merci tout particulier à Laetitia qui a eu la gentillesse de venir m'aider au FACS tard dans la nuit ou tôt le matin (minuit) et qui est restée avec moi jusqu'à la fin de l'expérience (3 heures du matin).

Enfin, je remercie l'ensemble du personnel de l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille et tout particulièrement Thierry Chassat, David Hannebique et Philippe Persoons pour m'avoir dépanné à plusieurs reprises ou pour m'avoir apporté des conseils techniques. Je remercie également Julie Bertout pour l'aide qu'elle m'a fourni lors des analyses des résultats obtenus avec le FACS Aria.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
RESUME	3
PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE 1: LES CELLULES NATURAL KILLER	6
Introduction	6
A. LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES NK	6
1. Le modèle de développement des cellules NK chez la souris	6
a. Etape 1: La génération de précurseurs des cellules NK (NKp).....	7
b. Etape 2: Les cellules NK immatures.....	8
c. Etape 3: La maturation des cellules NK	8
i. Le modèle 3 étapes-6 stades (Figure 1)	8
ii. Le programme de maturation en 4 stades.....	9
d. L'activation des cellules NK en périphérie.....	10
e. Le développement des cellules NK en dehors de la moelle osseuse	11
2. Le modèle de développement des cellules NK humaines	11
a. Stade 1 : Les pro-NK.....	12
b. Stade 2 : Les pré-NK.....	12
c. Stade 3 : Les cellules NK immatures	13
d. Stade 4 : Les cellules NK CD56 ^{bright}	14
e. Stade 5: Les étapes de maturation des cellules NK.....	14
B. LES RECEPTEURS DES CELLULES NK	16
1. La superfamille des lectines de type C	17
a. Les hétérodimères CD94/NKG2.....	17
b. Le NKG2D.....	18
c. Le Ly49.....	19
2. Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines	20
a. Les récepteurs KIR	20
b. Les récepteurs ILT/LIR (Immunoglobulin like transcripts/Leucocyte Ig like Receptors)	22
3. Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptor)	23
4. Les TLR	25
5. Les récepteurs aux chimiokines	28

a.	Introduction générale sur les chimiokines et leurs récepteurs.....	28
i.	La définition des chimiokines et leur rôle dans le système immunitaire.....	28
ii.	La classification des chimiokines.....	28
iii.	Les récepteurs aux chimiokines.....	29
b.	La régulation de la migration des cellules NK par les chimiokines.....	29
c.	La régulation de l'activité cytotoxique des cellules NK par les chimiokines.....	30
6.	Les autres récepteurs.....	31
a.	Les molécules d'adhérence.....	31
i.	Le CD56.....	31
ii.	Le CD49b.....	32
iii.	Le CD27.....	32
iv.	Le CD11b.....	33
v.	Le CD11a.....	33
b.	Les récepteurs aux cytokines.....	34
i.	Le CD122, une sous-unité des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15.....	34
ii.	Le CD127, une sous-unité du récepteur à l'IL-7.....	34
iii.	Le CD117.....	35
c.	Les autres marqueurs de surface.....	36
i.	Le CD16.....	36
ii.	Le CD107a.....	36
iii.	Le NK1.1.....	37
C.	L'EDUCATION DES CELLULES NK : ACTIVATION ET SELF TOLERANCE.....	37
1.	Les premières hypothèses et modèles expliquant la tolérance du Soi et l'activation des cellules NK.....	38
a.	L'hypothèse du « missing-self ».....	38
b.	Le modèle du « at least one ».....	39
2.	Le modèle actuel de tolérance du Soi : la théorie du «licensing».....	39
a.	La définition du licensing.....	39
b.	L'hypothèse « arming » ou « stimulatory receptor ».....	40
c.	L'hypothèse « disarming » ou « inhibitory receptor ».....	40
d.	Le modèle du rhéostat, complément de la théorie du « licensing ».....	41
D.	LE TRAFIC DES CELLULES NK.....	42
1.	Le trafic des cellules NK en condition basale.....	42
a.	L'export de la moelle osseuse.....	42

i. Les CXCR4 et CXCR3.....	42
ii. Le récepteur S1P ₅	43
b. L'atteinte des organes lymphoïdes.....	44
c. L'atteinte des organes non lymphoïdes	45
2. Le trafic des cellules NK en des conditions inflammatoires.....	45
a. Les sélectines	46
b. Les intégrines.....	46
c. La Platelet Endothelial Cell Adhesion Molécule-1 (PECAM-1)	47
d. La chimiotaxie.....	47
e. Un exemple de recrutement des cellules NK : le recrutement des cellules NK dans les ganglions lymphatiques inflammés.....	47
E. LES FONCTIONS EFFECTRICES DES CELLULES NK.....	48
1. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules NK.....	48
a. L'exocytose des granules lytiques : la cytotoxicité naturelle et l'ADCC	48
i. L'internalisation des molécules cytolytiques à l'intérieur de la cellule cible	49
ii. L'induction de la mort cellulaire par les granules lytiques.....	49
b. Les voies indépendantes de l'exocytose des granules lytiques : les voies des récepteurs de mort	54
i. La voie Fas/Fas-L.....	54
ii. La voie TRAIL/TRAIL-R.....	55
2. La régulation de la réponse immune par les cellules NK	57
a. La production de cytokines et de chimiokines	57
i. Les chimiokines	57
ii. Les cytokines	58
b. Les interactions avec les cellules dendritiques.....	60
i. Les conditions nécessaires pour un dialogue croisé entre les cellules NK et les DC.....	61
ii. L'effet des interactions NK/DC sur la DC.....	62
iii. L'effet des interactions NK/DC ou NK/monocytes sur la cellule NK	65
c. Les interactions entre les cellules NK et les lymphocytes T	68
i. Les interactions avec les lymphocytes effecteurs	68
ii. Les interactions avec les lymphocytes T régulateurs (Treg).....	71
CHAPITRE 2: L'ASTHME ALLERGIQUE	75
Introduction.....	75
A. LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE.....	76
1. La caractérisation de l'asthme allergique.....	76

2. Les phases de la réaction allergique: la phase de sensibilisation et la phase effectrice	77
a. La phase de sensibilisation à l'allergène: Synthèse d'IgE et leur fixation sur les récepteurs FcεRI.....	77
i. Les IgE et leur synthèse	77
ii. Les récepteurs aux IgE.....	78
b. La phase effectrice.....	79
B. LES PRINCIPAUX MEDIATEURS CELLULAIRES DE LA REACTION INFLAMMATOIRE ALLERGIQUE	80
1. Les cellules dendritiques	80
a. Les DC pulmonaires	81
b. Les DC et l'orientation de la réponse immune	81
i. La différenciation Th1/Th2	82
ii. La différenciation des Treg.....	84
c. Mise en évidence des fonctions des DC dans la réaction pulmonaire allergique expérimentale	85
i. L'induction de l'asthme expérimental par les DC	85
ii. Les DC et la tolérance dans l'asthme expérimental	86
d. La caractérisation des DC chez les sujets allergiques.....	86
i. Les modifications quantitatives et phénotypiques des DC dérivées de monocytes (MD-DC), des mDC et des pDC	86
ii. Modifications fonctionnelles des MD-DC, des mDC et des pDC	87
2. Les lymphocytes Th1 et Th2	88
a. Les principales caractéristiques phénotypiques des lymphocytes Th1 et Th2	88
i. L'expression des récepteurs aux cytokines et chimiokines sur les lymphocytes Th1	88
ii. L'expression des récepteurs aux cytokines et chimiokines sur les lymphocytes Th2	89
b. La polarisation des cellules vers le profil Th1 ou Th2	90
i. La différenciation Th1 (Figure 19)	91
ii. La différenciation Th2 (Figure 20)	91
iii. La régulation croisée entre les facteurs impliqués dans les voies de différenciation Th1 et Th2	92
c. L'implication des lymphocytes Th1 et Th2 dans la réaction pulmonaire allergique	92
i. Les observations chez les sujets allergiques	92
ii. Les modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique	93
3. Les lymphocytes Th17.....	96
a. Le développement des lymphocytes Th17 (Figure 22)	96
i. Les facteurs de transcription nécessaires à la différenciation Th17	96

ii. Le développement chez la souris	97
iii. Le développement chez l'homme	97
b. Les lymphocytes Th17 et la réaction pulmonaire allergique.....	98
i. L'implication des lymphocytes Th17, et plus particulièrement de l'IL-17, dans l'asthme sévère humain	98
ii. L'implication des lymphocytes Th17 dans les modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique.....	99
4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	101
a. Les caractéristiques générales des Treg	101
i. Les Treg naturels	101
ii. Les Treg adaptatifs	103
b. Les Treg dans la pathologie allergique asthmatique.....	106
i. Le rôle des Treg dans les modèles animaux d'inflammation pulmonaire allergique.....	106
ii. Le rôle des Treg dans l'asthme et l'allergie chez l'homme	107
5. Les mastocytes	109
a. Les caractéristiques générales.....	109
b. L'activation et le recrutement des mastocytes	110
c. Les médiateurs et les fonctions effectrices des mastocytes dans les réactions allergiques..	110
i. Les granules préformés	110
ii. Les médiateurs lipidiques.....	111
iii. Les cytokines et chimiokines	111
iv. Les mastocytes et la réaction allergique	112
6. Les éosinophiles	113
a. Les caractéristiques générales.....	113
b. La migration des éosinophiles vers les tissus inflammés	114
c. Les stimuli permettant la libération des médiateurs éosinophiliques.....	115
d. Les médiateurs et les fonctions effectrices des éosinophiles	116
i. Les granules préformés	116
ii. Le LTC4, médiateur lipidique.....	117
iii. Les cytokines et chimiokines	117
iv. L'éosinophile, cellule présentatrice d'antigènes accessoire	118
v. L'importance de l'éosinophile dans l'asthme allergique.....	118
7. Les basophiles	119
a. Les caractéristiques générales.....	119
b. La migration des basophiles vers les tissus	119

c.	L'activation et les fonctions effectrices des basophiles	120
i.	Des exemples d'activation directe ou de potentialisation de l'activation	120
ii.	Les basophiles et la réaction allergique	121
8.	Les neutrophiles	121
a.	Les caractéristiques générales.....	121
b.	La migration des neutrophiles vers les poumons.....	122
c.	Les neutrophiles et la réaction allergique	122
9.	Les macrophages alvéolaires.....	123
a.	Les observations sur les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques.....	123
i.	L'activation des macrophages alvéolaires via une voie dépendante des IgE.....	123
ii.	L'activation des macrophages via une voie indépendante des IgE.....	124
iii.	Les autres modifications phénotypiques des macrophages alvéolaires chez les sujets asthmatiques allergiques	125
b.	Les macrophages alvéolaires dans des modèles d'asthme expérimental.....	125
10.	Les cellules NKT	126
a.	Les sous-populations de cellules iNKT	126
b.	L'implication des cellules iNKT dans l'asthme expérimental.....	127
c.	L'implication des cellules NKT chez les sujets asthmatiques	128
11.	Les cellules NK.....	129
a.	Les arguments en faveur de l'implication des cellules NK dans l'inflammation pulmonaire allergique chez la souris	129
b.	Les arguments en faveur de l'implication des cellules NK chez les sujets asthmatiques allergiques	130
i.	Les modifications quantitatives et phénotypiques	130
ii.	Les modifications fonctionnelles.....	131
iii.	Les effets des corticostéroïdes et de l'immunothérapie spécifique de l'allergène	131
C.	LES MEDIATEURS SOLUBLES DE LA REACTION INFLAMMATOIRE ALLERGIQUE	131
1.	Les cytokines	131
a.	Les cytokines pro-Th2	132
i.	L'IL-4	132
ii.	L'IL-13	134
iii.	L'IL-9	135
iv.	L'IL-25	136
v.	L'IL-19	137
b.	Les cytokines associées à l'inflammation	137

i. Les cytokines pro-inflammatoires	137
ii. Les cytokines principalement associées à l'éosinophilie	145
c. Les cytokines associées au remodelage bronchique.....	147
i. Le TGF- β	147
ii. Le PDGF	148
iii. L'IL-11	148
iv. Le VEGF.....	149
d. Les cytokines immunorégulatrices	150
i. L'IL-10	150
ii. L'IFN- γ	150
iii. L'IL-12	151
2. Les chimiokines	152
a. Les récepteurs et leurs ligands impliqués dans la réaction inflammatoire allergique	152
i. Le CCR3 et ses ligands CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL24 et CCL26	152
ii. Le CCR4 et ses ligands CCL17 et CCL22	155
iii. Le CCR8 et son ligand CCL1	157
iv. Le CXCR3 et ses ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11	158
v. Le CXCR4 et son ligand CXCL12	159
b. Une chimiokine particulière dans la pathologie pulmonaire : CCL18	160
i. Du gène à la protéine	160
ii. Les sources cellulaires de CCL18	160
iii. L'activité biologique de CCL18 et son rôle dans les pathologies allergiques	162
BUT DU TRAVAIL DE THESE	165
DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX DE RECHERCHE, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	167
PREMIERE PARTIE.....	168
ETUDE DES VARIATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES CELLULES NK ET EFFET DE LEUR DEPLETION DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL	168
1. Les cellules NK s'accumulent dans les ganglions médiastinaux et régulent l'éosinophilie pulmonaire dans un modèle murin d'asthme	168
2. Perspectives dans le modèle BALB/c	180
3. Analyse des modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK dans un modèle d'asthme expérimental chez les souris C57BL/6	181
4. Perspectives dans le modèle C57BL/6.....	194

DEUXIEME PARTIE	196
EFFET DE CCL18 SUR LES CELLULES NK DE SUJETS ALLERGIQUES ET DE SUJETS NON ALLERGIQUES	196
1. Matériels et méthodes	196
2. Résultats	200
3. Discussion	206
4. Perspectives	209
ANNEXES.....	211
Annexe 1: Classification et sources cellulaires/tissulaires des chimiokines	212
Annexe 2: Classification des récepteurs aux chimiokines	213
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	214
FIGURES	280

ABREVIATIONS

ADCC: Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity / Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

AIF: Apoptosis-Inducing Factor

CD40L: CD40-Ligand

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène

DC: Cellule Dendritique

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

EAE: Encéphalomyélite Allergique Expérimentale

ECP: Eosinophil Cationic Protein

EDN: Eosinophil-Derived Neurotoxin

EPO: Eosinophil Peroxydase

FADD: Fas-Associated Death Domain

Fc: Fragment constant

GITR: Glucocorticoid-Inducible TNF Receptor

HDM: House Dust Mite, Acariens de la poussière de maison

HEV: High Endothelial Venules

HMGB1: High Mobility Group B1

HRB: HyperRéactivité Bronchique

ICAD: Inhibitor of Caspase-Activated DNase

ICAM: InterCellular Adhesion Molecule

iDC: Cellule Dendritique immature

IDO: Indoleamine 2,3-Dioxygenase

Ig: Immunoglobuline

IKDC: IFN-producing Killer DC

ILT/ILR: Immunoglobulin Like Tanscripts/Leucocyte Ig like Receptors

ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs

ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs

Jak: Janus kinase

KIR: Killer-Immunoglobulin-like Receptor

LBA: Lavage BronchoAlvéolaire

LFA-1: Leukocyte Function-associated Antigen-1

LT: Leucotriène

MBP: Major Basic Protein
MC: Mastocytes
mDC: Cellule Dendritique myéloïde
MD-DC: Monocyte Derived-Dendritic Cell / DC dérivées de monocytes
MULT-1: Murine UL16-binding protein like Transcript-1
NCR: Natural Cytotoxicity Receptor
NK: Natural Killer
NKp: NK precursor / Précurseur de cellules NK
ODN: OligoDéoxyNucléotides
OVA: Ovalbumine
OX40L: OX40-Ligand
PAF: Platelet-Activating Factor
pDC: Cellule Dendritique plasmacytoïde
PECAM-1: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molécule-1
PG: Prostaglandine
Poly(I:C): acide polyinosinique:acide cytidylique
PSGL-1: P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
RAE-1: Retinoic Acid Early inducible-1
ROS: espèces réactives à l'oxygène
SCF: Stem Cell Factor
Stat: Signal transducers and activators transcription
tBid: Bid tronquée
TLR: Toll-Like Receptor
TRAIL: Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg: Lymphocytes T régulateurs
TSLP: Thymic Stromal LymphoPoietin
ULBP: UL16 binding protein
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEMS: Volume Expiratoire Maximum Seconde
VLA: Very Late Antigen

RESUME

Les maladies allergiques sont en constante augmentation tant en prévalence qu'en gravité. Les mécanismes physiopathologiques connus impliquent l'induction d'une réponse Th2 par les cellules dendritiques, conduisant à une production d'IgE et une inflammation. L'immunité innée a récemment été mise en avant dans le contrôle de l'immunité adaptative, spécifique de l'antigène. Cependant, le rôle des cellules Natural Killer (NK), cellules de l'immunité innée connues essentiellement pour leurs fonctions anti-tumorales et anti-microbiennes, est encore inconnu dans la pathologie allergique. Néanmoins, quelques études ont montré une modification de certaines sous-populations de cellules NK chez les patients asthmatiques allergiques.

Le but général du travail de thèse était d'étudier le rôle des cellules NK dans l'asthme allergique. Dans un premier temps, les variations quantitatives et qualitatives des cellules NK, ainsi que l'effet de leur déplétion ont été évalués dans l'asthme expérimental. Dans un deuxième temps, l'effet de CCL18, chimiokine impliquée dans l'asthme allergique, a été étudié sur les cellules NK de sujets non allergiques et de sujets allergiques.

Chez des souris BALB/cByJ sensibilisées et provoquées à l'ovalbumine (OVA), une augmentation du nombre de précurseurs de cellules NK, mais également du nombre de cellules NK, et plus particulièrement des cellules NK immatures, a été observée dans les ganglions médiastinaux (ganglions drainant les poumons). Celle-ci était accompagnée d'une augmentation du pourcentage de cellules NK ayant incorporé du BrdU. Outre ces variations quantitatives, une activation des cellules NK a été constatée. Dans les poumons, le nombre total de cellules NK n'était pas modifié. Néanmoins, une diminution significative du nombre de cellules NK les plus matures a été observée. De plus, comme dans les ganglions médiastinaux, les cellules NK pulmonaires étaient activées. L'effet de la déplétion des cellules NK par administration de l'anticorps anti-ASGM1 avant les provocations allergéniques a ensuite été évalué sur l'inflammation pulmonaire allergique. La déplétion en cellules NK (73%) a significativement diminué l'éosinophilie dans les lavages bronchoalvéolaires, sans affecter pour autant l'hyperréactivité bronchique et les taux sériques d'immunoglobulines spécifiques de l'OVA (IgE, IgG2a et IgG1). Chez des souris C57BL/6 sensibilisées et provoquées à l'OVA, aucune modification du nombre de cellules NK et de la distribution des sous-populations n'a été observée dans les ganglions médiastinaux, contrastant ainsi avec le modèle précédent. D'un point de vue phénotypique, les cellules NK étaient activées et davantage de cellules NK exprimaient le CD107a à la membrane témoignant ainsi d'une dégranulation. Dans les poumons, le pourcentage de cellules NK les plus matures était diminué chez les souris sensibilisées et provoquées à l'OVA. Les cellules NK

pulmonaires étaient également activées et l'expression membranaire du CD127 était augmentée. Le pourcentage de cellules NK exprimant l'IFN- γ ou le granzyme B était diminué, alors que celui de cellules NK exprimant le CD117 ou le CD107a était augmenté. Par conséquent, l'ensemble de nos résultats montre que les cellules NK présentent des modifications phénotypiques et fonctionnelles au cours de l'asthme expérimental.

CCL18 est une chimiokine produite préférentiellement au niveau du poumon. Dans le laboratoire, il a été montré que la production de CCL18 était augmentée chez les patients asthmatiques, et qu'elle recrutait les lymphocytes Th2 et les basophiles, suggérant le rôle de cette chimiokine dans l'asthme allergique. Notre objectif était d'évaluer la réponse des cellules NK isolées du sang périphérique de sujets allergiques vis-à-vis de CCL18 et de la comparer à celle de sujets non allergiques. Le récepteur de CCL18 étant encore inconnu, son expression par les cellules NK a été analysée par la fixation de CCL18 biotinylée. L'étude en cytométrie en flux a révélé que des cellules NK de donneurs allergiques et non allergiques exprimaient un récepteur pour CCL18. De plus, les cellules NK de sujets allergiques et non allergiques migraient en réponse à CCL18, et ce dans une voie dépendante des protéines G. L'attraction des cellules NK par CCL18 était dépendante du donneur, mais indépendante du statut allergique. Aucune attraction préférentielle d'une sous-population de cellules NK (CD56^{high} ou CD56^{low}) par CCL18 n'a été mise en évidence. CCL18 était également capable de stimuler la cytotoxicité des cellules NK de sujets allergiques et de donneurs non allergiques vis-à-vis des cellules cibles Jurkat. Les réponses étaient variables en fonction du donneur, mais une fois encore étaient indépendantes du statut allergique. Enfin, CCL18 n'induisait pas de production de cytokines (IFN- γ) par les cellules NK de sujets allergiques et non allergiques. Au vu de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que les cellules NK de sujets allergiques sont attirées et activées par CCL18 de façon similaire aux cellules NK de sujets non allergiques.

En résumé, ces travaux ont permis de montrer que, dans un modèle murin d'asthme allergique, les cellules NK s'accumulent dans les ganglions médiastinaux et semblent réguler l'éosinophilie pulmonaire. Nous avons également montré que les cellules NK de sujets allergiques ne présentaient pas de dysfonctionnement dans la réponse vis-à-vis de CCL18 comparativement aux sujets non-allergiques.

PREMIERE PARTIE: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1: LES CELLULES NATURAL KILLER

Introduction

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

A. LE DEVELOPPEMENT DES CELLULES NK

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

1. Le modèle de développement des cellules NK chez la souris

Lors de la phase médullaire, l'engagement des précurseurs hématopoïétiques vers la lignée des cellules NK, l'acquisition de molécules impliquées dans la reconnaissance de la cible par les cellules NK immatures et leur différenciation en cellules NK matures constituent les 3 étapes clé du développement des cellules NK. Une analyse plus approfondie des marqueurs de surface a abouti à l'élaboration d'un modèle de développement des cellules NK murines composé de 6 stades (Stades A-F, Figure 1) (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006).

La phase médullaire est suivie par une phase périphérique où les cellules NK activées achèvent leur différenciation, aboutissant ainsi à des cellules NK matures davantage cytotoxiques et productrices de cytokines.

a. Etape 1: La génération de précurseurs des cellules NK (NKp)

Le stade le plus précoce de la lignée NK, stade A, est caractérisé par l'expression du CD122 (IL-2R β) et l'absence du NK1.1, CD49b et Ly49, marqueurs présents sur les cellules NK immatures et/ou matures. L'association du CD122 avec la chaîne γ commune (CD132) forme un récepteur réactif à l'IL-15, cytokine cruciale pour le développement des cellules NK murines. En condition physiologique, l'IL-15 est principalement fixée à l'IL-15R α de cellules accessoires qui présentent alors en *trans* le complexe IL-15/IL-15R α à l'hétérodimère CD122/CD132 (Burkett P.R. *et al.*, 2004; Dubois S. *et al.*, 2002). Cette *trans*-présentation de l'IL-15 est essentielle à la survie et au maintien de l'homéostasie des cellules NK matures périphériques (Cooper M.A. *et al.*, 2002; Jamieson A.M. *et al.*, 2004; Ranson T. *et al.*, 2003). *In vitro*, seulement 15% des NKp CD122⁺NK1.1⁻CD49b⁻ se différencient en cellules NK (Rosmaraki E.E. *et al.*, 2001). Une fraction de cellules au stade A exprime le NKG2D, récepteur activateur exprimé par toutes les cellules NK immatures et matures (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2005). *In vivo*, les NKp sont identifiés comme Lin⁻(CD3⁻CD19⁻Gr1⁻)CD122⁺CD49b⁻NK1.1⁻ ou Lin⁻CD122⁺CD49b⁻NKp46⁻. Les NKp expriment également des récepteurs pour les facteurs de croissance (c-kit et flt3) et de cytokines (IL-7R α et IL-15R α) ainsi que des facteurs de transcription cruciaux pour le développement lymphoïde (PU.1, GATA-3, Id2 et Ets1) (Colucci F. *et al.*, 2003; Rosmaraki E.E. *et al.*, 2001). D'un point de vue fonctionnel, les NKp ne produisent pas de façon marquée d'IFN- γ et ne présentent pas de cytotoxicité naturelle vis-à-vis de cellules cibles (Rosmaraki E.E. *et al.*, 2001).

Les facteurs permettant la transition des cellules souches hématopoïétiques en NKp ne sont pas clairement identifiés. Néanmoins, les facteurs de croissance c-kit ligand et flt3 ligand, les cytokines IL-15 et IL-7 (Williams N.S. *et al.*, 1997) et le facteur de transcription PU.1 (Colucci F. *et al.*, 2001) ont été montrés nécessaires pour la génération *in vitro* de cellules NK à partir des cellules souches hématopoïétiques. Plus récemment, la protéine p85 α (sous-unité de la Phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3kinase) recrutée par le complexe NKG2D/DAP10, a également été montrée nécessaire à la génération des NKp. Ainsi, dans la moelle osseuse et la rate de souris déficientes en p85 α (ainsi qu'en ses variants p55 α et p50 α issus de splicings alternatifs), les nombres de NKp CD3⁻CD122⁺NK1.1⁻CD49b⁻ ou CD3⁻CD122⁺NK1.1⁻NKG2A/C/E⁻ sont diminués (Awasthi A. *et al.*, 2008). Enfin, la famille de protéines Runx, impliquée dans le développement de nombreuses lignées hématopoïétiques, semble aussi nécessaire dans les stades précoces de développement des cellules NK. En effet, chez des souris exprimant des dominants négatifs pour Runx, l'expression du CD122 est diminuée (Ohno S. *et al.*, 2008), ce qui pourrait entraîner une diminution de la génération de NKp.

b. Etape 2: Les cellules NK immatures

L'élément majeur de cette étape est l'acquisition de récepteurs impliqués dans la reconnaissance du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I (CMH I) du Soi sur les cellules cibles. Chez les souris, les complexes hétérodimériques CD94/NKG2 et les molécules Ly49 constituent les 2 classes principales de récepteurs du CMH I présents à la surface des cellules NK. Ainsi, le stade B est caractérisé par une forte expression des complexes hétérodimériques CD94/NKG2 et par l'absence des molécules de la famille Ly49. Chez les souris C57BL/6, l'expression du CD161c (NKR-P1C, NK1.1) est également caractéristique de ce stade. Ce n'est qu'au stade C qu'apparaît un répertoire incomplet des récepteurs de la famille Ly49. A ce stade, la forte expression des complexes hétérodimériques CD94/NKG2 et l'incomplétude du répertoire de récepteurs Ly49 aboutissent à des cellules NK pauvrement fonctionnelles d'où la dénomination de cellules NK immatures. En effet, ces cellules présentent une faible cytotoxicité et une incapacité à produire des cytokines (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006; Kim S. *et al.*, 2002).

Très récemment, le facteur de transcription E4BP4, aussi nommé NFIL3, a été défini comme nécessaire au développement des cellules NK. Les souris déficientes en E4BP4 présentent de très fortes réductions des nombres de cellules NK immatures ($CD122^+NK1.1^+CD11b^-$) et matures ($CD122^+NK1.1^+CD11b^+$) dans la moelle osseuse, alors que le nombre de cellules NKp ($CD122^+NK1.1^-CD3^-$) n'est pas modifié. Les nombres de cellules T ($CD4^+$ et $CD8^+$), de cellules NKT et de cellules B ne sont pas affectés, suggérant la spécificité d'E4BP4 dans le développement des cellules NK. L'expression de l'E4BP4 est détectée dans les NKp, est augmentée dans les cellules NK immatures et est maintenue dans les cellules NK matures (Gascoyne D.M. *et al.*, 2009). Ce facteur induit l'expression d'Id2, facteur de transcription ayant été montré jouer un rôle critique dans le développement des cellules NK ($CD122^+CD16/32^+CD3^-$) (Yokota Y. *et al.*, 1999).

c. Etape 3: La maturation des cellules NK

i. *Le modèle 3 étapes-6 stades (Figure 1)*

Le stade D est caractérisé par l'acquisition du CD49b. Ainsi, les cellules NK coexprimant le CD122, le NK1.1 et le CD49b sont fonctionnellement compétentes et donc considérées comme des cellules NK matures. Le stade E est marqué par l'uprégulation du CD11b et le stade F par l'uprégulation du CD43. Ces 2 derniers marqueurs ont permis initialement la distinction de deux sous-populations de cellules NK matures : les cellules NK $CD11b^{low}CD43^{low}$ (stade D) et les cellules NK $CD11b^{high}CD43^{high}$ (stades E et F) (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006; Kim S. *et al.*, 2002). Ainsi, les cellules NK $CD11b^{low}CD43^{low}$ de la moelle osseuse présentent des capacités cytolytiques et de production de

cytokines moindres comparées aux cellules NK spléniques CD11b^{high}CD43^{high}. En revanche, ces cellules NK CD11b^{low}CD43^{low} sont hautement prolifératives comparées aux cellules NK CD11b^{high}CD43^{high} (Kim S. *et al.*, 2002). L'ensemble de ces données suggère que les cellules NK CD11b^{high}CD43^{high} sont davantage matures que les cellules NK CD11b^{low}CD43^{low} et qu'elles se différencient à partir de ces cellules.

Les cellules NK matures des stades D à F sont présentes dans la rate mais dans des proportions différentes de celles observées dans la moelle osseuse. Chez les souris C57BL/6, le stade E représente 60% des cellules NK de la moelle osseuse et le stade F 15 à 25%. A l'inverse, le stade F prédomine dans la rate où il représente 80 à 90% des cellules NK, alors que les stades D et E ne représentent respectivement que 3 à 5% et 5 à 10%. Cette différence peut aussi bien être le témoin d'une émigration préférentielle des cellules NK au stade tardif ou de mécanismes de différenciation agissant sur les cellules NK périphériques (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006).

ii. Le programme de maturation en 4 stades

Un nouveau modèle de maturation en 4 stades vient compléter le modèle précédemment décrit. Ainsi, les cellules NK murines peuvent être divisées en 4 sous-populations en fonction des niveaux d'expression du CD27 et du CD11b : CD11b^{low}CD27^{low}, CD11b^{low}CD27^{high}, CD11b^{high}CD27^{high} et CD11b^{high}CD27^{low} (Chiossone L. *et al.*, 2009; Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006).

Lors des premières semaines de vie post-natale ou lors d'expériences de repeuplement en cellules NK, les cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} et CD11b^{low}CD27^{high} apparaissent en premier, suivies séquentiellement des cellules NK CD11b^{high}CD27^{high} et CD11b^{high}CD27^{low}, suggérant que les cellules NK CD11b^{high}CD27^{high} et CD11b^{high}CD27^{low} se différencient à partir des cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} et/ou CD11b^{low}CD27^{high}. Ce développement séquentiel est inversement corrélé au potentiel prolifératif des sous-populations de cellules NK. Ainsi, les cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} montrent les plus forts taux de prolifération, suivies par les cellules NK CD11b^{low}CD27^{high}, alors que les cellules NK CD11b^{high}CD27^{high} et CD11b^{high}CD27^{low} possèdent de faibles capacités prolifératives. L'ensemble de ces résultats suggère que la maturation des cellules NK pourrait être modélisée en un programme composé de 4 stades : CD11b^{low}CD27^{low} → CD11b^{low}CD27^{high} → CD11b^{high}CD27^{high} → CD11b^{high}CD27^{low}.

La sous-population de cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} représente une faible proportion des cellules NK totales que ce soit dans les organes lymphoïdes ou non lymphoïdes. Elles expriment le NK1.1, le NKG2D, le NKp46 et le granzyme B à des niveaux similaires aux trois autres sous-populations. En revanche, les niveaux d'expression du CD43, du CD49b et des récepteurs Ly49 sont plus faibles, alors que le CD127 (récepteur à l'IL-7) et les NKG2A/C/E sont plus fortement exprimés. Leur capacité

proliférative, bien que supérieure aux trois autres populations, est inférieure aux NKp CD122⁺. Ainsi, les cellules NK CD11b^{low}CD27^{low} représenteraient un stade intermédiaire entre les NKp et les cellules NK CD11b^{low}CD27^{high} (Chiossone L. *et al.*, 2009).

Outre leur plus forte capacité proliférative, les cellules NK CD11b^{high}CD27^{high} sont plus cytotoxiques, produisent plus de cytokines (IFN- γ) que les cellules NK CD11b^{high}CD27^{low}. D'un point de vue phénotypique, une plus forte proportion de cellules NK CD11b^{high}CD27^{low} exprime les récepteurs Ly49. De plus, certaines cellules NK CD11b^{high}CD27^{low} expriment le récepteur inhibiteur KLRG1 (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006). Ces cellules ont un plus faible taux de turnover *in vivo*, une réponse proliférative en réponse à l'IL-15 réduite et une expansion homéostasique moindre comparativement aux cellules NK matures n'exprimant pas le KLRG1 (Huntington N.D. *et al.*, 2007). Au niveau de la distribution tissulaire de ces deux sous-populations, les cellules NK CD11b^{high}CD27^{low} sont prédominantes dans les poumons, la rate, le foie et le sang. En revanche, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques contiennent plus de cellules NK CD11b^{high}CD27^{high} que de cellules NK CD11b^{high}CD27^{low} (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006; Walzer T. *et al.*, 2007).

d. L'activation des cellules NK en périphérie

Les cellules NK peuvent être activées en périphérie, par exemple, par des cytokines. Cette activation conduit à une augmentation de leur taille, de leur granularité et de leur expression de marqueurs de surface tels que le CD45 (B220), le CD11c et le CD69 (Colucci F. and Di Santo J.P., 2000; Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006).

L'expression du CMH II, du B220 et du CD11c à la surface de cellules CD3⁻NK1.1⁺ a conduit certaines équipes à postuler à l'existence d'une population cellulaire particulière hybride de cellules NK et de cellules dendritiques (DC) : les IFN-producing killer DC (IKDC) (Chan C.W. *et al.*, 2006; Taieb J. *et al.*, 2006). Les IKDC expriment des marqueurs de surface de cellules NK tels que le NK1.1, le CD49b, le NKG2D et des récepteurs de la famille Ly49 et des marqueurs de DC conventionnelles tels que le CMH II, mais n'expriment pas Ly6C, ce qui les distingue des DC plasmacytoïdes (pDC) conventionnelles (Chan C.W. *et al.*, 2006). D'un point de vue fonctionnel, elles sont capables de lyser les cellules cibles des cellules NK et de produire de l'IFN- γ , deux principales caractéristiques des cellules NK. De plus, elles sont capables de produire des IFN de type 1 après stimulation avec des CpG ODN et de présenter l'antigène, deux caractéristiques de pDC (Chan C.W. *et al.*, 2006; Taieb J. *et al.*, 2006). Cependant, cette notion d'IKDC est controversée puisque le B220, le CD11c et le CMH II sont induits sur les cellules NK activées, suggérant plutôt que ces cellules à phénotype particulier sont des cellules NK activées. La production d'IFN de type 1 observée dans l'étude de Chan et ses collègues pourrait être attribuée à une contamination de pDC (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2007).

e. Le développement des cellules NK en dehors de la moelle osseuse

Si la moelle osseuse semble essentielle pour le développement des cellules NK (Haller O. and Wigzell H., 1977; Seaman W.E. *et al.*, 1978), certains tissus extramédullaires incluant le foie, la rate, les ganglions lymphatiques, le thymus, l'utérus et l'intestin contiennent des cellules NK (Di Santo J.P., 2006), suggérant que les cellules NK présentes dans ces sites pourraient résulter d'un processus local de différenciation. Les stades précoces (génération de NKp et peut-être de cellules NK immatures) pourraient avoir lieu au niveau de la moelle osseuse et s'exporteraient vers d'autres tissus où elles achèveraient leur différenciation (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006). Au niveau du foie, des cellules NK partageant des caractéristiques phénotypiques du stade B (CD94 / NKG2^{high}, CD51⁺ et Ly49) sont capables de se différencier en cellules NK matures (CD49b⁺ et Ly49⁺) (Takeda K. *et al.*, 2005). Dans le thymus, les cellules NK possèdent des caractéristiques phénotypiques différentes des cellules NK spléniques recirculantes, suggérant l'existence d'une origine intrathymique. Ainsi, ces cellules NK thymiques expriment fortement GATA-3 et faiblement les CD11b et CD43, possèdent un répertoire NK moins développé et expriment également le CD127 comparativement aux cellules NK spléniques (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2006). De plus, les cellules NK thymiques possèdent des caractéristiques fonctionnelles différentes des cellules NK spléniques. En effet, leur cytotoxicité est moindre, mais leur production de cytokines est plus importante quantitativement et plus diversifiée (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006). Enfin, la déficience en IL-7 ou GATA-3 diminue respectivement de manière drastique ou totale le nombre de cellules NK thymiques CD127⁺ (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2006), alors que la déficience en IL-7 ou GATA-3 n'a respectivement pas d'effet ou un effet limité sur la différenciation des cellules NK de la moelle osseuse (He Y.W. and Malek T.R., 1996; Samson S.I. *et al.*, 2003; Vosshenrich C.A. *et al.*, 2005). Les cellules NK thymiques s'exportent du thymus vers les organes lymphoïdes périphériques comme la rate, le foie et les ganglions lymphatiques (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2006). Néanmoins, en condition basale, ces cellules NK CD127⁺ ne sont présentes que dans les ganglions lymphatiques où elles représentent 20 à 30% des cellules NK. Celles-ci partagent les mêmes caractéristiques phénotypiques (faibles expressions de CD43 et de CD11b) et fonctionnelles (forte production de cytokines) que leur contrepartie thymique (Di Santo J.P. and Vosshenrich C.A., 2006).

2. Le modèle de développement des cellules NK humaines

Les cellules NK humaines sont phénotypiquement caractérisées par l'expression de CD56 et l'absence d'expression de CD3. Le niveau d'expression de CD56 à la surface des cellules NK permet leur différenciation en deux sous-populations fonctionnellement distinctes : les cellules NK CD56^{bright} et

les cellules NK CD56^{dim}. Leurs localisations et leurs propriétés fonctionnelles seront décrites dans cette partie.

Un modèle de développement des cellules NK humaines *in vivo* composé de cinq stades a été proposé (Freud A.G. and Caligiuri M.A., 2006) (Figure 2). Les trois premiers stades comportent des cellules engagées dans la lignée des cellules NK mais encore capables de se différencier en d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T et les DC myéloïdes (mDC). Les stades 4 et 5 signent l'entrée définitive dans la lignée des cellules NK.

a. Stade 1 : Les pro-NK

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

b. Stade 2 : Les pré-NK

L'absence d'expression du CD122 sur les pro-NK les rend non réactives à l'IL-15. Elles acquièrent cette caractéristique après différenciation en cellules pré-NK. Dans la moelle osseuse, la différenciation des pro-NK en pré-NK semble dépendante de flt3 ligand, de c-kit ligand, de l'IL-6 et de l'IL-7. En effet, des études à partir de précurseurs hématopoïétiques CD34⁺ humains ont montré que ces cytokines induisaient une augmentation de la fréquence des CD34⁺ réactives à l'IL-15/IL-2 (Miller J.S. *et al.*, 1999; Yu H. *et al.*, 1998), pouvant correspondre aux-pré NK de ce modèle. Dans les tissus lymphoïdes secondaires, la différenciation des pro-NK en pré-NK semble faire intervenir flt3 ligand, l'IL-3 et l'IL-7. En effet, *in vitro*, une partie de pro-NK isolées de tissus lymphoïdes secondaires stimulées par la combinaison flt3-ligand/IL-3/IL-7 acquièrent un phénotype de pré-NK et est capable de se différencier en cellules NK en réponse à l'IL-15 (Freud A.G. *et al.*, 2006).

Phénotypiquement, ces pré-NK sont notamment caractérisées par l'acquisition du CD117 (c-kit) et par la diminution de l'expression du CD34. Dans le sang périphérique, des cellules CD34^{dim}CD45RA⁺β₇^{bright} (pouvant correspondre aux-pré-NK de ce modèle) expriment à leur surface de forts taux de leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1), L-sélectine et d'intégrines α₄β₇. Ces trois molécules pourraient faciliter l'extravasation de ces cellules à travers les High Endothelium Venules (HEV) des ganglions lymphatiques. A l'inverse, les cellules CD34^{dim}CD45RA⁺β₇^{bright} présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires expriment peu ou pas de L-sélectine. Par conséquent, la L-

sélectine pourrait être impliquée dans l'extravasation de ces cellules vers les ganglions lymphatiques et son expression serait diminuée après leur entrée. En terme de localisation, ces pré-NK représentent plus de 95% des cellules CD34⁺ dans les tissus lymphoïdes secondaires, alors qu'elles ne sont que très faiblement présentes dans la moelle osseuse (moins de 1%) et le sang (moins de 6%) (Freud A.G. *et al.*, 2005).

c. Stade 3 : Les cellules NK immatures

Ce stade est caractérisé par la perte d'expression du CD34, du CD10 et des intégrines $\beta 7$, alors que l'expression du CD127 est augmentée. De plus, les antigènes associés aux autres lignées (CD3, CD4, CD5, CD19, CD14, CD123, BDCA-1, DC-SIGN...) sont totalement absents de ces cellules. Néanmoins, la population du stade 3 est encore hétérogène puisque seule une fraction des cellules appartenant à ce stade s'engage dans la lignée des cellules NK. Les cellules NK immatures expriment à des taux variables des marqueurs exprimés par les cellules NK matures tels que le CD2, le CD56 dont l'expression augmente graduellement du stade 2 au stade 4, le CD161, le 2B4 (CD244) et le NKp44. Néanmoins, certains récepteurs trouvés sur les cellules NK matures, tels que les récepteurs hétérodimériques CD94/NKG2, le NKG2D, le NKp46, le CD16 ou les KIR ne sont pas encore exprimés (Freud A.G. and Caligiuri M.A., 2006). Le défaut d'expression de ces récepteurs est corrélé à un défaut fonctionnel. Ainsi, ces cellules ne peuvent ni produire d'IFN- γ ni lyser les cellules cibles déficientes en CMH I (Freud A.G. *et al.*, 2006; Trinchieri G., 1989). Néanmoins, des cellules NK immatures isolées et stimulées *ex vivo* par la combinaison IL-2/PMA/Ionomycine produisent du GM-CSF (Freud A.G. *et al.*, 2006). De plus, des cellules NK immatures générées *in vitro* par de fortes doses d'IL-2 produisent des cytokines de type 2 (IL-13) et lysent des cellules Jurkat via l'expression de Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) (Zamai L. *et al.*, 1998).

Dans les tissus lymphoïdes secondaires, la majorité des cellules de stade 3 CD34⁻CD117⁺CD161⁺CD94⁻ expriment sélectivement et abondamment les ARNm de l'IL-22 (cytokine Th17) et de l'IL-26 et produisent de l'IL-22 (marquage intracellulaire), cytokine impliquée dans l'immunité de la muqueuse (Hughes T. *et al.*, 2009). Une population de cellules NK produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17 et exprimant le NKp44 a été caractérisée au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses tels que les plaques de Peyer. Les cellules NKp44⁺ sont également positives pour l'IL-26 et le LIF (leukaemia inhibitory factor), deux médiateurs qui activent, tout comme l'IL-22, les cellules épithéliales. Ces cellules possèdent pour la plupart d'entre elles un récepteur CCR6 fonctionnel et sont capables de produire la chimiokine CCL20, couple impliqué dans la migration des lymphocytes (B, T CD4⁺ et Th17) et des DC vers la muqueuse. Ainsi, la production de CCL20 par les cellules NK22

promeut l'attraction de différents types cellulaires mais également leur propre accumulation (Cella M. *et al.*, 2009).

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

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

D'un point de vue phénotypique, la progression vers ce stade est marquée par l'acquisition du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, du NKG2D, du NKp46, du CD122 et des granules de perforine et par la diminution de l'expression du CD117, du CD127 et du CD33 (Freud A.G. and Caligiuri M.A., 2006). De plus, ces cellules n'expriment pas voire peu le CD16 et les récepteurs KIR. D'un point de vue fonctionnel, leur contenu en granules intra-cytoplasmiques étant faible, ces cellules sont peu cytotoxiques *ex vivo* mais sont tout de même capables, pour la plupart, de tuer les cellules cibles via la perforine et Fas-ligand. De plus, de par leur abondante sécrétion de cytokines (essentiellement l'IFN- γ) après stimulation, ces cellules NK apparaissent comme une population régulatrice de la réponse immune (Cooper M.A. *et al.*, 2001; Freud A.G. *et al.*, 2006; Jacobs R. *et al.*, 2001).

En terme de localisation, les cellules NK CD56^{bright} représentent 90% des cellules NK des ganglions lymphatiques et des amygdales, alors qu'elles ne représentent que 10% des cellules NK du sang périphérique (Fehniger T.A. *et al.*, 2003; Ferlazzo G. *et al.*, 2004). Ces cellules sont également retrouvées au niveau des sites inflammatoires (par exemple dans le liquide pleural de patients souffrant de maladies pulmonaires malignes ou infectieuses) (Dalbeth N. *et al.*, 2004).

Certaines cellules du stade 4 sont encore déficientes en perforine et en IFN- γ , suggérant l'existence d'une étape de maturation supplémentaire (Freud A.G. and Caligiuri M.A., 2006; Freud A.G. *et al.*, 2006).

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

Les cellules NK du sang périphérique peuvent être divisées en 2 sous-populations en fonction du niveau d'expression du CD56 : les cellules CD56^{bright} (stade 4) et les cellules NK CD56^{dim} (Cooper M.A.

et al., 2001). Les cellules NK CD56^{dim}, exprimant faiblement le CD56 à leur surface, expriment le CD16 et les récepteurs KIR (CD158a, CD158b...) et possèdent de grandes quantités de granules intracytoplasmiques contenant de la perforine et les granzymes A. Ainsi, ces cellules sont très cytotoxiques mais prolifèrent peu et produisent peu de cytokines (Jacobs R. *et al.*, 2001). Elles représentent 90% des cellules NK du sang périphérique, de la moelle osseuse et de la rate.

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

- Seules les cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique expriment le CD117 comme les précurseurs hématopoïétiques (Matos M.E. *et al.*, 1993).
- Certaines cellules NK CD56^{bright} du sang périphérique ne contiennent pas de granules intracytoplasmiques, alors que toutes les cellules NK CD56^{dim} en possèdent (Lanier L.L. *et al.*, 1986).
- La culture de précurseurs CD34⁺ en présence d'IL-2 et d'IL-15 conduit principalement à la génération de cellules NK CD56^{bright}CD16⁻KIR⁻ (Lotzova E. *et al.*, 1993; Mrozek E. *et al.*, 1996).
- Après transplantation de précurseurs CD34⁺, les premières cellules issues de ces précurseurs sont les cellules NK CD56^{bright}, les CD56^{dim} n'apparaissant que plus tardivement (Jacobs R. *et al.*, 1992; Shilling H.G. *et al.*, 2003; Vitale C. *et al.*, 2004).
- Dans le sang et les tissus lymphoïdes secondaires, les cellules NK KIR⁺ sont principalement présentes parmi la fraction cellulaire CD94^{+/-}CD16⁺, indiquant que l'acquisition des KIR est cumulative et stable et a lieu durant des événements tardifs de maturation à la fois *in vitro* et *in vivo* (Miller J.S. and McCullar V., 2001; Shilling H.G. *et al.*, 2002; Sivori S. *et al.*, 2003; Valiante N.M. *et al.*, 1997; Vitale C. *et al.*, 2004).
- *In vitro*, les cellules NK CD56^{bright} du sang circulant sont capables de se différencier en cellules NK CD56^{dim} partageant les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK CD56^{dim} du sang circulant. Cette différenciation ne touche que 30 à 40% des cellules NK CD56^{bright} et nécessiterait une interaction entre le CD56 et le FGFR1 présent à la surface des fibroblastes. Cette différenciation est retrouvée *in vivo* où la quasi-totalité des cellules NK CD56^{bright} injectées à des souris NOD-SCID se différencient en cellules NK CD56^{dim} (Chan A. *et al.*, 2007).
- Les cellules NK CD56^{dim} isolées du sang périphérique possèdent des télomères plus courts que les cellules NK CD56^{bright}, renforçant ainsi l'hypothèse selon laquelle les cellules NK CD56^{dim} seraient plus matures que les cellules NK CD56^{bright} (Chan A. *et al.*, 2007).
- Une étude récente a montré que, *in vivo*, la transprésection de l'IL-15 conduit à la différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}. Ainsi, le transfert de cellules NK CD56^{bright}CD16⁻KIR⁻ (stade 4) à des souris BALB/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} traitées avec de l'IL-15 humaine liée

de façon covalente à IL-15R α humain aboutit à la différenciation en cellules NK CD16⁺ exprimant pour certaines des récepteurs KIR. L'IL-15 *trans*-présentée induit donc *in vivo* l'expression des récepteurs KIR sur les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺ et suggère que les récepteurs KIR sont exprimés après le CD16 et que l'acquisition de ces récepteurs KIR représente une étape encore plus tardive dans la différenciation des cellules NK (Huntington N.D. *et al.*, 2009).

Bien que la quasi-totalité des études supporte une différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}, une étude a proposé que les cellules CD56^{bright} du sang périphérique représenteraient un stade activé plutôt qu'un stade immature. Les cellules NK isolées du sang périphérique, majoritairement CD56^{dim}, cultivées en présence d'IL-12 ont une expression augmentée du CD56 et une expression diminuée du CD16, leur conférant ainsi un phénotype de cellules NK CD56^{bright}. Tout comme les cellules CD56^{bright} du sang périphérique, ces cellules possèdent une expression accrue de récepteurs activateurs (NKp44 et NKp46), du CD161 et de molécules d'adhérence/costimulation (CD2, CD62L et CD244). D'un point de vue fonctionnel, en réponse à des stimuli spécifiques (IL-12, NKp46, lignées tumorales et activation du CD16), les cellules NK CD56^{bright} produisent davantage d'IFN- γ et de TNF- α comparativement aux cellules NK CD56^{dim}. De plus, ces cellules acquièrent la capacité de produire de l'IL-10 pouvant indiquer une entrée en apoptose, suggérant ainsi que ces cellules sont à un stade terminal de différenciation. Enfin, la faible capacité cytotoxique de ces cellules liée à la diminution des granules intra-cytoplasmiques serait attribuée à une récente dégranulation *in vivo* (Loza M.J. and Perussia B., 2004).

B. LES RECEPTEURS DES CELLULES NK

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques d'antigènes mais sont néanmoins capables de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées ou des cellules tumorales. Leur système de discrimination du Soi et du non-Soi ou du Soi altéré met en jeu des récepteurs capables d'interagir avec les molécules du CMH I ainsi que d'autres récepteurs aux ligands mal connus. Trois grandes familles de récepteurs ont été décrites : 1) la superfamille des lectines de type C, 2) la superfamille des Immunoglobulines (Ig) avec les Killer Immunoglobulin-like Receptors (KIR) chez l'homme et 3) les Natural Cytotoxicity Receptors (NCR). Les cellules NK expriment également certains TLR et des récepteurs de cytokines/chimiokines qui jouent un rôle essentiel dans l'activation et le recrutement des cellules NK.

1. La superfamille des lectines de type C

a. Les hétérodimères CD94/NKG2

Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK humaines sous la forme d'hétérodimères. Ceux-ci comprennent une sous-unité commune invariante, le CD94, liée de façon covalente à une sous-unité codée par un gène de la famille NKG2 (Brooks A.G. *et al.*, 1997; Carretero M. *et al.*, 1997; Lazetic S. *et al.*, 1996). Alors que le CD94 est un simple gène ne présentant pas ou peu de polymorphisme allélique (Chang C. *et al.*, 1995), la famille NKG2 comprend quatre gènes *NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* et *NKG2D/F*. Le CD94 et les quatre gènes sont colocalisés sur le chromosome humain 12p12.3-p13.1. Les domaines extracellulaires et cytoplasmiques du *NKG2A*, *NKG2C* et *NKG2E* sont structurellement divers, suggérant ainsi à la fois des différences dans la reconnaissance du ligand et dans la transduction du signal (Adamkiewicz T.V. *et al.*, 1994; Houchins J.P. *et al.*, 1991; Plougastel B. *et al.*, 1996; Plougastel B. and Trowsdale J., 1997; Yabe T. *et al.*, 1993). Concernant la transduction du signal, celle-ci semble assurée par le récepteur NKG2 puisque le CD94 est dépourvu de partie cytoplasmique (Chang C. *et al.*, 1995). Les complexes CD94/*NKG2A*, CD94/*NKG2B* (le *NKG2B* étant une forme alternative du *NKG2A*) et CD94/*NKG2C* reconnaissent la molécule du CMH I non classique, HLA-E. Contrairement aux autres molécules du CMH I qui fixent et présentent des peptides cytoplasmiques du Soi, les molécules HLA-E fixent et présentent des peptides dérivés de séquences signal des molécules du CMH I classiques HLA-A, HLA-B, HLA-C et de la molécule du CMH I non classique HLA-G. La fixation de ces séquences signal est indispensable pour la stabilisation et l'expression membranaire des molécules HLA-E. Ainsi, une diminution de l'expression des molécules du CMH I HLA-A, HLA-B, HLA-C et HLA-G mène à une réduction de l'expression membranaire de la molécule HLA-E. L'interaction entre les complexes CD94/NKG2 et la molécule HLA-E permet alors aux cellules NK de surveiller indirectement l'expression des autres molécules du CMH I par une cellule donnée et de surveiller directement l'expression de la molécule HLA-E en elle-même (Borrego F. *et al.*, 1998; Braud V. *et al.*, 1997; Braud V.M. *et al.*, 1998; Braud V.M. *et al.*, 1998; Lee N. *et al.*, 1998; Llano M. *et al.*, 1998). Chez la souris, les complexes hétérodimériques CD94/*NKG2A*, CD94/*NKG2C* et CD94/*NKG2E* reconnaissent une molécule proche de la molécule HLA-E: la molécule Qa-1 (Vance R.E. *et al.*, 1998). Hormis la reconnaissance d'un ligand différent et leur localisation chromosomique différente (chromosome 6), les complexes murins CD94/NKG2 présentent les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles que leurs homologues humains.

D'un point de vue fonctionnel, seuls les hétérodimères CD94/*NKG2A* et CD94/*NKG2B* sont inhibiteurs. Au niveau de leur domaine cytoplasmique, ces complexes présentent des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs (ITIM). Après phosphorylation de la tyrosine de ce

motif, des phosphatases, et plus particulièrement SHP-1, sont recrutées, conduisant ainsi à la transduction d'un signal négatif (Lanier L.L., 1998). Les hétérodimères CD94/NKG2C et CD94/NKG2E sont, quant à eux, des récepteurs activateurs. Ces récepteurs ne contiennent pas de motifs ITIM dans leur domaine cytoplasmique, mais sont associés à la protéine DAP12 contenant des motifs Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs (ITAM), relayant ainsi des signaux activateurs aboutissant à la fois à la sécrétion de cytokines/chimiokines et à la cytotoxicité (Lanier L.L., 2008) (Figure 3). Généralement, que ce soit pour les complexes CD94/NKG2 ou les autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance des molécules du CMH I (tels que les KIR humains qui feront l'objet d'une description ultérieure), la fixation du CMH I sur les récepteurs activateurs est de plus faible affinité, suggérant ainsi une dominance de l'inhibition (Bryceson Y.T. *et al.*, 2006; Lanier L.L., 1998).

b. Le NKG2D

Contrairement aux autres membres de la famille NKG2, le NKG2D s'exprime sous forme d'homodimères et ne contient aucun motif de signalisation connu dans son domaine intracellulaire. Ainsi, le NKG2D s'associe à des protéines adaptatrices via des résidus chargés dans son domaine transmembranaire. Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, le NKG2D forme un complexe avec la protéine adaptatrice DAP10 (Nausch N. and Cerwenka A., 2008; Wu J. *et al.*, 1999). Contrairement à la protéine adaptatrice DAP12, DAP10 ne contient pas de motifs ITAM mais un autre motif permettant le recrutement de la PI-3kinase et du complexe Grb2-Vav, relayant des signaux activateurs aboutissant uniquement à la cytotoxicité (Lanier L.L., 2008) (Figure 4). Chez la souris, le NKG2D s'associe également avec la protéine adaptatrice DAP12 (Rosen D.B. *et al.*, 2004). Outre cette différence, chez la souris, le NKG2D existe sous deux isoformes : l'isoforme courte (NKG2D-S) exprimée à la surface des cellules NK après activation et l'isoforme longue (NKG2D-L, contenant treize acides aminés de plus) exprimée à la surface des cellules NK au repos. Initialement, il a été décrit que le NKG2D-L ne s'associait pas à DAP12, alors que le NKG2D-S s'associait avec DAP10 et DAP12 (Diefenbach A. *et al.*, 2002). Plus récemment, il a été conclu que les deux isoformes pouvaient s'associer aux deux adaptateurs, et ce de façon équivalente (Rabinovich B. *et al.*, 2006).

Le NKG2D fixe de multiples ligands protéiques ressemblant aux molécules de CMH I dont l'expression est régulée par différents stimuli (Tableau 1). Chez la souris, certains ligands appartiennent à la famille de protéines Retinoic Acid Early inducible-1 (RAE-1) dont 5 membres ont été décrits (RAE-1 α - ϵ) et dont l'expression est augmentée à la surface des cellules transformées ou infectées par un virus. Le NKG2D murin fixe également l'antigène mineur du CMH H60 exprimé à la surface des cellules tumorales et le Murine UL16-binding protein like Transcript-1 (MULT-1) (Lanier L.L., 2003; Nausch N. and Cerwenka A., 2008). Dans les cellules murines normales, la protéine MULT-1 est ubiquitinylée,

conduisant ainsi à sa dégradation lysosomale et donc à une absence d'expression à la surface cellulaire. En revanche, l'ubiquitinylation et la dégradation de MULT-1 sont réduites en réponse à un stress induit par une irradiation aux ultraviolets ou par un choc thermique, conduisant ainsi à son expression à la surface cellulaire (Nice T.J. *et al.*, 2009). Cette protéine est également constitutivement exprimée à la surface de certaines cellules tumorales comme les YAC-1. En revanche, la ou les raison(s) d'absence de dégradation de MULT-1 dans ces cellules sont inconnues (Cerwenka A., 2009). Chez l'homme, le NKG2D fixe des membres de la famille RAET-1 et les membres de la famille MIC (MICA et MICB). Les membres de la famille RAET-1, orthologues des protéines murines RAE-1, ont été initialement référencés comme les protéines ULBP (human cytomegalovirus UL16 binding protein) (Nausch N. and Cerwenka A., 2008). Cette famille comporte 6 protéines fonctionnelles (Eagle R.A. *et al.*, 2009; Radosavljevic M. *et al.*, 2002). Bien que les transcrits de ces gènes sont détectés dans les cellules de différents tissus (cœur, poumon, foie...) non touchées par une infection virale ou par un processus de tumorigénèse, l'expression de la protéine à leur surface est quant à elle absente (Cosman D. *et al.*, 2001), suggérant ainsi l'existence d'un mécanisme de régulation posttranscriptionnelle ou posttraductionnelle. MICA et MICB sont hautement polymorphiques : 61 allèles pour MICA et 30 allèles pour MICB ont été décrits (Nausch N. and Cerwenka A., 2008). Leur capacité à fixer le NKG2D diffère en fonction des allèles (Steinle A. *et al.*, 2001). Les transcrits de MICA et MICB sont également trouvés dans de multiples tissus, à l'exception du système nerveux central (Schrambach S. *et al.*, 2007). Les protéines MICA et MICB sont, quant à elles, faiblement exprimées dans les tissus normaux. En revanche, leur expression est augmentée à la surface des cellules stressées ou tumorales (Nausch N. and Cerwenka A., 2008).

c. Le Ly49

Présents chez certains rongeurs incluant les souris et les rats et absents chez l'homme, les récepteurs homodimériques Ly49 constituent la principale famille de récepteurs impliqués dans la reconnaissance du CMH I, et plus particulièrement des molécules H-2 polymorphiques (Lanier L.L., 1998). Par séquençage du cluster du gène Ly49 dans le génome des souris C57BL/6, BALB/c, 129/J et NOD, de nombreux gènes et pseudogènes ont été identifiés avec une grande variabilité entre les différentes lignées (Carlyle J.R. *et al.*, 2008) (Figure 5). Ces récepteurs étant nombreux et variables en fonction des lignées de souris, seuls les récepteurs les plus étudiés seront cités.

Tout comme les complexes CD94/NKG2, certains de ces récepteurs sont inhibiteurs et d'autres activateurs. Ainsi, les récepteurs Ly49D et Ly49H sont activateurs. Le Ly49H reconnaît la protéine m157 exprimée à la surface des cellules infectées par le cytomégalovirus murin (Arase H. *et al.*, 2002; Smith H.R. *et al.*, 2002), alors que le Ly49D détecte les molécules du CMH I allogéniques (Furukawa H.

et al., 2002). Ces deux récepteurs, dépourvus de motifs ITIM dans leur domaine cytoplasmique s'associent à la protéine adaptatrice DAP12 via des résidus transmembranaires chargés (Smith K.M. *et al.*, 1998), et à moindre mesure à DAP10. Néanmoins, la transduction du signal activateur induite par la fixation des ligands à la surface de ces récepteurs est exclusivement dépendante de DAP12 (Tassi I. *et al.*, 2009). Les récepteurs Ly49A, Ly49C, Ly49E, Ly49F, Ly49G2 et Ly49I sont quant à eux inhibiteurs et reconnaissent tous différentes molécules H-2. Ces récepteurs contiennent dans leur domaine cytoplasmique des motifs ITIM (Hanke T. *et al.*, 1999), aboutissant à la transduction d'un signal inhibiteur. Le Ly49I exprimé chez les souris 129/J fixe la protéine m157 tout comme le récepteur activateur Ly49H, rendant ainsi ces souris sensibles à l'infection au cytomégalo virus (Arase H. *et al.*, 2002).

Contrairement au génome des rongeurs, le génome humain ne contient qu'un pseudogène ressemblant au Ly49 (Ly49L). La séquence Ly49L contenant un codon stop prématuré, la protéine résultante possède un domaine lectine de type C incomplet. Ce domaine étant nécessaire pour la fixation des ligands du CMH I, cette protéine est très probablement non fonctionnelle (Westgaard I.H. *et al.*, 1998).

2. Les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines

a. Les récepteurs KIR

A l'inverse des récepteurs Ly49, les récepteurs KIR sont absents chez la souris mais présents chez l'homme où les gènes codant ces protéines sont localisés sur le chromosome 19q13.4 au niveau du cluster des récepteurs leucocytaires. En fonction du nombre de domaines extracellulaires Ig-like, ces récepteurs peuvent être divisés en deux sous-familles. Ainsi, la sous-famille KIR3D contient trois domaines Ig-like, alors que les structures KIR2D n'en contiennent que deux (Lanier L.L., 1998). Actuellement, quatorze KIR ont été identifiés avec une prédominance de KIR2D (Tableau 2). Outre le nombre de domaines Ig-like extracellulaires variables, ces récepteurs diffèrent également au niveau de la longueur de leur domaine cytoplasmique. Cette divergence caractérise les formes inhibitrices et activatrices. Ainsi, les récepteurs à domaine intracellulaire long (KIR2DL et KIR3DL) contiennent deux motifs ITIM responsables du recrutement de phosphatases (SHP1 et SHP2), relayant ainsi un signal inhibiteur (Binstadt B.A. *et al.*, 1996; Burshtyn D.N. *et al.*, 1996; Burshtyn D.N. *et al.*, 1997; Campbell K.S. *et al.*, 1996; Fry A.M. *et al.*, 1996; Olcese L. *et al.*, 1996; Valiante N.M. *et al.*, 1996). En revanche, les récepteurs à domaine intracellulaire court (KIR2DS et KIR3DS) sont dépourvus de séquences ITIM, mais possèdent un acide aminé chargé (Lysine) dans leur domaine transmembranaire (Biassoni R. *et al.*, 1996). Cet acide aminé fixe la protéine adaptatrice DAP12, relayant ainsi un signal activateur (Lanier L.L. *et al.*, 1998; Olcese L. *et al.*, 1997).

Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules de CMH I classiques HLA-C. En fonction des acides aminés présents en position 77 et 80, les ligands HLA-C de ces récepteurs sont divisés en deux groupes d'allotypes. Le groupe 1 possède les résidus Asparagine (Asn) en position 77 et Lysine (Lys) en 80, alors que le groupe 2 possède les résidus Sérine (Ser) en position 77 et Asparagine (Asn) en 80 (Biassoni R. *et al.*, 1995; Mandelboim O. *et al.*, 1996). La capacité de discrimination entre les deux groupes d'allotypes HLA-C est déterminée par l'acide aminé présent en position 44 du domaine extracellulaire Ig-like 1 (D1) (Winter C.C. and Long E.O., 1997). Ainsi, KIR2DL1 interagit avec les allotypes du groupe 1 (HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6, -Cw15 et -Cw17), alors que KIR2DL2 et KIR2DL3 interagissent avec l'HLA-C de groupe 2 (HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw12, Cw13 et -Cw14). KIR3DL1 fixe les allotypes du HLA-B comportant le motif Bw4 (Gumperz J.E. *et al.*, 1995) et KIR3DL2 reconnaît les molécules classiques HLA-A3 et -A11 (Dohring C. *et al.*, 1996; Hansasuta P. *et al.*, 2004). Le ligand du récepteur KIR2DL5 n'a pas encore été identifié (Tableau 2).

Les récepteurs activateurs KIR2DS1, KIR2DS2 et KIR3DS1 possèdent des similarités de séquences dans leur domaine extracellulaire avec leurs contreparties inhibitrices correspondantes (respectivement KIR2DL1, KIR2DL2/KIR2DL3 et KIR3DL1), suggérant des spécificités de fixation de ligands communes. Ainsi, KIR2DS1 fixe faiblement l'HLA-C de groupe 1 relayant ainsi un signal positif, alors que KIR2DS2 fixerait faiblement l'HLA-C de groupe 2 (Biassoni R. *et al.*, 1997; Chewning J.H. *et al.*, 2007; Foley B. *et al.*, 2008; Stewart C.A. *et al.*, 2005). Le domaine extracellulaire de KIR3DS1 possède plus de 95% d'homologie avec celui de KIR3DL1. Néanmoins, aucune preuve directe n'établit pour le moment une interaction entre KIR3DS1 et HLA-Bw4 (Kulkarni S. *et al.*, 2008). Les ligands des récepteurs activateurs KIR2DS3, KIR2DS4 et KIR2DS5 n'ont pas encore été identifiés (Tableau 2).

Le récepteur KIR2DL4 est un KIR particulier car il est à la fois inhibiteur et activateur (Moretta A. *et al.*, 2008). Ce récepteur KIR contient à la fois un motif ITIM dans son domaine cytoplasmique et un acide aminé chargé (Arginine) dans son domaine transmembranaire (Cantoni C. *et al.*, 1998; Faure M. and Long E.O., 2002; Kikuchi-Maki A. *et al.*, 2005; Ponte M. *et al.*, 1999; Rajagopalan S. *et al.*, 2001). Les fonctions activatrices du KIR2DL4 peuvent être compartimentées en deux modules structuraux distincts. Tout d'abord, le KIR2DL4 peut interagir avec la protéine adaptatrice transmembranaire Fc ϵ RI- γ , et ce très probablement via l'arginine, relayant ainsi un signal activateur (Kikuchi-Maki A. *et al.*, 2005). Ensuite, les fonctions effectrices peuvent être indépendantes du résidu arginine transmembranaire, faisant ainsi intervenir un autre domaine du récepteur et conduisant à l'activation des voies MAPK et NF- κ B (Miah S.M. *et al.*, 2008). Contrairement aux autres récepteurs KIR activateurs, l'activation de ce récepteur induit une forte production de cytokines (IFN- γ), mais une faible cytotoxicité (Kikuchi-Maki A. *et al.*, 2003; Rajagopalan S. *et al.*, 2001). Concernant la fonction inhibitrice, le domaine ITIM recrute la phosphatase SHP2 relayant ainsi un signal inhibiteur

(Kikuchi-Maki A. *et al.*, 2005; Yusa S. *et al.*, 2002). Actuellement, le ou les déclencheurs à l'origine de la transduction d'un signal activateur ou inhibiteur sont inconnus. Le seul ligand connu pour ce récepteur est l'HLA-G, molécule principalement exprimée sur les trophoblastes fœtaux s'implantant dans la decidua maternelle au cours de la grossesse (Loke Y.W. and King A., 1997). Chez l'homme, durant la grossesse, le KIR2DL4 est exprimé par la plupart des cellules NK placentaires/déciduelles, alors qu'il est absent sur les cellules NK périphériques (Ponte M. *et al.*, 1999). Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les cellules NK utérines ont un potentiel cytotoxique limité mais produisent des cytokines (TNF- α et l'IFN- γ) et le facteur de croissance VEGF (Trundley A. and Moffett A., 2004; van der Meer A. *et al.*, 2004). L'IFN- γ produit par les cellules NK utérines murines est impliqué dans le remodelage de la vascularisation des artères maternelles (Ashkar A.A. and Croy B.A., 1999).

En fonction du contenu génique du locus KIR, deux haplotypes ont été identifiés : les haplotypes A et B (Figure 6). Le polymorphisme des gènes KIR et la combinaison des KIR paternels et maternels assurent la diversité du répertoire KIR exprimé par chaque individu. Chaque cellule NK exprime et maintient un répertoire KIR spécifique, contribuant ainsi à la diversité du répertoire NK (Moretta A. *et al.*, 2008). Le choix des KIR exprimés par les clones de cellules NK semble être aléatoire. Le silencing des autres gènes KIR est assuré par des processus de méthylation de l'ADN au niveau des îlots CpG présents en amont de chaque gène KIR (Chan H.W. *et al.*, 2003; Santourlidis S. *et al.*, 2002).

Les gènes du CMH I sont portés par le chromosome 6, alors que les gènes KIR sont sur le chromosome 19. Ainsi, la ségrégation des gènes KIR et HLA se fait de manière indépendante soulevant le problème des mécanismes assurant la tolérance du Soi. Ceux-ci seront discutés ultérieurement.

b. Les récepteurs ILT/LIR (Immunoglobulin like transcripts/Leucocyte Ig like Receptors)

Ces récepteurs sont proches des KIR à la fois génétiquement, structurellement et fonctionnellement. Contrairement à ces derniers, ils n'ont pas une expression restreinte aux cellules NK et à certains lymphocytes T. En effet, ceux-ci sont également exprimés sur les monocytes, les lymphocytes B et les DC. D'un point de vue structural, les protéines ILT/LIR sont caractérisées par la présence de deux ou quatre domaines extracellulaires Ig-like (Figure 7). Ainsi, les LIR1, 2, 3, 4, 6a, 7 et 8 et les ILT7 et 8 possèdent quatre domaines extracellulaires Ig-like, alors que LIR5 et 6b n'en possèdent que deux (Colonna M. *et al.*, 1999). Comme les récepteurs KIR, la longueur de leur domaine cytoplasmique définit le type de signal (activateur ou inhibiteur) qu'ils relaient. Ainsi, les LIR1, 2, 3, 5 et 8 possèdent un long domaine cytoplasmique contenant deux à quatre motifs ITIM responsables du recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1, relayant ainsi un signal inhibiteur (Arm J.P. *et al.*, 1997; Cella M. *et*

al., 1997; Colonna M. *et al.*, 1997; Colonna M. *et al.*, 1998; Cosman D. *et al.*, 1997; Fanger N.A. *et al.*, 1998). Un autre groupe de récepteurs comprenant les ILT1, ILT1-like protein, ILT7, ILT8 et LIR6 possède un domaine cytoplasmique court dépourvu de motifs ITIM. En revanche, ces récepteurs possèdent un acide aminé chargé (arginine) dans leur domaine transmembranaire (Borges L. *et al.*, 1997; Samaridis J. and Colonna M., 1997). Les ILT1, LIR6 et ILT7 s'associent avec le Fc ϵ RI- γ , relayant ainsi des signaux stimulateurs (Colonna M. *et al.*, 1999; Nakajima H. *et al.*, 1999). Le résidu arginine présent dans le domaine transmembranaire de ces ILT/LIT pourrait être crucial dans cette association (Colonna M. *et al.*, 1999). Enfin, une troisième catégorie comprenant uniquement LIR4 ne possède ni domaine cytoplasmique, ni domaine transmembranaire suggérant que ce récepteur pourrait être sécrété (Arm J.P. *et al.*, 1997; Borges L. *et al.*, 1997; Colonna M. *et al.*, 1997).

Seuls LIR1/ILT2 et LIR7/ILT1 semblent exprimés par les cellules NK. LIR1 appartient au groupe des récepteurs inhibiteurs. Il possède quatre domaines extracellulaires Ig-like et 4 motifs ITIM intracellulaires. Ce récepteur interagit à la fois avec des molécules du CMH I classiques et non classiques. Ainsi, il interagit avec une large variété de molécules classiques HLA-A et -B alors qu'une faible interaction avec le HLA-C est observée (Borges L. *et al.*, 1997; Colonna M. *et al.*, 1997; Colonna M. *et al.*, 1998; Cosman D. *et al.*, 1997; Fanger N.A. *et al.*, 1998). Concernant les molécules du CMH I non classiques, ce récepteur est capable de fixer l'HLA-G et l'HLA-E. L'HLA-G étant sélectivement exprimée sur le trophoblaste, son interaction avec LIR1 pourrait inhiber les leucocytes décidaux, contribuant ainsi à la tolérance materno-fœtale (Allan D.S. *et al.*, 1999; Colonna M. *et al.*, 1999; Colonna M. *et al.*, 1997; Colonna M. *et al.*, 1998). L'interaction avec l'HLA-E permet, comme pour certains complexes CD94/NKG2, de tester l'expression générale des molécules de CMH I pour une cellule. Outre les molécules du CMH I, ce récepteur reconnaît la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalovirus humain (Cosman D. *et al.*, 1997). L'expression de la protéine UL18 à la surface des cellules infectées n'est pas clairement définie pour le moment. De ce fait, cette molécule a été principalement étudiée dans des cellules transfectées avec la protéine UL18 (Wagner C.S. *et al.*, 2008). Ainsi, UL18 inhibe les cellules NK LIR1⁺, alors que les cellules LIR1⁻ sont activées (Prod'homme V. *et al.*, 2007). Concernant le récepteur LIR7, son ligand est encore inconnu. Néanmoins, ce récepteur présente des changements structuraux dans le domaine extracellulaire D1D2 au niveau des acides aminés fixant le CMH comparativement aux ILT2 et 4. Cette différence structurelle est à l'origine de la non fixation des molécules de CMH sur ce récepteur (Chen Y. *et al.*, 2009).

3. Les NCR (Natural Cytotoxicity Receptor)

Les NCR sont des récepteurs Ig-like activateurs impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales (Cantoni C. *et al.*, 1999; Pende D. *et al.*, 1999; Pessino A. *et al.*, 1998). Trois NCR

ont été décrits : NKp30 (CD337), NKp44 (CD336) et NKp46 (CD335) (Figure 8). Le ou les ligands exprimés par les cellules tumorales ne sont pas clairement identifiés. Néanmoins, les structures héparine/héparane sulfate ont été suggérées comme étant des ligands, mais les conséquences fonctionnelles de ces interactions sont controversées (Bloushtain N. *et al.*, 2004; Hecht M.L. *et al.*, 2009; Hershkovitz O. *et al.*, 2007; Warren H.S. *et al.*, 2005). Le NKp30 a récemment été montré comme fixant une molécule nouvellement caractérisée, la molécule B7-H6 membre de la famille B7, présente à la surface de diverses lignées de cellules tumorales mais pas à la surface de cellules normales (Brandt C.S. *et al.*, 2009).

Le gène codant le NKp30 est situé sur le chromosome humain 6 dans la région du HLA III. Le récepteur NKp30 est caractérisé par un domaine extracellulaire de type V et un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé (Arginine) (Moretta A. *et al.*, 2000). Ce résidu arginine permet l'association du NKp30 avec les polypeptides CD3 ζ et Fc ϵ R γ (Moretta L. and Moretta A., 2004), relayant ainsi un signal activateur. Chez la souris, seul un pseudogène a été identifié (Hollyoake M. *et al.*, 2005). Ce récepteur est exprimé par toutes les cellules NK (Pende D. *et al.*, 1999). Le NKp30 ne reconnaît pas les hémagglutinines virales (Arnon T.I. *et al.*, 2001), mais reconnaît la protéine pp65 exprimée à la surface du cytomégalovirus humain. Cette interaction inhibe la cytotoxicité induite normalement par l'interaction du NKp30 avec son ligand, et ce par dissociation du NKp30 et du CD3 ζ (Arnon T.I. *et al.*, 2005). Le NKp30 est également impliqué dans le crosstalk DC/cellules NK qui sera l'objet d'un paragraphe ultérieur.

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

Le gène codant le NKp46 est situé sur le chromosome humain 19 au niveau du cluster leucocytaire. Le récepteur NKp46 possède deux domaines extracellulaires Ig-like, un domaine transmembranaire

contenant un acide aminé chargé (Arginine) et un domaine cytoplasmique dépourvu de motifs impliqués dans le relais d'un signal activateur (Moretta A. *et al.*, 2000; Pessino A. *et al.*, 1998). Ainsi, l'arginine permet l'association du NKp46 avec les polypeptides de signalisation CD3 ζ et Fc ϵ R γ contenant des motifs ITAM (Moretta L. and Moretta A., 2004), relayant ainsi un signal activateur. Un homologue murin, dont le gène se situe sur le chromosome 7, a été identifié (Biassoni R. *et al.*, 1999). Que se soit chez l'homme ou chez la souris, l'expression du NKp46 a été décrite comme restreinte et constitutive aux cellules NK. De ce fait, ce récepteur a été suggéré comme un marqueur spécifique des cellules NK quelque soit l'espèce (Walzer T. *et al.*, 2007). Néanmoins, sa spécificité est actuellement remise en cause. En effet, le NKp46 peut être exprimé à la surface de certains lymphocytes T tels que les lymphocytes T CD8⁺CD56⁻ activés par l'IL-15 (Correia M.P. *et al.*, 2009). De plus, les cellules NKp46⁺ présentes au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses produisent de l'IL-22, sont peu cytotoxiques et expriment faiblement le NK1.1, caractéristiques différentes des cellules NK conventionnelles (Cella M. *et al.*, 2009; Luci C. *et al.*, 2009; Sanos S.L. *et al.*, 2009; Satoh-Takayama N. *et al.*, 2009; Satoh-Takayama N. *et al.*, 2008). Outre son implication dans la lyse des cellules tumorales, le NKp46 reconnaît les hémagglutinines virales (hémagglutinine du virus influenza et hémagglutinine neuraminidase du virus de Sendai) (Mandelboim O. *et al.*, 2001).

4. Les TLR

Les différentes sous-populations de cellules NK humaines (CD56^{bright}CD3⁻ et CD56^{dim}CD3⁻) présentent le même profil d'expression pour les ARNm des TLR. Ainsi, elles expriment les ARNm des TLR1 à 10, même si l'expression est faible pour les TLR9 et 10. Néanmoins, l'expression relative de ces différents TLR semble plus élevée dans les cellules NK CD56^{bright} comparativement aux cellules NK CD56^{dim} (Chalifour A. *et al.*, 2004). Malgré l'expression de tous ces ARNm, les cellules NK ne sont pas capables de répondre directement à tous les ligands des TLR.

La protéine A présente au niveau de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA) et la flagelline d'*Escherichia coli*, ligands respectifs des TLR2 et TLR5, induisent directement la production d'IFN- γ de manière dose dépendante par les cellules NK humaines et murines. La production d'IFN- γ par les cellules NK humaines est potentialisée par l'ajout de diverses cytokines (IL-1 β , IL-12, IL-15, IFN- α) pouvant être produites, *in vivo*, par des cellules environnantes (macrophages et cellules épithéliales) présentes au niveau du site d'entrée du microorganisme, mais également par l'IL-2 (cytokine activatrice des cellules NK). En revanche, l'IL-10, cytokine produite tardivement par les macrophages et les cellules T, inhibe la production d'IFN- γ induite par KpOmpA et la flagelline. Outre cette production d'IFN- γ , ces deux ligands augmentent l'expression du marqueur d'activation CD69 et déclenchent la synthèse et la libération des α -défensines 1 à 3 (Chalifour A. *et al.*, 2004). Le

lipophosphoglycane de *Leishmania major* stimule aussi la production de cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ et TNF- α) par les cellules NK humaines via le TLR2 (Becker I. *et al.*, 2003). *Mycobacterium bovis* (BCG) semble être reconnu par le TLR2 des cellules NK humaines. Ainsi, après stimulation par le BCG, les cellules NK sont activées (augmentation de l'expression du CD25 et du CD69), sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α et tuent plus efficacement différentes cellules cibles incluant les DC immatures dérivées de monocytes. Toutes ces fonctions sont potentialisées par l'ajout d'IL-12 exogène, suggérant que des interactions cellules NK/DC sont nécessaires au priming d'une réponse adaptative de type Th1 (Marcenaro E. *et al.*, 2008).

L'acide polyinosinique:acide cytidylique (poly(I:C)), analogue des ARN double brin agonistes du TLR3, active directement les cellules NK. Ainsi, après activation avec le poly(I:C), l'expression du CD69 à la surface des cellules NK est augmentée. Cette stimulation conduit également à la lyse des cellules cibles Daudi et YAC-1 et à la production d'IL-6 et d'IL-8 (Hart O.M. *et al.*, 2005; Schmidt K.N. *et al.*, 2004). Concernant la production d'IFN- γ celle-ci est controversée, bien que cette divergence pourrait être attribuée à la concentration de poly(I:C) utilisée pour la stimulation des cellules NK. Ainsi, dans l'une des études, une stimulation de 17 heures avec 50 $\mu\text{g/ml}$ de poly(I:C) mène à la production d'IFN- γ (Schmidt K.N. *et al.*, 2004). En revanche, la stimulation des cellules NK avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de poly(I:C) pendant 18 heures, n'aboutit pas à la production d'IFN- γ (Hart O.M. *et al.*, 2005). L'activation directe des cellules NK par le poly(I:C) est également sujette à controverse. Néanmoins, l'ajout d'IL-12, cytokine dérivée de cellules accessoires, permet l'activation, la production de cytokines (TNF- α et IFN- γ) et la cytotoxicité des cellules NK après stimulation au poly(I:C) (Girart M.V. *et al.*, 2007; Sivori S. *et al.*, 2004). La production d'IFN- γ induite par la stimulation poly(I:C)/IL-12 mais aussi poly(I:C)/IL-2 est due à la production d'IFN- β par les cellules NK qui agit alors de façon autocrine (Duluc D. *et al.*, 2009). Au niveau des cellules NK humaines, les taux d'ARNm du TLR3 varient entre les individus. Les cellules NK montrant de hauts taux de transcrits du TLR3 sont caractérisées par une plus forte production de cytokines et une plus forte cytotoxicité après activation par le poly(I:C) (Sivori S. *et al.*, 2007).

Une étude a montré que la stimulation des cellules NK humaines purifiées par des ligands du TLR9 (oligo-ADN synthétiques ou dérivés du BCG) conduit à une augmentation de l'expression du CD69 et à la production d'IFN- γ . Cette dernière est à l'origine d'une augmentation de la lyse des cellules cibles K562 (Iho S. *et al.*, 1999). Néanmoins, dans toutes les études ultérieures, l'activation des cellules NK humaines et murines par les Oligodéoxynucléotides (ODN) CpG (agonistes du TLR9) n'est possible qu'en présence d'autres PBMC, et plus particulièrement les pDC, ou en présence d'IL-12 (Ballas Z.K. *et al.*, 1996; Hornung V. *et al.*, 2002; Sivori S. *et al.*, 2004). La sécrétion d'IFN- α par les pDC stimulées

par les ODN CpG est au moins en partie responsable de l'activation des cellules NK stimulées par les ODN CpG. En effet, l'ajout d'IFN- α à des cellules NK induit une augmentation similaire de l'expression membranaire du CD69 comparativement à l'ajout de surnageant de culture des pDC stimulées par les ODN CpG (Hornung V. *et al.*, 2002). Le TNF- α , aussi produit par les pDC après stimulation avec un agoniste du TLR9 contribue de façon additionnelle avec l'IFN- α à l'activation des cellules NK, augmentant ainsi leur production d'IFN- γ et l'expression du CD69 (Marshall J.D. *et al.*, 2006). Les cellules NK stimulées en présence d'IL-12 par les ODN CpG expriment également le CD69 mais aussi le CD25, produisent des cytokines (IFN- γ et TNF- α) et ont une capacité cytolytique accrue vis-à-vis de cellules tumorales (Sivori S. *et al.*, 2004). De même, les cellules NK murines stimulées par des ODN CpG en présence de PBMC montrent une activité lytique accrue vis-à-vis des cellules cibles YAC-1 (Ballas Z.K. *et al.*, 1996).

Aucune étude n'a montré d'activation directe des cellules NK par les ARN viraux simples brins, agonistes des TLR7/8. Initialement, la stimulation par les agonistes des TLR7/8 de cellules NK purifiées par billes magnétiques induisaient l'augmentation de l'expression du CD69 à la surface des cellules NK, ainsi que leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles Daudi. Toutefois, ces effets ont été très rapidement attribués à des cytokines produites par des cellules contaminantes puisque des cellules NK purifiées par billes magnétiques puis tri cellulaire ne montrent pas d'augmentation de l'expression du CD69 après stimulation par les agonistes des TLR7/8. De plus, seules les cellules NK d'un donneur sur cinq sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules cibles Daudi. La principale cytokine impliquée est l'IL-12 pouvant être produite par les monocytes contaminants. En effet, l'ajout d'un anticorps anti-IL-12 neutralisant diminue l'effet des agonistes des TLR7/8 observé sur les cellules NK purifiées par billes magnétiques (Hart O.M. *et al.*, 2005). En présence d'agonistes des TLR7/8 et d'IL-12 (ou d'IFN- α mais à moindre mesure), les cellules NK purifiées produisent également de l'IFN- γ . En revanche, en absence d'IL-12, seules d'infimes quantités d'IFN- γ sont détectées, renforçant la nécessité des cytokines dérivées de cellules accessoires (notamment l'IL-12) dans l'activation des cellules NK par les agonistes TLR7/8 (Girart M.V. *et al.*, 2007).

Chez l'homme, le TLR4 est exprimé à la surface de la quasi-totalité des cellules NK CD56^{dim}, alors qu'il est absent sur les cellules NK CD56^{bright}. Néanmoins, ces cellules ne répondent pas à la stimulation au LPS, ce qui pourrait être dû à une absence de signaux costimulateurs tels que le CD14 ou le MD2 (O'Connor G.M. *et al.*, 2006). En revanche, chez la souris, les cellules NK expriment à leur surface le complexe TLR4/MD2 et le CD14. Le TLR4 semble fonctionnel puisqu'une activation au LPS de cellules NK préalablement cultivées en présence d'IL-15 induit l'activation de NF- κ B (Sawaki J. *et al.*, 2007). De plus, dans une autre étude, la stimulation des cellules NK murines par le LPS induit leur

prolifération, l'augmentation d'expression du CD69 à leur surface et leur production d'IFN- γ (Tsujimoto H. *et al.*, 2005). Néanmoins, la pureté des cellules NK dans cette étude étant au minimum de 60%, il n'est pas exclu que les résultats obtenus soient dus à une contamination par d'autres types cellulaires.

5. Les récepteurs aux chimiokines

Que ce soit chez la souris ou chez l'homme, l'expression des récepteurs aux chimiokines diffère en fonction des sous-populations. Outre leur effet chimiotactique, certaines chimiokines peuvent modifier la cytotoxicité des cellules NK. Avant de nous focaliser sur la régulation de la migration et de la cytotoxicité des cellules NK par les chimiokines, une introduction générale sur les chimiokines et leurs récepteurs sera effectuée.

a. Introduction générale sur les chimiokines et leurs récepteurs

i. La définition des chimiokines et leur rôle dans le système immunitaire

Les chimiokines (chemokines en anglais pour CHEMOtactic cytoKINES) sont de petites cytokines (8 à 12kD) définies par quatre résidus cystéine conservés. Leur rôle est d'accumuler les cellules qui leur sont réactives vers leur source de production. Pour cela, elles interagissent avec des récepteurs couplés aux protéines G présents à la surface des cellules cibles, entraînant ainsi leur migration via un gradient de concentration chimiokinique (Fernandez E.J. and Lolis E., 2002). La quasi-totalité des chimiokines ne sont retrouvées que sous forme soluble. Toutefois, les CXCL16 et CX₃CL1 sont initialement exprimées à la membrane et les formes solubles sont respectivement obtenues après clivage par les ADAM10 et ADAM17 (Garton K.J. *et al.*, 2001; Gough P.J. *et al.*, 2004).

En condition basale, certaines chimiokines ont un rôle dans l'homéostasie du système immunitaire et sont constitutivement produites et sécrétées. Elles sont impliquées dans le trafic des lymphocytes vers les tissus lymphoïdes, la surveillance immunitaire et la localisation des lymphocytes T ou B avec l'antigène au niveau du système lymphatique. D'autres chimiokines ne sont produites que lors d'infections ou dans des situations pro-inflammatoires, permettant ainsi le recrutement des leucocytes circulants vers le site de l'inflammation. Outre leur propriété chimiotactique, elles interviennent dans la migration transendothéliale, la prolifération, la différenciation, la maturation et la dégranulation de leurs cibles (Fernandez E.J. and Lolis E., 2002).

ii. La classification des chimiokines

A ce jour, une cinquantaine de chimiokines ont été identifiées chez les mammifères. En dépit d'une faible homologie de séquences entre toutes ces chimiokines, elles présentent tout de même une

structure tridimensionnelle relativement conservée. Cette structure est maintenue par la présence de ponts disulfures formés à partir d'une ou de deux paires de résidus cystéine présents dans la région amino-terminale de la protéine (Région N-terminale). En fonction du nombre de cystéines (C) dans la région N-terminale et du nombre d'acides aminés non conservés (X) qui s'intercalent entre ces cystéines, les chimiokines sont réparties en quatre groupes : les CXC, les CC, les XC et les CX₃C chimiokines (Figure 9). La majorité des chimiokines appartiennent aux groupes des CXC et CC chimiokines. Le groupe des XC chimiokines ne contient que deux membres (XCL1 et XCL2) et celui des CX₃C un membre (CX₃CL1) (Annexe 1).

iii. Les récepteurs aux chimiokines

Une propriété remarquable des chimiokines est leur capacité de fixation à plusieurs récepteurs chimiokiniques. De même, un récepteur peut être activé par plusieurs chimiokines. Néanmoins, cette activité pléiotrope est circonscrite au sein de chaque groupe de chimiokines. Par analogie à la nomenclature des chimiokines, leurs récepteurs sont classés en CXCR, CCR, XCR et CX₃CR. D'un point de vue structural, ces récepteurs aux chimiokines sont composés d'une région N-terminale extracellulaire riche en acides aminés acides, d'une région C-terminale intracellulaire riche en sérine et thréonine formant des sites de phosphorylation et de sept domaines transmembranaires en hélice α . Ces récepteurs sont couplés à des protéines G responsables de la transduction du signal suite à la fixation du ligand (Figure 10). A l'heure actuelle, 18 récepteurs couplés aux protéines G composent le système des récepteurs aux chimiokines (Annexe 2).

b. La régulation de la migration des cellules NK par les chimiokines

Les cellules NK humaines migrent en réponse à certaines chimiokines CXC et CC. Les récepteurs aux chimiokines exprimés par les différentes sous-populations de cellules NK humaines et murines, ainsi que leur niveau d'expression sont représentés sur la figure 11.

Les cellules NK humaines non activées migrent en réponse aux chimiokines fixant le CXCR3 (CXCL10, CXCL11) (Campbell J.J. *et al.*, 2001; Inngjerdingen M. *et al.*, 2001; Taub D.D. *et al.*, 1995), le CXCR4 (CXCL12) (Campbell J.J. *et al.*, 1998; Inngjerdingen M. *et al.*, 2001; Kim C.H. *et al.*, 1999), le CX₃CR1 (CX₃CL1) (Campbell J.J. *et al.*, 2001; Inngjerdingen M. *et al.*, 2001) et le XCR1 (XCL1) (Giancarlo B. *et al.*, 1996). La migration en réponse aux ligands de CXCR1 et CXCR2 est moins claire. Par exemple, les cellules NK non activées migrent en réponse à CXCL1, chimiokine se fixant sur les CXCR1 et CXCR2 (Inngjerdingen M. *et al.*, 2001). En revanche, la chimiokine CXCL8, se fixant également à ces deux récepteurs chimiokiniques, attire les cellules NK CD16⁺ dans une étude (Campbell J.J. *et al.*, 2001)

alors que dans d'autres études elle n'a aucun effet (Inngjerdingen M. *et al.*, 2001) ou un effet dépendant du donneur (Taub D.D. *et al.*, 1995).

Les cellules NK humaines non activées migrent également en réponse à plusieurs CC chimiokines se liant aux CCR1 (CCL3, CCL5, CCL7), CCR2 (CCL2, CCL7, CCL8), CCR3 (CCL5, CCL7, CCL8) et CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) (Allavena P. *et al.*, 1994; Taub D.D. *et al.*, 1995). Une activation des cellules NK par l'IL-2 induit l'expression du CCR4 et CCR8 à leur surface. Ainsi, les cellules NK activées migrent en réponse aux chimiokines se fixant aux CCR4 (CCL17 et CCL22) et CCR8 (CCL1) (Inngjerdingen M. *et al.*, 2000; Inngjerdingen M. *et al.*, 2001).

Conformément à la différence d'expression des récepteurs aux chimiokines entre les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{low}, ces deux sous-populations migrent soit spécifiquement, soit préférentiellement, soit de façon similaire vis-à-vis des chimiokines. Ainsi, les cellules NK CD56^{bright} migrent spécifiquement en réponse aux chimiokines se fixant au CCR7 (CCL19 et CCL21) et au CCR5 (CCL4 et CCL5), alors que les cellules NK CD56^{dim} migrent spécifiquement à la chimiokine se liant au CX₃CR1 (CX₃CL1) et au chemR23 (chémérine) (Campbell J.J. *et al.*, 2001; Kim C.H. *et al.*, 1999; Parolini S. *et al.*, 2007). Certains récepteurs sont exprimés à la surface des deux sous-populations, mais à des niveaux variables. De ce fait, les cellules NK CD56^{bright} exprimant plus fortement le CXCR3 migrent plus vigoureusement en réponse aux CXCL10 et CXCL11 comparativement aux cellules NK CD56^{dim}. A l'inverse, alors que ces cellules NK CD56^{bright} expriment faiblement le CXCR1 les rendant peu voire non réactives au CXCL8, les cellules NK CD56^{dim}, quant à elles, l'expriment fortement les rendant ainsi réactives aux chimiokines se fixant au CXCR1 (CXCL8 par exemple). En revanche, ces deux-sous-populations de cellules NK expriment de façon similaire le CXCR4, menant ainsi à une migration similaire vis-à-vis du CXCL12 (Campbell J.J. *et al.*, 2001).

c. La régulation de l'activité cytotoxique des cellules NK par les chimiokines

CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 sont capables d'amplifier la lyse des cellules cibles K562 par les cellules NK. Néanmoins, l'effet de ces chimiokines dépend des donneurs. En effet, CCL2, CCL4 et CCL5 potentialisent la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules K562 chez 70% des donneurs (8 donneurs sur 12), alors que les effets potentialisateurs de CCL3 et CXCL10 sont plus constants puisqu'ils sont retrouvés chez plus de 90% des donneurs (Taub D.D. *et al.*, 1995). En revanche, aucune de ces chimiokines n'est capable d'amplifier la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995). CX₃CL1 amplifie également la lyse des cellules K562 par les cellules NK (Yoneda O. *et al.*, 2000). Néanmoins, la stimulation par l'ensemble de ces chimiokines est moindre comparée à celle obtenue avec l'IL-2 (Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995; Yoneda O. *et al.*, 2000). Une autre étude montre une augmentation

similaire de la fonction cytotoxique des cellules NK par CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et l'IL-2. Cette stimulation est également suffisante pour induire la lyse de lignées cellulaires sensibles et résistantes aux cellules NK. Néanmoins, la méthode d'obtention des cellules NK n'écarte pas la possibilité d'une contamination par d'autres types cellulaires CD56⁺ (Maghazachi A.A. *et al.*, 1996). Les modalités de l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK par l'ensemble de ces chimiokines ne sont pas clairement définies. Cependant, l'ensemble de ces chimiokines induit la dégranulation des cellules NK (Loetscher P. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995; Yoneda O. *et al.*, 2000). De plus, CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 induisent une redistribution des molécules d'adhérence ICAM-1 et ICAM-3 à la surface des cellules NK (Nieto M. *et al.*, 1998), nécessaire à la formation des conjugués cellules NK/cellules cibles.

6. Les autres récepteurs

Outre les grandes familles de récepteurs précédemment décrites, les cellules NK expriment également d'autres récepteurs tels que des récepteurs aux cytokines et des corécepteurs. Des molécules d'adhérence sont également présentes à leur surface, dont certaines sont utilisées comme marqueurs de cellules NK. Dans ce paragraphe, nous ne décrivons que les molécules que nous avons utilisées dans notre étude.

a. Les molécules d'adhérence

i. *Le CD56*

Cette protéine est une isoforme de la glycoprotéine membranaire N-CAM (Neuronal Cell Adhesion Molecule). Initialement, le CD56 a été montré exprimé par les tissus musculaires et neuraux humains et ainsi impliqué dans l'adhérence entre les cellules neurales et musculaires. Par la suite, l'expression du CD56 a été détectée sur les cellules NK et certains lymphocytes T (Lanier L.L. *et al.*, 1986; Lanier L.L. *et al.*, 1989). Le rôle de cette molécule à la surface des cellules NK est inconnu. Néanmoins, elle est soupçonnée d'intervenir dans l'adhérence avec les cellules cibles (Nitta T. *et al.*, 1989; Suzuki N. *et al.*, 1991). Ainsi, ayant une expression restreinte aux cellules NK et aux lymphocytes T, la présence du CD56 et l'absence d'expression du CD3 à la surface caractérisent les cellules NK humaines. En fonction de l'expression membranaire du CD56, deux sous-populations de cellules NK phénotypiquement et fonctionnellement distinctes ont été ensuite identifiées : les cellules NK CD56^{bright} et les cellules NK CD56^{low} (Cooper M.A. *et al.*, 2001). Ces deux sous-populations ont été décrites dans le chapitre portant sur le développement des cellules NK humaines (Chapitre 1, A-2-d et e).

ii. Le CD49b

Initialement, un anticorps DX5 marquait les cellules NK murines et certains lymphocytes T. Par la suite, il a été montré que cet anticorps reconnaissait l'intégrine CD49b présente sur les cellules NK de toutes les lignées de souris testées (Arase H. *et al.*, 2001). Ainsi, initialement, le CD49b associé à l'absence de CD3 était utilisé pour caractériser les cellules NK murines, et ce notamment dans les lignées n'exprimant pas le NK1.1 (toutes les lignées de souris excepté celles dérivées des C57BL/6 et C57BL/10). Cependant, ni le ligand du CD49b, ni son rôle fonctionnel ne sont connus. Jusqu'à l'identification du NKp46 comme marqueur le plus spécifique des cellules NK (Walzer T. *et al.*, 2007), cette combinaison CD49b/CD3 était utilisée en routine pour l'identification des cellules NK murines.

iii. Le CD27

Le CD27 est un membre de la superfamille des récepteurs au TNF, qui a pour ligand le CD70. Chez la souris, ce récepteur est exprimé à la surface des cellules NK, des cellules B et des lymphocytes T CD4 et T CD8 naïfs. L'interaction CD27/CD70 permet notamment la survie et la prolifération des lymphocytes T (Watts T.H., 2005), mais n'est pas nécessaire au maintien de l'homéostasie des cellules NK. Chez la souris, l'interaction entre le CD70 présent à la surface des cellules tumorales et le CD27 présent à la surface des cellules NK est impliquée dans l'immunité tumorale, et plus particulièrement dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative (Kelly J.M. *et al.*, 2002). En fonction du niveau d'expression du CD27 et du CD11b à la surface des cellules NK, les cellules NK sont divisées en différentes sous-populations (Chiossone L. *et al.*, 2009; Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006). Ces différentes sous-populations ont été décrites dans le chapitre portant sur le développement des cellules NK murines (Chapitre 1, A-1-c-ii).

Chez l'homme, les cellules NK du sang périphérique expriment également des taux variables du CD27, les divisant ainsi en cellules CD27^{high} et CD27^{low} (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006). Néanmoins, seuls 6% des cellules NK CD56⁺CD3⁻ du sang périphérique expriment le CD27. Ces cellules CD27⁺ sont soit CD56^{bright} soit CD56^{dim} et sont faiblement cytotoxiques. En revanche, les cellules NK CD27⁺ sont enrichies au niveau des organes lymphoïdes secondaires (~35%). De plus, l'expression du CD27 n'est retrouvée que sur les cellules NK CD94⁺CD34⁻ (Stade 4 dans le modèle de développement décrit dans le chapitre sur le développement des cellules NK humaines (chapitre 1, A-2-d)). L'absence d'expression du CD27 sur la majorité des cellules NK CD56^{dim} du sang périphérique serait due à une diminution d'expression de ce récepteur induite par le CD70 durant le stade tardif de maturation. D'un point de vue fonctionnel, cette perte d'expression du CD27 permettrait l'acquisition d'une forte activité cytotoxique (Vossen M.T. *et al.*, 2008).

iv. Le CD11b

Exprimé à la fois chez l'homme et chez la souris, le CD11b associé au CD18 est une molécule d'adhérence interagissant avec le CD54 (ICAM-1) et se dénommant Mac-1. Comme nous l'avons vu sur le chapitre portant sur le développement des cellules NK murines (chapitre 1, A-1-c), le CD11b est un marqueur de maturation des cellules NK permettant de distinguer différentes sous populations de cellules NK en combinaison avec le CD27.

v. Le CD11a

Exprimé à la fois chez l'homme et chez la souris, le CD11a s'associe également au CD18, formant ainsi l'intégrine LFA-1 qui a pour récepteur ICAM-1.

Initialement, LFA-1 a été identifié comme la principale intégrine impliquée dans les interactions cellules NK/cellules endothéliales. En absence de stimuli, LFA-1 exprimé par les cellules NK au repos interagit avec l'intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 présent à la surface des cellules endothéliales non activées. En revanche, lorsque les cellules endothéliales et les cellules NK sont activées (respectivement par l'IL-1 et l'IL-2), LFA-1 interagit avec ICAM-1 dont l'expression est augmentée à la surface des cellules endothéliales activées (Allavena P. *et al.*, 1991).

Cette intégrine joue également un rôle crucial dans la cytotoxicité naturelle des cellules NK puisqu'elle leur permet de se fixer aux cellules cibles. Ainsi, les cellules NK issues de souris déficientes en LFA-1 activées par l'IL-2 sont nettement moins cytotoxiques vis-à-vis de différentes lignées cellulaires tumorales (YAC-1, EL4, RMA-S, RMA et MC57L) comparativement aux cellules NK issues de souris non déficientes en LFA-1 activées par l'IL-2. Ce défaut de cytotoxicité est du à une altération de l'adhérence entre les cellules NK activées à l'IL-2 et leurs cellules cibles (Matsumoto G. *et al.*, 1998). Une étude récente a montré que le recrutement de la taline est nécessaire à l'adhérence des cellules NK médiée par le LFA-1 sur leurs cellules cibles exprimant ICAM-1. Cette protéine adaptatrice permettrait un changement de conformation de LFA-1, conduisant à l'interaction LFA-1/ICAM-1 (Mace E.M. *et al.*, 2009). De même, chez l'homme, les cellules NK activées par l'IL-2 lysent des cellules SC2 de *Drosophila* exprimant fortement ICAM-1. Cette cytotoxicité est dépendante de LFA-1 et non de Mac-1 puisque les anticorps anti-CD11a inhibent complètement la lyse des cellules SC2 exprimant ICAM-1, alors que les anticorps anti-CD11b n'ont aucun effet (Barber D.F. *et al.*, 2004). Outre son rôle dans l'adhérence entre les cellules NK et leurs cellules cibles, LFA-1 est impliqué dans des processus de signalisation associés à la cytotoxicité tels que la polarisation des granules (Barber D.F. *et al.*, 2004), la phosphorylation de Vav-1 (Riteau B. *et al.*, 2003) et la phosphorylation de Pyk2

(Gismondi A. *et al.*, 2000). La taline est indispensable à la réorganisation du cytosquelette d'actine nécessaire à la polarisation des granules cytotoxiques (Mace E.M. *et al.*, 2009).

b. Les récepteurs aux cytokines

i. *Le CD122, une sous-unité des récepteurs à l'IL-2 et l'IL-15*

Le CD122 (IL-2/IL-15R β) est une chaîne du récepteur hétérodimérique CD122/CD132 (CD132 = chaîne γ_c) et des récepteurs hétérotrimériques CD122/CD132/IL-2R α et CD122/CD132/IL-15R α . Le CD122/CD132 est un récepteur de moyenne affinité pour l'IL-2 et l'IL-15. Les domaines cytoplasmiques de ces deux chaînes fixent les complexes de signalisation intracellulaire, conduisant ainsi à une réponse cellulaire. La spécificité pour chacune des cytokines est conférée par une troisième chaîne IL-2R α (CD25) ou IL-15R α , formant ainsi des récepteurs de hautes affinités respectivement pour l'IL-2 et l'IL-15 (Ma A. *et al.*, 2006).

Chez la souris, les cellules NK immatures et matures générées à partir de thymocytes fœtaux (IL-4+PMA pendant 2 à 3 jours puis transfert dans un milieu contenant de l'IL-15 ou de l'IL-2) expriment le récepteur hétérodimérique de moyenne affinité CD122/CD132. Seule l'IL-15 induit l'expression de la chaîne IL-2R α à la surface des cellules NK immatures et matures, alors que l'IL-2 entraîne une diminution de l'expression de l'IL-2R α (Toomey J.A. *et al.*, 2003).

Chez l'homme, toutes les cellules NK humaines expriment le récepteur d'affinité intermédiaire CD122/CD132. Cependant, seules les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ expriment le récepteur de haute affinité pour l'IL-2. Ce récepteur hétérotrimérique leur confère une sensibilité accrue à l'IL-2, conduisant à une importante prolifération des cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ après activation à l'IL-2. Les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺, quant à elles, ne prolifèrent que faiblement en réponse à l'IL-2 (Caligiuri M.A. *et al.*, 1990; Nagler A. *et al.*, 1990).

Chez la souris, le CD122 est exprimé dès le stade le plus précoce de la lignée des cellules NK, à savoir les NKp. Ainsi, le CD122 associé à d'autres marqueurs permet l'identification des NKp : Lin⁻(CD3⁻CD19⁻Gr1⁻)CD122⁺CD49b⁻NK1.1⁻ ou Lin⁻CD122⁺CD49b⁻NKp46⁻.

ii. *Le CD127, une sous-unité du récepteur à l'IL-7*

Le récepteur à l'IL-7 est un complexe hétérodimérique formé par l'association du CD127 (chaîne IL-7R α) avec la chaîne commune γ_c (Mazzucchelli R. and Durum S.K., 2007).

Chez la souris, la plupart des cellules NK d'origine thymique expriment à leur surface le CD127, alors que les cellules NK spléniques sont quasi exclusivement CD127⁻ (~95%). Ainsi, le CD127 est considéré

comme un marqueur moléculaire des cellules NK d'origine thymique (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2006). Plus récemment, l'expression du CD127 à la surface des cellules NK spléniques a été retrouvée sur 50% des cellules NK les plus immatures (CD11b^{low}CD27^{low}) et sur 32% de cellules NK immatures (CD11b^{low}CD27^{high}), deux-sous-populations minoritaires au niveau de la rate (respectivement 2% et 10%). En revanche, l'expression de ce marqueur est quasi-absent des deux autres sous-populations de cellules NK présentes dans la rate puisqu'il est retrouvé sur 2% des cellules NK spléniques matures (CD11b^{high}CD27^{high}) et sur 1% des cellules NK spléniques les plus matures (Chiossone L. *et al.*, 2009).

Les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de ces cellules NK thymiques ont été décrites dans le chapitre portant sur le développement des cellules NK murines (Chapitre 1, A-1-e). Chez l'homme, l'expression du CD127 est restreinte aux cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2006).

iii. Le CD117

Egalement connu sous le nom de kit ou c-kit receptor, le CD117 fixe le facteur de croissance c-kit ligand (ou Stem Cell Factor).

Comme nous l'avons vu dans la partie portant sur le développement des cellules NK, c-kit ligand est nécessaire au développement des cellules NK murines et humaines.

Lors du congrès de Keystone de février 2008 portant sur la biologie des cellules NK et NKT, Laurence Zitvogel a présenté une sous-population de cellules NK exprimant le CD117 comme étant des cellules NK régulatrices. *In vitro*, les cellules NK CD117⁺ sont anergiques après stimulation à l'IL-2. De plus, ces cellules NK CD117⁺ inhibent la réponse des cellules NK CD117⁻ à l'IL-2 et abrogent la maturation des DC. Ces cellules NK CD117⁺ sont également capables de tuer les cellules NK CD117⁻. Cette activité lytique semble impliquer l'interaction entre B7H1 dont l'expression est augmentée sur les cellules NK CD117⁺ et PD1 (programmed death receptor-1, récepteur costimulateur inhibiteur). *In vivo*, dans un modèle utilisant la lignée de mélanome B16F10, les cellules NK CD117⁺ s'expandent dans les ganglions lymphatiques et sont augmentées dans les métastases pulmonaires. Un facteur pouvant être responsable de la génération de ces cellules CD117⁺ est l'IL-18. En effet, *in vivo* et *in vitro*, les cellules CD117⁻ en présence d'IL-18 deviennent CD117⁺. Néanmoins, jusqu'à maintenant, aucune étude n'a été publiée sur ces cellules NK régulatrices, suggérant d'être prudent sur l'identification des cellules NK CD117⁺ comme sous-population régulatrice.

c. Les autres marqueurs de surface

i. *Le CD16*

Egalement connu sous la nomenclature Fc γ RIII, le CD16 est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG impliqué dans l'ADCC à la fois chez la souris et chez l'homme. Chez la souris, le CD16 est associé de façon non-covalente aux dimères Fc ϵ RI- γ (sous-unité γ du récepteur de forte affinité pour l'IgE), alors que chez l'homme il est associé avec des homodimères et des hétérodimères de Fc ϵ RI- γ et CD3 ζ (une des sous-unités du TCR). Le Fc ϵ RI- γ et le CD3 ζ contiennent des motifs ITAM dans leurs domaines cytoplasmiques, relayant ainsi un signal activateur après la fixation des IgG sur le CD16 (Colucci F. *et al.*, 2002).

Chez l'homme, toutes les cellules NK n'expriment pas le CD16. En effet, les cellules NK CD56^{bright} n'expriment pas ou faiblement le CD16, alors que les cellules NK CD56^{dim} l'expriment fortement (Lanier L.L. *et al.*, 1986). Chez la souris, le CD16 est exprimé par la majorité des cellules NK (Lanier L.L., 1998).

ii. *Le CD107a*

Egalement connu sous le nom de LAMP-1, le CD107a est exprimé à la surface de la membrane des lysosomes (ou granules cytolitiques) et appartient à la famille des protéines LAMP représentant approximativement 50% des protéines de la membrane lysosomale. Cette protéine possède un court domaine cytoplasmique, une partie transmembranaire et une large portion fortement glycosylée à l'intérieur du lysosome. La forte glycosylation de la partie se trouvant à l'intérieur du lysosome serait impliquée dans la protection de la membrane des lysosomes contre l'attaque des enzymes lytiques qu'elles contiennent. Après dégranulation (libération des lysosomes), le CD107a est exprimé à la surface cellulaire. Ainsi, la partie fortement glycosylée se trouvant alors exprimée à la surface de la cellule effectrice la protégerait de l'attaque des enzymes lytiques ayant été contenues dans les granules (Fukuda M., 1991; Peters P.J. *et al.*, 1991; Winchester B.G., 2001).

Le CD107a est un marqueur sensible pour l'activité cytotoxique des cellules NK (Aktas E. *et al.*, 2009; Alter G. *et al.*, 2004). Ainsi, une coculture de PBMC avec des cellules cibles dépourvues de CMH (cellules K562) à un ratio effecteurs:cibles de 10:1 entraîne une forte expression de CD107a à la surface des cellules NK CD56⁺CD3⁻. Une stimulation des PBMC avec la combinaison PMA/ionomycine augmente davantage l'expression du CD107a. Cette induction du CD107a corrèle avec la lyse des cellules cibles et la sécrétion de cytokines (Alter G. *et al.*, 2004). Une étude plus récente utilisant un ratio effecteurs : cibles moindre mais ajoutant divers stimuli aboutit au même constat. En effet, lors d'une coculture de PBMC avec les cellules K562 à un ratio effecteur:cible de 5:1 en présence d'IL-2 ou

de PMA/ionomycine, l'expression du CD107a à la surface des cellules NK est également augmentée et est corrélée avec la cytotoxicité des cellules NK (Aktas E. *et al.*, 2009).

A la suite de la dégranulation, l'expression du CD107a à la surface des cellules NK est stable puisqu'elle est au moins maintenue pendant 48h. Des cellules NK exprimant le CD107a à leur surface, donc ayant déjà dégranulées, restent capables de lyser de nombreuses cellules cibles incluant des cellules tumorales et des cellules infectées, et ce de façon similaire aux cellules NK n'exprimant pas le CD107a à leur surface. De plus, leur viabilité et leur capacité à répondre à des stimulations cytokiniques ne sont pas modifiées comparativement aux cellules NK n'exprimant pas le CD107a à leur surface (Tomescu C. *et al.*, 2009).

iii. Le NK1.1

Egalement nommé Nkrp1c, ce récepteur appartient à la famille murine Nkrp1 présente chez différentes lignées de souris, et plus particulièrement chez les souris C57BL/6. Le Nkrp1c est un récepteur activateur dont le ligand est inconnu. D'un point de vue structural, il ne contient pas de motifs ITIM dans son domaine intracellulaire mais possède un résidu transmembranaire chargé s'associant au Fc ϵ RI- γ , permettant ainsi la transduction d'un signal activateur (Yokoyama W.M. and Plougastel B.F., 2003). Jusqu'à récemment, et notamment chez les C57BL/6, la présence du NK1.1 associée à l'absence de CD3 était la combinaison utilisée en routine pour identifier les cellules NK. Cette combinaison est remplacée dans certaines études par l'utilisation d'un anticorps anti-NKp46, le NKp46 étant considéré actuellement comme le marqueur le plus sélectif des cellules NK. Outre son rôle dans l'identification des cellules NK, le NK1.1 était utilisé pour la déplétion des cellules NK. Néanmoins, cet outil n'était pas spécifique puisque le NK1.1 est retrouvé sur d'autres populations cellulaires telles que les cellules NKT et les cellules T $\gamma\delta$.

C. L'EDUCATION DES CELLULES NK : ACTIVATION ET SELF TOLERANCE

Les modalités d'activation et de tolérance du Soi par les cellules NK ont fait l'objet de diverses études dans lesquelles des hypothèses ou des modèles ont été établis puis ensuite réfutés. Dans ce paragraphe, nous décrivons tout d'abord les diverses hypothèses et modèles qui ont été proposés puis abandonnés et ensuite les modèles actuels.

1. Les premières hypothèses et modèles expliquant la tolérance du Soi et l'activation des cellules NK

a. L'hypothèse du « missing-self »

Cette hypothèse du « missing-self » ou « Soi manquant » a été proposée par Kärre et son équipe suite à l'observation que les cellules NK lysaient préférentiellement les cellules cibles n'exprimant pas les molécules du CMH I (Karre K. *et al.*, 1986; Ljunggren H.G. and Karre K., 1990). En condition basale, comme toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment les molécules de CMH I, ces dernières seraient donc protégées contre l'auto-agression des cellules NK. L'identification ultérieure des récepteurs inhibiteurs Ly49 chez la souris et KIR chez l'homme a fourni une base moléculaire pour la réactivité vis-à-vis d'un Soi manquant et de la tolérance des cellules du Soi exprimant les molécules de CMH I.

Cependant, la théorie du « missing-self » n'explique pas à elle seule la tolérance du Soi des cellules NK. En effet, les hématies n'exprimant pas de molécules de CMH I ne sont pas lysées par les cellules NK. De plus, les cellules NK de souris déficientes en molécules du CMH sont hyporéactives (Liao N.S. *et al.*, 1991), et non hyperréactives comme prédit par cette théorie. Ensuite, certaines cellules NK murines (approximativement 10%) n'expriment aucun récepteur inhibiteur spécifique du CMH I connu, mais ne lysent pas pour autant les cellules du Soi. Enfin, durant leur développement, les cellules NK expriment des granules lytiques et de l'IFN- γ et pourraient donc posséder des fonctions effectrices alors qu'elles n'expriment pas encore les récepteurs de la famille Ly49 et les KIR (Kumar V. and McNerney M.E., 2005).

Ces différentes observations ont conduit à la mise en évidence d'un mécanisme de tolérance du Soi par les cellules NK indépendant de l'expression du CMH I. Ce dernier fait intervenir des récepteurs inhibiteurs ne fixant pas le CMH I comme CEACAM1 (ligand: CEACAM1) et certains SIGLEC (ligand: acide sialique) chez l'homme et la souris et comme le 2B4 (ligand: CD48), le NKR-P1B et le NKR-P1D (ligand: CLR-B) chez la souris. Le récepteur 2B4 est assez particulier puisqu'il est inhibiteur chez la souris, alors qu'il est activateur chez l'homme (Kumar V. and McNerney M.E., 2005; McNerney M.E. *et al.*, 2005).

Dans la suite de ce chapitre sur l'éducation des cellules NK, nous nous focaliserons uniquement sur les modèles proposés à partir de l'expression des récepteurs reconnaissant le CMH I.

b. Le modèle du « at least one »

A partir de l'étude de l'expression des récepteurs KIR et CD94/NKG2 sur des clones de cellules NK isolées de deux donneurs, Valiante et son équipe ont proposé que toutes les cellules NK possèdent au moins un récepteur inhibiteur spécifique du CMH I du Soi. L'expression d'un seul récepteur spécifique du CMH I serait alors suffisante à l'induction de la tolérance du Soi par les cellules NK, d'où la théorie du « at least one » (Valiante N.M. *et al.*, 1997). Afin d'aboutir à l'expression d'au moins un récepteur inhibiteur spécifique du CMH I du Soi, les cellules NK subiraient une sélection qui pourrait se dérouler selon deux processus. Le premier processus consiste en une sélection cellulaire assurant soit l'expansion ou la survie des cellules NK possédant au moins un récepteur inhibiteur spécifique du CMH I du Soi, soit l'élimination des cellules NK n'exprimant aucun récepteur inhibiteur spécifique du CMH I du Soi. Le deuxième processus se déroulerait au cours du développement des cellules NK et consisterait en une expression ou une « audition » de façon séquentielle de chaque récepteur codé dans le génome, jusqu'à ce qu'elles expriment un récepteur inhibiteur spécifique du CMH I du Soi (Raulet D.H. and Vance R.E., 2006).

Cependant, des travaux ultérieurs ont montré, chez l'homme et chez la souris, qu'une fraction de cellules NK n'exprime aucun des récepteurs connus pour le CMH I du Soi. Ces cellules présentent un phénotype de cellules NK normal mais sont hyporéactives vis-à-vis de stimuli variés, incluant les cellules cibles déficientes en CMH I (Anfossi N. *et al.*, 2006; Fernandez N.C. *et al.*, 2005). Néanmoins, l'expression à la surface de ces cellules d'un ou de récepteur(s) inhibiteur(s) du CMH du Soi encore non identifié ne peut être exclue (Jonsson A.H. and Yokoyama W.M., 2009).

2. Le modèle actuel de tolérance du Soi : la théorie du «licensing»

Dans ce paragraphe, nous nous focaliserons sur la dernière théorie formulée sur la tolérance des cellules NK vis-à-vis du Soi: la théorie du «licensing». Après la définition de cette théorie, nous nous intéresserons aux deux mécanismes proposés pour expliquer le licensing des cellules NK: l'hypothèse «arming» ou «stimulatory receptor» et l'hypothèse «disarming» ou «inhibitory receptor». Récemment, un nouveau modèle complétant la théorie du «licensing» mais ne la remplaçant pas a émergé. Il s'agit du modèle du rhéostat.

a. La définition du licensing

Cette hypothèse propose qu'une cellule NK doit s'engager avec le CMH I du Soi pour être réactive aux stimuli ultérieurs, un état nommé « licensed » (Kim S. *et al.*, 2005; Yokoyama W.M. and Kim S., 2006; Yokoyama W.M. and Kim S., 2006). Au contraire, les cellules NK ne s'engageant pas avec le CMH I sont définies comme « unlicensed ». Chez la souris, approximativement 10% des cellules NK

n'expriment aucun récepteur inhibiteur spécifique du CMH I connu (absence du Ly49C, du Ly49I et du NKG2 sur un fond génétique H2^b). Ces cellules répondent faiblement à une stimulation avec des cellules tumorales, mais produisent des quantités d'IFN- γ similaires aux cellules NK exprimant des récepteurs spécifiques du CMH I après stimulation avec du PMA et de la ionomycine. De plus, les marqueurs de développement à la surface de ces cellules ne présentent pas de différence avec ceux observés sur les cellules NK exprimant des récepteurs spécifiques du CMH I, suggérant que ces cellules « unlicensed » ne sont pas simplement immatures (Fernandez N.C. *et al.*, 2005). Ce licensing fait intervenir les récepteurs Ly49 spécifiques du CMH I qui ont été initialement identifiés comme des récepteurs inhibiteurs des réponses effectrices, leur fournissant également une fonction activatrice.

Plusieurs observations suggèrent que le « licensing » s'applique également aux cellules NK humaines. Approximativement 10% des cellules NK CD56^{dim} n'expriment pas le NKG2A ou les récepteurs KIR spécifiques du CMH I du Soi. Après stimulation avec des cellules tumorales (K562), ces cellules NK NKG2A⁻KIR⁻ isolées du sang périphérique présentent une expression du CD107a à la membrane et une production d'IFN- γ deux fois inférieure à celles observées pour les cellules NK NKG2A⁺KIR⁺. Les cellules NK NKG2A⁻KIR⁻ présentent également une ADCC plus faible et une réponse plus faible à la stimulation via le CD16. De plus, comme observé chez la souris, une stimulation non spécifique par des esters de phorbol et la ionomycine induit une production d'IFN- γ similaire (Anfossi N. *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que ces cellules pourraient être dans un état « unlicensed ».

b. L'hypothèse « arming » ou « stimulatory receptor »

Le licensing des cellules NK serait directement induit par l'interaction d'un récepteur NK inhibiteur présent sur les cellules NK avec le CMH I exprimé par une cellule normale (Figure 12). Le récepteur spécifique du CMH I du Soi initierait le licensing, agissant ainsi comme un récepteur stimulateur. Ce modèle implique donc qu'une cellule NK qui interagit avec des cellules exprimant le CMH I sera « armed » même si des cellules déficientes en CMH I sont également présentes. Chez la souris, le motif ITIM des récepteurs inhibiteurs Ly49 est nécessaire pour le licensing des cellules NK (Kim S. *et al.*, 2005). Cependant, l'identité des molécules de signalisation agissant en aval n'a pas été identifiée. De plus, comment un récepteur inhibiteur est capable d'induire un effet fonctionnel positif reste également un mystère (Jonsson A.H. and Yokoyama W.M., 2009).

c. L'hypothèse « disarming » ou « inhibitory receptor »

Au cours de leur développement, les cellules NK interagiraient avec les cellules de leur environnement direct via leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. Lorsque les cellules environnantes n'expriment pas de CMH I ou lorsque les récepteurs KIR portés par les cellules NK

n'ont pas de ligand, la cellule NK recevrait une somme importante de signaux activateurs non contrebalancés par des signaux inhibiteurs. Il en résulterait alors un état d'anergie caractérisé par des fonctions diminuées (Raulet D.H. and Vance R.E., 2006) (Figure 13).

d. Le modèle du rhéostat, complément de la théorie du « licensing »

La population de cellules NK se divise en un grand nombre de sous-populations exprimant des combinaisons variées de récepteurs inhibiteurs. Chaque récepteur inhibiteur fixe une ou plusieurs molécules de CMH I avec des affinités variées, engendrant ainsi une inhibition fonctionnelle plus ou moins prononcée (Hanke T. *et al.*, 1999; Joncker N.T. and Raulet D.H., 2008). Ainsi, l'utilisation de souris génétiquement modifiées exprimant une seule classe de gène du CMH I a permis de montrer que chaque allèle de CMH I possède un impact différent sur l'éducation des cellules NK, c'est-à-dire sur l'obtention de cellules NK plus ou moins réactives vis-à-vis d'une absence de Soi. De plus, l'impact qu'ont certaines molécules du CMH I sur l'éducation des cellules NK peut être modifié par la coexpression d'autres molécules du CMH I. Le modèle qui en découle propose donc que des aspects quantitatif (nombre de récepteurs différents engagés) et qualitatif (puissance de chaque interaction) contrôleraient l'impact d'une molécule donnée du CMH I sur l'éducation des cellules NK (Johansson S. *et al.*, 2005). Outre l'expression variable des récepteurs inhibiteurs, l'expression des récepteurs activateurs capables de fixer les cellules normales, tels que les récepteurs activateurs spécifiques du CMH I, varie également à la surface des cellules NK. Ainsi, lorsque les cellules NK en développement rencontreraient les cellules normales, la balance entre l'engagement des récepteurs inhibiteurs et activateurs serait extrêmement variable d'une cellule NK à une autre (Joncker N.T. and Raulet D.H., 2008).

De ce fait, les voies de signalisation de chaque cellule NK subiraient un réglage basé sur le nombre et le type de récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface de la cellule NK, ainsi que sur l'expression des ligands correspondants à la surface des cellules hôtes en condition basale. Après interaction d'une cellule NK avec une cellule normale en condition basale, la cellule NK recevrait un ensemble de signaux activateurs et inhibiteurs dont elle ferait la somme. Un réglage s'opèrerait alors et consisterait à établir un seuil d'activation de la cellule NK. Plus précisément, ce réglage placerait la somme des signaux reçus par la cellule NK en condition basale juste en-dessous du seuil d'activation, rendant ainsi la cellule NK tolérante vis-à-vis du Soi (Figure 14). Ainsi, chacune des cellules NK sera capable de répondre de façon optimale lorsqu'elle sera confrontée à des cellules du Soi ayant une expression altérée des ligands des récepteurs activateurs et/ou inhibiteurs. Bien que les cellules NK manquant de tous les récepteurs inhibiteurs soient insensibles à la perte du CMH I à la surface des

cellules cibles, elles pourraient néanmoins répondre partiellement aux cellules cibles qui augmentent leur expression de ligands activateurs (Joncker N.T. *et al.*, 2009).

Ce modèle de rhéostat conduit à des modèles « arming » et « disarming » modifiés. Il ne remplace pas les modèles « arming » et « disarming », mais les complètent aboutissant ainsi à deux modèles modifiés sans pouvoir discriminer l'un ou l'autre.

D. LE TRAFIC DES CELLULES NK

1. Le trafic des cellules NK en condition basale

Comme nous l'avons vu sur le chapitre portant sur le développement des cellules NK, les cellules NK se développent essentiellement dans la moelle osseuse. Les cellules NK matures quittent alors cet organe via la circulation sanguine et colonisent les organes lymphoïdes et les organes non lymphoïdes (Figure 15).

a. L'export de la moelle osseuse

Des études ont montré une implication des récepteurs aux chimiokines CXCR4 et CXCR3 dans l'export des cellules NK de la moelle osseuse. Néanmoins, cette implication est plutôt sujette à controverse. Le récepteur S1P₅, un des cinq récepteurs sphingosine 1 phosphate couplé aux protéines G, joue, quant à lui, un rôle crucial.

i. *Les CXCR4 et CXCR3*

Le CXCR4 semble impliqué dans la rétention des cellules NK dans la moelle osseuse. Ainsi, des souris NOD (nonobese diabetic)/SCID reconstituées avec des cellules NK CD56⁺CD3⁻ humaines traitées avec un anticorps neutralisant anti-CXCR4 présentent un recrutement diminué des cellules NK vers la moelle osseuse (Beider K. *et al.*, 2003). Chez la souris, il a été montré que l'expression du récepteur CXCR4 et la migration en réponse à CXCL12 (chimiokine hautement exprimée dans le microenvironnement de la moelle osseuse et ligand du CXCR4) varient en fonction du stade de développement des cellules NK. *In vivo*, l'injection sous-cutanée d'un antagoniste spécifique de CXCR4 (AMD-3100) induit la diminution du nombre de cellules NK totales dans la moelle osseuse et leur augmentation dans les compartiments sanguin et splénique, suggérant un rôle du couple CXCL12/CXCR4 dans la rétention des cellules NK dans la moelle osseuse (Bernardini G. *et al.*, 2008). Néanmoins, dans une autre étude, le traitement de souris avec un autre inhibiteur de CXCR4 (T-140) n'induit pas l'export des cellules NK de la moelle osseuse (Abraham M. *et al.*, 2007).

L'implication d'autres chimiokines ou récepteurs à chimiokines dans la mobilisation des cellules NK de la moelle osseuse vers les organes périphériques a été suggérée. En effet, l'administration sous-cutanée de CCL3 conduit à la diminution du nombre total de cellules NK dans la moelle osseuse et à l'augmentation transitoire de leur nombre dans le sang. L'export des cellules NK de la moelle osseuse induit par CCL3 affecte uniquement les cellules NK matures. Ceci concorde avec l'observation que peu de NKp et de cellules NK immatures expriment le CCR1, alors que la quasi-totalité des cellules NK matures isolées de la moelle osseuse exprime ce récepteur. *In vitro*, seules les cellules NK matures migrent en réponse à CCL3. De plus, CCL3 est capable de diminuer la migration des cellules NK matures en réponse à CXCL12, leur expression de CXCR4 et leur adhérence à ICAM-1 (Bernardini G. *et al.*, 2008). Enfin, chez les souris déficientes en CXCR3, une absence quasi-totale des cellules NK dans les organes périphériques (poumons, foie et sang périphérique) a été observée, suggérant que le CXCR3 est nécessaire pour l'homéostasie des cellules NK (Jiang D. *et al.*, 2004). Cependant, deux autres études n'ont reporté aucun défaut de distribution des cellules NK dans ces souris (Wald O. *et al.*, 2006; Widney D.P. *et al.*, 2005), menant ainsi à s'interroger sur le rôle de CXCR3 dans l'émigration des cellules NK de la moelle osseuse.

ii. Le récepteur S1P₅

Le S1P, ligand de S1P₅

Le S1P est un lysophospholipide sécrété et fixé aux protéines plasmatiques. Les activités coordonnées des enzymes biosynthétiques (sphingosines kinases) et biodégradantes (sphingosines lyases et phosphatases) maintiennent *in vivo* des gradients de S1P, avec de fortes concentrations de S1P dans les fluides extracellulaires et de faibles concentrations dans les tissus (Cyster J.G., 2005; Rosen H. and Goetzl E.J., 2005).

Le récepteur S1P₅ et son implication dans l'export des cellules NK de la moelle osseuse

L'expression de l'ARNm du S1P₅ augmente avec le degré de maturation des cellules NK murines. Ainsi, chez la souris, son niveau d'expression au sein des différentes sous-populations augmente comme suit : cellules NK immatures CD11b^{low}CD27^{high} < cellules NK matures CD11b^{high}CD27^{high} < cellules NK les plus matures CD11b^{high}CD27^{low}. Chez l'homme, l'expression de l'ARNm de S1P₅ est préférentiellement retrouvée dans les cellules NK CD56^{dim}, suggérant encore une fois que ces cellules se différencient à partir de cellules NK CD56^{bright} (en rapport avec la partie A-2-e du chapitre 1) (Figure 11). *In vitro*, la migration des cellules NK murines en réponse à la S1P est dépendante du S1P₅ puisque les cellules NK issues de souris déficientes en S1P₅ ne sont pas attirées par la S1P. De plus, l'intensité de migration des cellules NK de souris wild-type augmente avec leur degré de maturation,

corrélant ainsi avec le niveau d'expression de l'ARNm de S1P₅. *In vivo*, les souris déficientes en S1P₅ présentent une diminution drastique du nombre de cellules NK dans les organes périphériques (poumons et rate) et le sang périphérique. Cette diminution est corrélée à l'augmentation du nombre de cellules NK dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (Walzer T. *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats suggère donc que S1P₅ fournit un signal de sortie aux cellules NK, autorisant ainsi à la fois leur export de la moelle osseuse et leur sortie des ganglions lymphatiques (Gregoire C. *et al.*, 2007). L'expression et/ou la fonction de S1P₅ pourraient être contrôlées par les facteurs de transcription Id2 et E2a. En effet, les souris déficientes en Id2 et E2a possèdent très peu de cellules NK matures dans leur rate, alors que le nombre de cellules NK dans la moelle osseuse est normal (Boos M.D. *et al.*, 2007). Plus récemment, l'expression de S1P₅ a été montrée être dépendante du facteur de transcription T-bet puisque des souris présentant une protéine T-bet défectueuse (souris Duane) présentent une forte diminution des taux de transcrits de S1P₅. Chez ces souris, la distribution des cellules NK est similaire à celle observée chez les souris déficientes en S1P₅ (Jenne C.N. *et al.*, 2009).

b. L'atteinte des organes lymphoïdes

En condition basale, les cellules NK sont présentes dans les ganglions lymphatiques (Bajenoff M. *et al.*, 2006; Walzer T. *et al.*, 2007). Plus spécifiquement, elles sont présentes dans les régions périfolliculaires, dans le paracortex et en particulier dans la zone médullaire à l'intérieur des sinus lymphatiques. Dans la région périfolliculaire, les cellules NK sont présentes dans les sinus entourant les follicules, et plus spécialement dans la zone entre ces follicules qui est le site présumé d'arrivée des DC migrantes depuis les tissus via la lymphe afférente (Bajenoff M. *et al.*, 2006). Comme les autres lymphocytes, les cellules NK pénètrent dans les ganglions lymphatiques via les HEV et dans la rate via les sinus marginaux. Chez la souris, le CD62L est exprimé à un taux similaire sur les différentes sous-populations de cellules NK (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006) et est nécessaire pour leur entrée dans les ganglions lymphatiques (Chen S. *et al.*, 2005). Chez l'homme, les cellules NK CD56^{bright} expriment toutes la L-sélectine (CD62L) et interagissent avec la L-sélectine glycosylée présente sur les HEV (Frey M. *et al.*, 1998; Gregoire C. *et al.*, 2007). Outre l'expression du CD62L, les cellules NK CD56^{bright} expriment un CCR7 fonctionnel (Campbell J.J. *et al.*, 2001; Kim C.H. *et al.*, 1999), permettant leur recrutement sélectif au niveau des organes lymphoïdes. En effet, ce récepteur a pour ligands CCL19 et CCL21, deux chimiokines constitutivement produites au niveau des HEV (CCL21) et des zones T (CCL19 et CCL21) des ganglions lymphatiques (Gunn M.D. *et al.*, 1998; Hedrick J.A. and Zlotnik A., 1997; Luther S.A. *et al.*, 2000; Nagira M. *et al.*, 1997; Rossi D.L. *et al.*, 1997). Ainsi, en condition basale, des cellules NK CD56^{bright} sont présentes dans l'aire de cellules T parafolliculaires (Fehniger T.A. *et al.*, 2003). De plus, *in vitro*, le CCR7 est induit sur les cellules NK CD56^{dim} par l'IL-18

(Mailliard R.B. *et al.*, 2005), suggérant que ces cellules peuvent également, sous certaines conditions, être recrutées au niveau des ganglions lymphatiques. L'absence d'expression de CCR7 sur les cellules NK murines pourrait expliquer leur localisation principale dans les sinusoides entourant les aires des cellules T et B, et non dans la zone de cellules T (Gregoire C. *et al.*, 2007).

Les cellules NK sont également présentes, en condition basale, dans la rate. Elles sont principalement retrouvées au niveau de la pulpe rouge, donc exclues des aires riches en lymphocytes B et T. Quelques cellules NK sont présentes dans la zone marginale et très occasionnellement dans la pulpe blanche, où elles seraient en réalité à l'intérieur des sinus et des vaisseaux. D'autres types cellulaires sont trouvés à proximité de la « zone des cellules NK ». Ainsi, la plupart des cellules CD11b^{high} (incluant les macrophages) sont présentes dans la pulpe rouge et dans la zone marginale, alors qu'un grand nombre de cellules CD11c^{high} (incluant les DC) est trouvé non seulement dans la pulpe blanche mais également dans la zone marginale et dans la pulpe rouge. Ainsi, des interactions entre les cellules NK et les macrophages et entre les cellules NK et les DC pourraient exister *in vivo* (Gregoire C. *et al.*, 2007). De telles interactions ont été largement documentées *in vitro* et mènent à une régulation mutuelle de ces différents types cellulaires dans l'orchestration des réponses immunes (Degli-Esposti M.A. and Smyth M.J., 2005; Moretta A., 2002; Newman K.C. and Riley E.M., 2007; Walzer T. *et al.*, 2005). Comme les lymphocytes T et B, les cellules NK pénètrent dans la rate via la zone marginale et migrent ensuite vers la pulpe rouge. Cette migration vers la pulpe rouge est indépendante des récepteurs couplés aux protéines G puisque le traitement par la toxine pertussique n'affecte pas cette migration (Gregoire C. *et al.*, 2008). Donc, malgré l'expression du CXCR4 par les cellules NK (Bernardini G. *et al.*, 2008) et de CXCL12 (un des ligands de CXCR4) dans la pulpe rouge en condition homéostatique (Hargreaves D.C. *et al.*, 2001), le trafic des cellules NK n'est pas médié par ce récepteur, mais semble être dû au flux sanguin qui les entraîne vers ce site (Gregoire C. *et al.*, 2008).

c. L'atteinte des organes non lymphoïdes

La distribution des sous-populations de cellules NK dans le sang, le foie et les poumons est très similaire, avec une majorité de NK les plus matures (CD11b^{high}CD27^{low}). Suite à leur export dépendant du S1P₅ de la moelle osseuse ou des ganglions lymphatiques vers la périphérie, les cellules NK atteignent les organes lymphoïdes mais les mécanismes ne sont pas encore définis.

2. Le trafic des cellules NK en des conditions inflammatoires

Comme pour tous leucocytes circulants, les cellules NK pénètrent les tissus inflammés par migration transendothéliale. Tout d'abord, les cellules NK s'attachent et roulent sur l'endothélium via des

interactions entre les cellules NK et les cellules endothéliales par des sélectines. Les cellules endothéliales activées augmentent leur expression d'intégrines, permettant ainsi une adhérence ferme des cellules NK sur l'endothélium. Les cellules NK pénètrent alors entre les cellules endothéliales rétractées où leur progression est permise par des interactions entre des molécules exprimées par les cellules endothéliales au niveau de leur jonction et leur ligand exprimé par les cellules NK. Une fois la barrière épithéliale traversée, les cellules NK migrent vers la zone inflammée via un gradient de chimiokines.

a. Les sélectines

Chez la souris, la L-sélectine et la P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) sont exprimées de façon similaire sur les différentes sous-populations de cellules NK (Gregoire C. *et al.*, 2007). Comme pour la migration des cellules NK en condition basale, la L-sélectine est nécessaire pour le homing et le recrutement des cellules NK murines dans les ganglions lymphatiques (Chen S. *et al.*, 2005). Chez l'homme, les cellules NK CD56^{bright} expriment toutes la L-sélectine contrairement aux cellules NK CD56^{dim} (Frey M. *et al.*, 1998). La PSGL-1 est exprimée sur les cellules NK humaines au repos. Néanmoins, seule une petite proportion de ces cellules (15%) fixe la P-sélectine. En revanche, une forte proportion de cellules NK activées (65%) fixe la P-sélectine (Yago T. *et al.*, 1998), interaction impliquée dans le roulement précoce des leucocytes sur la surface des cellules endothéliales. La différenciation des cellules NK humaines CD56^{dim} est accompagnée par l'expression à la surface de l'épitope PEN5 (Vivier E. *et al.*, 1993). PEN5 est un carbohydrate décorant la PSGL-1, créant ainsi un site de fixation unique pour la L-sélectine (Andre P. *et al.*, 2000). Ainsi, l'épitope PEN5 permettrait aux cellules NK CD56^{dim} d'interagir avec d'autres leucocytes L-sélectine⁺ (neutrophiles, monocytes et lymphocytes T/B) attachés à l'endothélium inflammé, amplifiant alors la réponse immune.

b. Les intégrines

Des intégrines permettent l'arrêt du roulement des cellules NK sur l'endothélium en conduisant à une adhérence ferme. Les cellules NK adhèrent principalement aux cellules endothéliales via l'interaction entre le LFA-1 et ses ligands ICAM-1 et ICAM-2 exprimés à la surface des cellules endothéliales, mais également via l'interaction entre le Very Late Antigen (VLA)-4 (cellules NK) et la Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM)-1 (cellules endothéliales activées). Les cellules NK interagissent fermement avec les cellules endothéliales via les intégrines (Allavena P. *et al.*, 1991; Bianchi G. *et al.*, 1993).

c. La Platelet Endothelial Cell Adhesion Molécule-1 (PECAM-1)

PECAM-1 est exprimée par les cellules endothéliales au niveau de leurs jonctions et par les cellules NK (Berman M.E. *et al.*, 1996). Ainsi, après l'adhérence ferme des cellules NK avec l'endothélium, les cellules NK progresseraient entre les cellules endothéliales rétractées via les interactions homotypiques utilisant PECAM-1.

d. La chimiotaxie

Au niveau du site inflammé, les cellules déjà présentes et activées produisent diverses molécules inflammatoires dont les chimiokines. Ces dernières jouent un rôle essentiel dans le recrutement de différents types cellulaires au niveau de la zone inflammée.

Une fois la couche endothéliale traversée, les cellules NK sont recrutées vers le site inflammé par les gradients de chimiokines présents. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe portant sur les récepteurs aux chimiokines (Chapitre1, B-5), les sous-populations de cellules NK humaines CD56^{dim} et CD56^{bright} sont attirées spécifiquement ou non par de nombreuses chimiokines (figure 11). Chez la souris, quatre récepteurs de chimiokines jouent un rôle clé dans le recrutement des cellules NK à la suite d'un stimulus inflammatoire : CCR2, CCR5, CXCR3 et CX₃CR1. Ces récepteurs permettent aux cellules NK de répondre à un large spectre de chimiokines inflammatoires telles que CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL9, CCL11, CCL13, CXCL9-11 et CX₃CL1 (Gregoire C. *et al.*, 2007).

Outre les chimiokines, les cellules NK migrent également en réponse à d'autres composés chimiotactiques qui sont soit induits, soit augmentés lors de l'inflammation. Ceux-ci incluent l'acide lysophosphatidique, le f-MLP (N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine), les leucotriènes et l'anaphylatoxine C5a (Bottazzi B. *et al.*, 1985; Jin Y. *et al.*, 2003; Pilaro A.M. *et al.*, 1990; Pohajdak B. *et al.*, 1986). *In vivo*, le rôle de ces médiateurs inflammatoires et de leurs récepteurs dans le recrutement des cellules NK est inconnu (Gregoire C. *et al.*, 2007).

e. Un exemple de recrutement des cellules NK : le recrutement des cellules NK dans les ganglions lymphatiques inflammés

En réponse à différents stimuli (injection dans la patte de la souris de *Leishmania major*, des ligands des TLR7/8 ou de DC activées avec le LPS), un recrutement massif de cellules NK est observé dans les ganglions drainants (Bajenoff M. *et al.*, 2006; Martin-Fontecha A. *et al.*, 2004). Ce recrutement est dépendant du CXCR3 (Martin-Fontecha A. *et al.*, 2004). Les ligands de CXCR3, tel que CXCL9, sont exprimés à la surface des HEV inflammés (Guarda G. *et al.*, 2007). En conditions inflammatoires, la plupart des cellules NK sont préférentiellement recrutées dans la zone des cellules T des ganglions

lymphatiques, proche des HEV, en étroit contact avec les DC (Bajenoff M. *et al.*, 2006). Ce recrutement de cellules NK est nécessaire pour la polarisation Th1 des lymphocytes T naïfs activés dans des ganglions lymphatiques (Martin-Fontecha A. *et al.*, 2004). En réponse à une injection sous-cutanée de cellules tumorales, le CD62L a été montré également nécessaire pour le recrutement des cellules NK au niveau des ganglions lymphatiques inflammés (Chen S. *et al.*, 2005). Plus récemment, une étude a montré que l'injection dans la patte de DC activées avec le LPS entraîne un recrutement prédominant au niveau des ganglions drainants de cellules NK matures CD27^{high}CD11b^{high}. Celui-ci est dépendant de l'IFN- γ puisque l'injection de DC activées avec le LPS chez des souris déficientes en IFN- γ diminue le recrutement des cellules NK dans les ganglions drainants (Watt S.V. *et al.*, 2008).

E. LES FONCTIONS EFFECTRICES DES CELLULES NK

Les cellules NK sont essentiellement connues pour leur fonction cytotoxique dont les principaux mécanismes de cytotoxicité seront décrits dans ce paragraphe. Outre cette fonction, elles sont capables de réguler la réponse immune par le biais de leur production de cytokines/chimiokines et de leur interaction avec les DC, les lymphocytes T effecteurs et les lymphocytes T régulateurs.

1. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules NK

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe portant sur l'éducation des cellules NK (Chapitre 1, C-2), chaque cellule NK est éduquée de telle sorte qu'elle ne soit pas réactive vis-à-vis des cellules normales du Soi. Ainsi, une diminution de l'expression du CMH I à la surface des cellules de l'organisme et/ou l'induction de l'expression de ligands reconnus par des récepteurs activateurs (par exemple les ligands des NCR et du NKG2D) conduisent à l'activation des cellules NK et à leur dégranulation, phénomène appelé cytotoxicité naturelle. Dans ce cas, les cibles cellulaires des cellules NK sont des cellules tumorales ou des cellules infectées. Des cellules opsonisées notamment par les IgG peuvent être reconnues par les cellules NK via le CD16, induisant ainsi leur dégranulation et la lyse de la cellule cible par ADCC. Outre la voie dépendante de l'exocytose des granules, une voie faisant intervenir les interactions entre les récepteurs de mort de la famille du TNF et leurs ligands conduit à l'apoptose de la cellule cible. Par cette fonction cytotoxique, les cellules NK jouent un rôle primordial dans l'immunosurveillance des tumeurs, le contrôle de certaines infections microbiennes mais également dans le rejet de greffe.

a. L'exocytose des granules lytiques : la cytotoxicité naturelle et l'ADCC

Hormis une reconnaissance de la cellule cible différente, ces deux mécanismes conduisent à la mort de la cellule cible par l'action des différents granzymes et de la granulysine libérés par la cellule cytotoxique et internalisés par la cellule cible.

i. L'internalisation des molécules cytolytiques à l'intérieur de la cellule cible

L'interaction entre les cellules NK et leurs cellules cibles est accompagnée d'une polarisation du cytosquelette d'actine, de l'appareil de Golgi et des microtubules des cellules NK au niveau de la zone de contact avec les cellules cibles (Carpen O. *et al.*, 1983; Carpen O. *et al.*, 1982; Kupfer A. *et al.*, 1983). Celle-ci est suivie de la libération de granules cytotoxiques qui contiennent majoritairement de la perforine et des granzymes mais également de la granulysine. Différentes modalités d'entrée des granules cytotoxiques ont été proposées. Une fois ancrée à la membrane de la cellule cible, la perforine se polymérise en présence de calcium conduisant à la formation de pores cylindriques. Ces derniers permettent une entrée passive des granzymes et de la granulysine à l'intérieur de la cellule cible et pourraient aussi être responsables d'un échange ionique causant un déséquilibre osmotique et donc la mort cellulaire (Topham N.J. and Hewitt E.W., 2009). Un autre mécanisme impliquant les pores formés par la perforine a été suggéré. Ainsi, les pores formés permettent l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule cible conduisant à l'activation de cette dernière. Les dommages membranaires, et plus particulièrement les pores de perforine, sont alors réparés afin d'éviter la nécrose. Les granzymes ayant adhéré par électrostaticité à la surface de la cellule cible sont internalisés avec la perforine et libérés dans le cytoplasme (Keefe D. *et al.*, 2005). Outre la perforine, le récepteur au mannose-6-phosphate est capable de former un complexe avec le granzyme B libéré par les lymphocytes T cytotoxiques, menant ainsi à l'internalisation du complexe et à la libération du granzyme B à l'intérieur de la cellule cible (Motyka B. *et al.*, 2000).

ii. L'induction de la mort cellulaire par les granules lytiques

- Les granzymes

Les cellules NK humaines et murines expriment les granzymes A, B, K et M. Chez l'homme, elles expriment également le granzyme H (Pardo J. *et al.*, 2009). Parmi ces différents granzymes, les granzymes A et B ont été les plus étudiés. L'utilisation d'inhibiteurs de ces deux granzymes a montré que le granzyme B est l'effecteur majeur de la lyse des cellules cibles par les cellules NK (Mahrus S. and Craik C.S., 2005).

Le granzyme A

Le granzyme A est une tryptase qui induit la mort cellulaire indépendamment de la voie des caspases, et ce de façon morphologiquement indiscernable de l'apoptose (Beresford P.J. *et al.*, 1999; Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). Les cellules traitées avec de la granzyme A et de la perforine meurent rapidement. Elles présentent dans les minutes qui suivent le traitement une perte de l'intégrité de la membrane plasmique (capture de l'iodure de propidium) et une dysfonction de la

mitochondrie (augmentation des taux d'espèces réactives à l'oxygène (ROS), perte du potentiel transmembranaire et perturbation de la membrane mitochondriale) (Martinvalet D. *et al.*, 2005). Au bout d'une à deux heures, la phosphatidyl-sérine est externalisée et des dommages de l'ADN sont observés. L'ADN est coupé en fragments simple brin dont la taille est de l'ordre des mégabases (fragments plus longs que ceux générés lors de la mort cellulaire induite par les caspases ou le granzyme B) (Beresford P.J. *et al.*, 2001; Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). Le granzyme A induit donc une mort lente et non-apoptotique. En effet, les caspases ne sont pas activées et la mort cellulaire a lieu même en présence d'inhibiteurs de caspases ou dans les cellules surexprimant des membres de la famille Bcl-2 ou d'autres inhibiteurs de l'apoptose médiée par les caspases (Beresford P.J. *et al.*, 1999). De plus, la membrane externe de la mitochondrie n'est pas perméabilisée et les médiateurs pro-apoptotiques présents dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie tels que le cytochrome c, l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et l'endonucléase G ne sont pas libérés (Martinvalet D. *et al.*, 2005).

D'un point de vue mécanistique, les dommages mitochondriaux jouent un rôle clé dans l'induction de la mort cellulaire (Martinvalet D. *et al.*, 2005). Après sa libération dans le cytoplasme de la cellule cible, le granzyme A est transporté dans la matrice mitochondriale par un mécanisme pouvant dépendre de sa fixation à une protéine chaperone mitochondriale (protéine de chocs thermiques) (Beresford P.J. *et al.*, 1998; Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). Il clive alors une protéine mitochondriale appartenant au complexe I de la chaîne de transport d'électrons, la NDUFS3, interférant ainsi avec la fonction rédox de la mitochondrie, la génération d'ATP et le maintien du potentiel transmembranaire de la mitochondrie et générant des ROS (anions superoxydes) (Martinvalet D. *et al.*, 2008; Martinvalet D. *et al.*, 2005). Les ROS ainsi générées activent le complexe SET (complexe associé au réticulum endoplasmique) qui se transloque dans le nucleus jouant alors un rôle primordial dans les dommages nucléaires induit par le granzyme A (Beresford P.J. *et al.*, 2001; Martinvalet D. *et al.*, 2005). Ce complexe contient trois nucléases (ape1, NM23-H1 et Trex1), les protéines SET et pp32 modifiant la chromatine et la protéine HMGB2 fixant l'ADN (Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). L'une des fonctions du complexe SET est la réparation des sites abasiques de l'ADN générés par un dommage oxydatif. Le granzyme A présent dans le nucleus convertit le complexe de réparation de l'ADN en une arme de destruction de l'ADN par le clivage de SET, inhibiteur de l'endonucléase NM23-H1. NM23-H1 coupe alors l'ADN et l'exonucléase Trex1 étend ensuite la cassure (Chowdhury D. *et al.*, 2006; Fan Z. *et al.*, 2003). Simultanément, le granzyme A clive et inactive HMGB2 et Ape1, deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Fan Z. *et al.*, 2002; Fan Z. *et al.*, 2003). Le granzyme A interfère dans la reconnaissance de l'ADN endommagé en clivant et inactivant Ku70 et PARP1 (Zhu P. *et al.*, 2009; Zhu P. *et al.*, 2006). Il clive également

l'histone I rendant ainsi l'ADN plus accessible aux nucléases et perturbe l'enveloppe nucléaire par le clivage des lamines (Zhang D. *et al.*, 2001; Zhang D. *et al.*, 2001). Tous les substrats du granzyme A mentionnés dans ce paragraphe sont clivés à la fois *in vitro* et *in vivo* (Chowdhury D. and Lieberman J., 2008).

Le granzyme B

Le granzyme B est une sérine protéase clivant après des résidus aspartiques et possédant les caspases comme substrats (Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). Il induit l'apoptose de la cellule cible en activant les caspases, et plus particulièrement la caspase 3 mais aussi la caspase 7 (Adrain C. *et al.*, 2005; Darmon A.J. *et al.*, 1995; Metkar S.S. *et al.*, 2003). Le granzyme B humain, mais pas le granzyme B murin, active également la mort cellulaire en clivant directement les substrats clé de caspases, Bid et ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase). Ceci conduit à des dommages de la mitochondrie et de l'ADN (Alimonti J.B. *et al.*, 2001; Barry M. *et al.*, 2000; Casciola-Rosen L. *et al.*, 2007; Cullen S.P. *et al.*, 2007; Heibein J.A. *et al.*, 2000; Pinkoski M.J. *et al.*, 2001; Sutton V.R. *et al.*, 2000; Thomas D.A. *et al.*, 2000; Waterhouse N.J. *et al.*, 2005). De ce fait, les inhibiteurs de caspases ont peu d'effet sur la mort cellulaire induite par le granzyme B humain et la fragmentation de l'ADN, alors que les mêmes inhibiteurs bloquent significativement l'action du granzyme B murin. Ainsi, les cellules NK humaines pourraient être plus efficaces que leur contrepartie murine dans l'éradication des cellules tumorales ou infectées qui développent des méthodes d'évasion aux caspases. Les granzymes B humains et murins clivent plusieurs substrats des caspases incluant PARP-1, la lamine B, NuMa, DNA-PKcs et la tubuline (Chowdhury D. and Lieberman J., 2008).

Le granzyme B conduit aussi à la génération de ROS, la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie avec la libération du cytochrome c et d'autres molécules pro-apoptotiques présentes dans l'espace mitochondrial intermembranaire. Le granzyme B humain active cette voie en clivant directement Bid formant ainsi une molécule Bid tronquée (tBid) active, alors que le granzyme B murin l'induit indirectement (Chowdhury D. and Lieberman J., 2008). tBid induit le recrutement de Bax au niveau de la membrane externe de la mitochondrie conduisant à la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Heibein J.A. *et al.*, 2000). La présence de cytochrome c dans le cytosol initie l'assemblage d'un complexe entre Apaf-1 et la caspase 9, conduisant à l'activation de la caspase 9 et à l'activation ultérieure des caspases 2, 3, 6, 7, 8 et 10 menant à la mort de la cellule cible (Li P. *et al.*, 1997; Slee E.A. *et al.*, 1999). Le granzyme B est également capable de cliver ICAD qui en condition basale forme dans le cytoplasme un hétérodimère avec CAD. Le clivage d'ICAD permet l'assemblage de CAD sous une forme active. CAD alors activée initie la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN.

Le granzyme B induit aussi indirectement le clivage d'ICAD par l'activation des caspases 3 et 7 (Enari M. *et al.*, 1998; Liu X. *et al.*, 1998; Liu X. *et al.*, 1997; Liu X. *et al.*, 1999; Sakahira H. *et al.*, 1998; Thomas D.A. *et al.*, 2000).

Le granzyme H

Des résultats contradictoires ont été obtenus concernant la capacité du granzyme H (chymotrypsine) à induire l'apoptose. Après pénétration du granzyme H dans le cytoplasme de la cellule cible, cette dernière présente les caractéristiques de l'apoptose : la dépolarisation de la mitochondrie, la génération de ROS, la dégradation de l'ADN et la condensation de la chromatine. Dans cette étude, le granzyme H non glycosylé produit dans *E.Coli* induit une mort cellulaire lente qui n'implique pas la voie des caspases, le clivage de Bid et d'ICAD et la libération de cytochrome c (Fellows E. *et al.*, 2007). En revanche, le granzyme H glycosylé produit chez la levure induit l'apoptose via l'activation des caspases, le clivage d'ICAD et de Bid et la libération de cytochrome c (Hou Q. *et al.*, 2008). Le granzyme H clive également deux protéines d'adénovirus : la DBP (également substrat du granzyme B) et l'adénovirus 100K assembly protein (décrite comme un inhibiteur du granzyme B). Le clivage du DBP interfère avec la réplication de l'ADN viral, alors que le clivage de la 100K restaure la fonction du granzyme B dans les cellules infectées par un adénovirus. Ainsi, le granzyme H pourrait jouer un rôle particulier dans la défense immunitaire adénovirale où les cellules NK élimineraient l'adénovirus lors de la phase précoce de l'infection (Andrade F. *et al.*, 2001; Andrade F. *et al.*, 2007; Chowdhury D. and Lieberman J., 2008).

Le granzyme K

Comme le granzyme A, le granzyme K (tryptase) issu de rat induit la mort cellulaire indépendamment des caspases (génération de ROS et perte du potentiel intermembranaire mitochondrial mais absence de perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et de libération de cytochrome c). La mort cellulaire induite par le granzyme K de rat est inhibée par la surexpression de Bcl2, ce qui est surprenant puisque Bcl2 est une molécule anti-apoptotique inhibant la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie menant à la libération de cytochrome c, deux phénomènes non observés dans cette étude (MacDonald G. *et al.*, 1999). La surexpression de bcl_{-XL} ou l'inhibition des caspases n'affectent pas la mort cellulaire induite par le granzyme K humain. De plus, ce dernier n'active pas la caspase 3. Le granzyme K humain mime les dommages de l'ADN induit par le granzyme A. Il cause une fragmentation nucléaire indépendante des caspases, une condensation nucléaire et des cassures d'ADN simple brin par ciblage du complexe SET. Comme le granzyme A, il conduit à la translocation nucléaire du complexe SET, hydrolyse et inactive les molécules SET, Ape1 et HMGB2 présents dans le complexe (Zhao T. *et al.*, 2007). Vraisemblablement,

le clivage de SET (inhibiteur du NM23-H1) déclenche les dommages de l'ADN par les DNases activées par le granzyme A, NM23-H1 et Trex1, présents dans le complexe SET (Chowdhury D. *et al.*, 2006; Fan Z. *et al.*, 2003). Outre la génération de ROS et la perte du potentiel intermembranaire mitochondrial, le granzyme K a été montré capable de cliver Bid, rendant ainsi cette protéine active. Bid tronqué conduit alors à la libération des molécules pro-apoptotiques cytochrome c et endonucléase G présentes dans la mitochondrie (Zhao T. *et al.*, 2007), contrastant avec les résultats obtenus par MacDonald et ses collaborateurs utilisant le granzyme K de rat (MacDonald G. *et al.*, 1999).

Le granzyme M

La voie de mort cellulaire induite par le granzyme M est controversée dans la littérature. D'une part, le granzyme M humain recombinant issu de cellules d'insectes a été montré comme induire une mort cellulaire rapide indépendante des caspases qui ressemblait à une mort autophagique. En effet, la fragmentation d'ADN, la dépolarisation de la mitochondrie, l'externalisation de la phosphatidylsérine ou l'activation des caspases n'ont pas été observées (Kelly J.M. *et al.*, 2004). D'autre part, le granzyme M humain recombinant issu de levures conduit à une mort cellulaire dépendante des caspases. Cette mort cellulaire est caractérisée par l'externalisation de la phosphatidylsérine, l'activation des caspases, le clivage d'ICAD, l'activation de CAD menant à des ADN oligonucléosomiques en échelle, le clivage de PARP et une perturbation de la mitochondrie (génération de ROS, perte du potentiel intermembranaire mitochondrial, perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie et libération de cytochrome c) (Hua G. *et al.*, 2007; Lu H. *et al.*, 2006).

- La granulysine

La granulysine est un membre de la famille ressemblant à la saposine présente dans les granules lytiques. Elle est retrouvée sous deux formes majeures : une forme de 15kDa et une forme de 9kDa. La forme de 9kDa est issue du clivage du précurseur de 15kDa et est la seule forme présentant une activité cytolytique (Hanson D.A. *et al.*, 1999). La granulysine possède des activités antibiotiques contre les bactéries gram-positives et gram-négatives, les champignons et les parasites (da Silva A.P. *et al.*, 2008; Ma L.L. *et al.*, 2004; Ochoa M.T. *et al.*, 2001) et cytolytiques vis-à-vis de cellules tumorales (Pena S.V. *et al.*, 1997). Ainsi, la mort des cellules Jurkat induite par la granulysine est associée à une augmentation du calcium et une diminution du potassium intracellulaires. L'augmentation du taux de calcium intracellulaire induit des dommages de la mitochondrie conduisant à la libération de cytochrome c et d'AIF (Gamen S. *et al.*, 1998; Kaspar A.A. *et al.*, 2001; Okada S. *et al.*, 2003; Pardo J. *et al.*, 2001). Récemment, la granulysine a été montrée cibler les lysosomes des cellules cibles tumorales conduisant à une libération partielle de leur contenu. La

cathepsine B alors libérée clive Bid en tBid, menant ainsi à la libération du cytochrome c et de l'AIF de la mitochondrie. Le processus de mort cellulaire impliqué n'est pas l'apoptose mais la nécroptose. Contrairement à l'apoptose, la chromatine n'est pas condensée de façon évidente mais est condensée de manière incomplète et grumeleuse. De plus, la granulysine induit des coupures d'ADN simple brin, ce qui n'est pas une caractéristique de l'apoptose. Néanmoins, un faible clivage de la procaspase 3 en caspase 3 est observée (Zhang H. *et al.*, 2009). Alors que de fortes concentrations de granulysine sont nécessaires pour sa fonction cytotoxique (10-100 μ M) (Kaspar A.A. *et al.*, 2001; Pena S.V. *et al.*, 1997; Zhang H. *et al.*, 2009), de plus faibles concentrations de granulysine (pic à 10 nM) attirent les monocytes, les cellules T mémoires (CD4⁺ et CD8⁺), les cellules NK et les mDC (stimulation avec du TNF- α) (Deng A. *et al.*, 2005). Outre son effet chimioattractant, elle induit une augmentation des taux d'ARNm de cytokines (IL-1, IL-6, IL-10 et IFN- α) et de chimiokines (CCL2, CCL3, CCL5 et CCL7) dans les cellules monocytaires U937. Une production de CCL2 et CCL5 est observée après stimulation de monocytes et de cellules U739 avec la granulysine (1nM à 10 μ M) (Deng A. *et al.*, 2005).

b. Les voies indépendantes de l'exocytose des granules lytiques : les voies des récepteurs de mort

i. *La voie Fas/Fas-L*

L'ARNm de Fas-L est exprimé constitutivement par les cellules NK humaines et murines fraîchement isolées (Arase H. *et al.*, 1995; Montel A.H. *et al.*, 1995). Chez la souris, la protéine Fas-L est exprimée de façon constitutive à la surface des cellules NK. Cette protéine est fonctionnelle puisque les cellules NK sont cytotoxiques vis-à-vis de différentes cellules cibles exprimant Fas (Arase H. *et al.*, 1995). Chez l'homme, les cellules NK non stimulées sont incapables d'être cytotoxiques vis-à-vis de cellules cibles exprimant Fas (BL41-B95). En revanche, les cellules NK stimulées par la combinaison PMA/Ionomycine présentent une augmentation de l'expression de l'ARNm de Fas-L et sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules cibles BL41-B95. La voie Fas/Fas-L intervient en partie dans la lyse des cellules cibles puisque l'ajout de la protéine de fusion Fas-Fc (mut) (protéine possédant une mutation de 3 acides aminés dans le Fc conduisant à une diminution de son affinité pour les récepteurs aux Fc) ou d'un anticorps bloquant anti-Fas inhibe partiellement la lyse des cellules cibles (Montel A.H. *et al.*, 1995). Outre la combinaison PMA/Ionomycine, la stimulation d'une lignée cellulaire de cellules NK (NKL) par la combinaison d'anticorps activateurs anti-LFA1 et anti-2B4 conduit à l'augmentation de l'expression de Fas-L (Chua H.L. *et al.*, 2004). L'expression de Fas est, quant à elle, détectée à la surface de nombreuses cellules incluant les thymocytes CD4⁺CD8⁺, les lymphocytes activés et plusieurs lignées de cellules tumorales (Arase H. *et al.*, 1994; Timmer T. *et al.*, 2002). L'expression de Fas est aussi augmentée lors de certaines infections virales telles les infections

au MHV-3 (Murine Hepatitis Virus strain 3) et aux réovirus de l'encéphalite (T3D et T3A) (Clarke P. *et al.*, 2009; Zou Y. *et al.*, 2010).

Au niveau de la transduction du signal, la fixation de Fas à Fas-L conduit à la trimérisation de Fas-L et au recrutement des protéines FADD (Fas-Associated Death Domain) qui se trimérisent. FADD trimérisé recrute alors la pro-caspase 8 qui subit une autoprotéolyse la rendant ainsi active. L'assemblage de ces composants résulte en la formation du DISC (death-inducing signaling complex), complexe jouant un rôle primordial dans l'apoptose dépendante des récepteurs. La caspase 8 interagit avec les caspases effectrices 3, 6 et 7 qui sont alors activées via une transprotéolyse conduisant au clivage de l'ADN (Chavez-Galan L. *et al.*, 2009). La caspase 8 est également capable de cliver la protéine Bid en tBid conduisant ainsi à l'apoptose de la cellule cible via une voie dépendante de la mitochondrie (Li H. *et al.*, 1998; Luo X. *et al.*, 1998). En fonction de la cinétique d'activation des caspases 3 et 8 et du niveau de contribution de la mitochondrie dans l'apoptose induite par la voie Fas/Fas-L, deux modes d'induction d'apoptose ont été mis en évidence divisant ainsi les cellules cibles en cellules de type I et cellules de type II. Dans les cellules de type I (cellules B lymphoblastiques SKW6.4 et les cellules T de lymphome H9 par exemple), de grandes quantités de caspase 8 sont activées très rapidement (dans les dix minutes) au niveau du DISC après la fixation de Fas à Fas-L conduisant à l'activation de la caspase 3 dans l'heure qui suit l'interaction. La caspase 8 activée mène également à la libération de cytochrome c par la mitochondrie (Scaffidi C. *et al.*, 1998). Dans ces cellules de type I, Fas est internalisé via une voie dépendante de l'actine et de la chlatrine permettant ainsi le recrutement de grandes quantités de FADD et de caspase 8, composants du DISC (Algeciras-Schimnich A. and Peter M.E., 2003; Lee K.H. *et al.*, 2006). Dans les cellules de type II (Jurkat et CEM), l'activation des caspases 8 et 3 n'apparaissent respectivement qu'une heure et deux heures après l'interaction entre Fas et Fas-L. Ce retard d'activation des caspases est attribué à la formation d'un DISC réduit. Dans les cellules de type II, la mitochondrie joue alors un rôle primordial dans la mort de la cellule cible (Scaffidi C. *et al.*, 1998). Ainsi, dans ces cellules, la caspase 8 activée n'active pas la caspase 3 mais clive Bid en tBid conduisant à la libération de cytochrome c par la mitochondrie (Li H. *et al.*, 1998; Luo X. *et al.*, 1998). Le cytochrome c se fixe alors à Apaf1 puis ce complexe se fixe sur la procaspase 9 conduisant à l'activation de la caspase 9. La caspase 9 active ensuite la caspase 3 (Li P. *et al.*, 1997; Timmer T. *et al.*, 2002; Zou H. *et al.*, 1997).

ii. La voie TRAIL/TRAIL-R

Chez la souris, hormis une sous-population particulière de cellules NK dans le foie, les cellules NK non activées n'expriment pas TRAIL de façon détectable à leur membrane (Kayagaki N. *et al.*, 1999; Takeda K. *et al.*, 2001). Dans le foie, l'expression constitutive de TRAIL à la surface d'une sous-

population de cellules NK semble être dépendante de la production endogène d'IFN- γ (Smyth M.J. *et al.*, 2001; Takeda K. *et al.*, 2001). Dans une étude murine portant sur le développement des fonctions effectrices de la vie fœtale à la vie adulte, il a été montré que les cellules NK TRAIL⁺ sont phénotypiquement immatures (NK1.1⁺CD3⁻DX5⁻CD11b^{dim}Ly49⁻CD94/NKGA^{high}), prédominant dans la vie fœtale et néonatale et sont des précurseurs des cellules NK TRAIL⁻ de phénotype mature. Au niveau du foie, des cellules NK TRAIL⁺ persistent dans la vie adulte de façon dépendante de l'IFN- γ , alors qu'elles disparaissent rapidement après la naissance dans la rate. Outre leur cytotoxicité via la voie TRAIL-TRAIL-R, les cellules NK TRAIL⁺ sont cytotoxiques via les voies dépendante de la perforine et de Fas-L (lyse des cellules YAC-1, cellules sensibles à Fas-L et la perforine) (Takeda K. *et al.*, 2005). Chez l'homme, similairement à la souris, aucune expression constitutive de TRAIL n'est détectée sur les cellules NK non activées. Une utilisation différentielle des voies Fas/Fas-L et TRAIL/TRAIL-R a été suggérée en fonction du niveau de différenciation des cellules NK humaines. Alors que les cellules NK immatures CD56⁻CD161⁺ générées *in vitro* par de fortes doses d'IL-2 sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules cibles via la voie TRAIL/TRAIL-R et non via la voie Fas/Fas-L ou l'exocytose des granules lytiques, les cellules NK matures CD56⁺CD161⁺ privilégient quant à elles les deux dernières voies (Zamai L. *et al.*, 1998). Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les cellules NK expriment fortement TRAIL à leur surface après stimulation avec l'IL-2, l'IFN- γ , les IFN- α/β ou l'IL-15 (Kayagaki N. *et al.*, 1999; Sato K. *et al.*, 2001; Smyth M.J. *et al.*, 2005). Les IKDC expriment TRAIL après le traitement de souris avec de l'imatinibe mesylate (substance initiant des effets anti-tumoraux médiés par les cellules NK) et de l'IL-2, et lysent les cellules tumorales via la voie TRAIL/TRAIL-R (Taieb J. *et al.*, 2006).

Chez l'homme, quatre récepteurs membranaires de TRAIL (TRAIL-R1 à TRAIL-R4) et un récepteur soluble (TRAIL-R5, également appelé osteoprotegerin) ont été identifiés. Alors que TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) sont capables d'induire la transduction d'un signal aboutissant à l'apoptose, TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (DcR2) et TRAIL-R5 en sont incapables respectivement du fait de l'absence de domaine de mort, la présence d'un domaine de mort incomplet ou de sa solubilité. Ces derniers pourraient donc servir de récepteurs de leurre, permettant ainsi de réguler la mort cellulaire médiée par TRAIL (Degli-Esposti M., 1999). Contrairement au système TRAIL/TRAIL-R humain, les souris ne possèdent qu'un seul récepteur TRAIL induisant l'apoptose qui est un homologue de TRAIL-R1 et TRAIL-R2 humain: TRAIL-R (MK, mDR5). Des récepteurs de leurre ont également été identifiés chez la souris : mDcR1 et mDcR2 (mDcR2S et mDcR2L en fonction de l'épissage) (Falschlehner C. *et al.*, 2009; Smyth M.J. *et al.*, 2005).

La transduction du signal conduisant à l'apoptose de la cellule cible est similaire à celle observée à la suite de l'interaction Fas/Fas-L. Ainsi, dans les cellules de type I, après la fixation de TRAIL à TRAIL-R1

ou TRAIL-R2, les récepteurs sont trimérisés et le complexe DISC est assemblé. FADD interagit d'une part avec le domaine de mort des récepteurs TRAIL et d'autre part avec les procaspases 8 et 10, rendant ainsi ces caspases actives. Les caspases 8 et 10 activent alors directement les caspases effectrices (notamment la caspase 3) aboutissant à la mort de la cellule cible. Dans les cellules de type II, après la formation du DISC, les caspases 8 ou 10 activées clivent Bid en tBid. tBid se transloque alors dans la mitochondrie conduisant à l'activation de Bax et Bak. Bax et Bad sont responsables de la libération de cytochrome c et d'autres facteurs pro-apoptotiques tels que Smac/DIABLO par la mitochondrie. Le cytochrome c, Apaf1 et la procaspase 9 forme alors l'apoptosome qui permet l'activation de la caspase 9 et l'activation ultérieure de la caspase effectrice 3. Smac/DIABLO inhibe la fonction de XIAP (protéine inhibitrice de l'apoptose) permettant ainsi une pleine activation des caspases effectrices 3, 7 et 9 (Falschlehner C. *et al.*, 2009).

2. La régulation de la réponse immune par les cellules NK

a. La production de cytokines et de chimiokines

i. Les chimiokines

In vitro, les cellules NK humaines du sang périphérique non stimulées produisent spontanément CCL4, CCL5 et CCL22. La production de ces trois chimiokines est nettement augmentée après activation des cellules NK par diverses cytokines (Andrew D.P. *et al.*, 1998; Fehniger T.A. *et al.*, 1998; Fehniger T.A. *et al.*, 1999; Oliva A. *et al.*, 1998). Au niveau de la decidua utérine, les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ produisent, en absence de stimulation, une grande quantité de CXCL8 (Saito S. *et al.*, 1994). Après activation *in vitro* (cytokines, ULBP ou intégrines), les cellules NK humaines produisent CCL1 (Cosman D. *et al.*, 2001), CCL4 (Fehniger T.A. *et al.*, 1998; Fehniger T.A. *et al.*, 1999; Nieto M. *et al.*, 1998) et CXCL8 (Mainiero F. *et al.*, 2000; Somersalo K. *et al.*, 1994). Chez la souris, les cellules NK activées produisent XCL1, CCL3, CCL4 et CCL5 (Dorner B.G. *et al.*, 2004; Hedrick J.A. *et al.*, 1997; Ortaldo J.R. *et al.*, 2001).

Ainsi, les cellules NK participent au recrutement d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T CD4⁺ et les lymphocytes T CD8⁺. En effet, le surnageant de cellules NK activées (par la combinaison IL-2 et anti-CD16 par exemple) induit la migration *in vitro* des lymphocytes T CD4⁺ et des lymphocytes T CD8⁺. Le CXCL8 est en partie responsable du recrutement des lymphocytes T puisque sa neutralisation par un anticorps neutralisant anti-CXCL8 inhibe cette migration de 60% (Somersalo K. *et al.*, 1994). Outre le recrutement d'autres lignées cellulaires, ces chimiokines sont responsables du recrutement d'autres cellules NK. Par exemple, l'interaction des cellules NK avec les cellules cibles

K562 stimule la production de CCL3, CCL4 et CCL5 (Nieto M. *et al.*, 1998; Oliva A. *et al.*, 1998), aboutissant ainsi à une augmentation de la migration des cellules NK (Nieto M. *et al.*, 1998).

Par conséquent, grâce à leur production de chimiokines, les cellules NK participent à l'établissement et l'amplification de la réponse immune.

ii. Les cytokines

La production de cytokines par les cellules NK humaines

Lors d'une réponse immune, les monocytes activés produisent différentes cytokines, telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, capables d'activer les cellules NK. Ainsi, après fixation de ces cytokines sur leur récepteur exprimé constitutivement par les cellules NK humaines, ces dernières produisent des cytokines (IFN- γ notamment). Outre leur expression des récepteurs à l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, elles expriment de façon constitutive d'autres récepteurs de cytokines inflammatoires (IL-2, TNF et interférons de type 1) (Aste-Amezaga M. *et al.*, 1994; Carson W.E. *et al.*, 1994; Fehniger T.A. *et al.*, 1999; Wang K.S. *et al.*, 2000). Plus récemment, parmi les cellules NK, les cellules NK CD56^{bright} ont été identifiées comme la principale source de cytokines, leur conférant ainsi un rôle immunorégulateur. En effet, outre la production d'IFN- γ , ces cellules produisent du TNF- β , de l'IL-10, de l'IL-13 et du GM-CSF en réponse à une stimulation cytokinique. Néanmoins, les cytokines produites par les cellules NK CD56^{bright} sont fonction de la stimulation initiale. Ainsi, l'IL-15 induit la production de TNF- β et de GM-CSF. La combinaison de l'IL-12 et de l'IL-15 induit, quant à elle, la production d'IFN- γ , d'IL-10, de TNF- β et de GM-CSF. La combinaison de l'IL-12 et de l'IL-18 mène à la production d'IFN- γ , de TNF- β et de GM-CSF. Enfin, la combinaison de l'IL-15 et de l'IL-18 mène à la production de TNF- β , d'IL-13 et de GM-CSF (Cooper M.A. *et al.*, 2001).

Similairement aux lymphocytes T, une polarisation des cellules NK1/NK2 a été décrite *in vitro* puis *in vivo*. Dans l'étude *in vitro*, les cellules NK ont été générées par une coculture de leucocytes du sang périphérique avec une lignée de cellules B lymphoblastoïdes en présence de la combinaison IL-12/anticorps anti-IL-4 (condition NK1) ou de la combinaison IL-4/anti-IL-12 (condition NK2) pendant huit jours. Après cette coculture, les cellules NK ont été purifiées et stimulées pendant 18 heures par la combinaison PMA/ionomycine ou par un anti-CD16 fixé. Les cellules générées en condition NK1 ou NK2 produisent des quantités similaires de TNF- α , GM-CSF et XCL1. En revanche, les cellules générées en condition NK2 produisent spécifiquement l'IL-13 et l'IL-5 alors que les cellules générées en condition NK1 produisent plus d'IL-10 et nettement plus d'IFN- γ (Peritt D. *et al.*, 1998). Cette polarisation en sous-populations NK1 et NK2 est observée *in vivo* avec la présence dans le sang périphérique de cellules NK1 sécrétrices d'IFN- γ mais n'exprimant quasiment pas l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13

et de cellules NK2 non sécrétrices d'IFN- γ mais produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Concernant la cytotoxicité naturelle, les cellules NK1 et NK2 lysent de façon similaire les cellules cibles K562 (Deniz G. *et al.*, 2002). La proportion de cellules NK1 et NK2 dans le sang périphérique a été analysée dans différentes pathologies allergiques. Dans la dermatite atopique polyallergique, les fréquences de cellules NK sécrétrices d'IFN- γ (NK1) et non sécrétrices d'IFN- γ (NK2) sont similaires aux sujets contrôle avec une fréquence des cellules NK1 comprise entre 71 et 94% et des cellules NK2 entre 6 et 29% (Deniz G. *et al.*, 2002). Après 72 heures de culture en milieu complet, la production spontanée d'IL-4, IL-5, IL-13 et IFN- γ par les cellules NK de sujets atteints de dermatite atopique polyallergique est supérieure à celle observée pour les cellules NK de sujets contrôle. Des cellules NK de sujets atteints de dermatite atopique différenciées *in vitro* en cellules NK1 et NK2 et stimulées par la PHA produisent respectivement davantage d'IFN- γ et de cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) que celles issues de sujets contrôle (Aktas E. *et al.*, 2005). Chez ces patients, le pourcentage de cellules NK du sang périphérique est diminué par rapport aux sujets contrôle (Wehrmann W. *et al.*, 1990). La fréquence des cellules NK1 et NK2 dans le sang périphérique de sujets asthmatiques a également été étudiée (Wei H. *et al.*, 2005) et sera décrite ultérieurement (Chapitre 2, B-11-b). Cette dichotomie NK1/NK2 est tout de même à considérer avec précaution. En effet, les études précédemment citées sont les seules à avoir utilisé cette nomenclature. De plus, Loza et Perussia réfutent cette dichotomie NK1/NK2 et suggèrent plutôt que le profil de cytokines produit par les cellules NK est modifié au cours de leur développement. Ainsi, les cellules NK IL-13⁺ se différencieraient en cellules NK IFN- γ ⁺, via un stade intermédiaire IL-13⁺IFN- γ ⁺ (Loza M.J. and Perussia B., 2001).

Des cellules NK à activité régulatrice ont également été décrites. Après stimulation *in vitro* de cellules NK issues du sang périphérique de sujets « sains » par la PHA, approximativement 7% de ces cellules produisent de l'IL-10. Ces cellules NK IL-10⁺ présentent des capacités cytotoxiques naturelles similaires aux cellules NK IL-10⁻ vis-à-vis de cellules cibles K562. En revanche, dans un système autologue, la présence de cellules NK IL-10⁺ inhibe la prolifération des cellules T CD4⁺ spécifiques de l'antigène (PPD ou PLA) induite par les PBMC stimulées à l'antigène, ainsi que la production d'IL-13 et d'IFN- γ . L'expression de l'ARNm de l'IL-10 par les cellules NK peut être induite par divers stimuli incluant les combinaisons PMA/ionomycine, IL-2/PHA, anti-CD2/anti-CD16 et vitamine D3 /Dexaméthasone (Deniz G. *et al.*, 2008).

La production de cytokines par les cellules NK murines

De même, chez la souris, l'expression constitutive de récepteurs aux cytokines permet leur activation en réponse aux cytokines libérées par les monocytes activés telles que l'IL-12 et l'IL-18. Parmi les cellules NK murines, seules les cellules NK matures CD11b^{high}CD27^{high} produisent des quantités

déTECTABLES d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 ou l'IL-18. Les cellules NK les plus matures CD11b^{high}CD27^{low}, quant à elles, produisent de l'IFN- γ uniquement en réponse à une stimulation IL-12+IL-18, et ce de façon moindre que les cellules NK matures CD11b^{high}CD27^{high}. La stimulation IL-12+IL-18 mène également à la production de GM-CSF mais pas de TNF- α , d'IL-10 et d'IL-13 par les cellules NK matures CD11b^{high}CD27^{high} (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006).

In vitro, la dichotomie NK1/NK2 est retrouvée dans une étude. Les cellules NK1 sont obtenues après une stimulation initiale par la PMA/ionomycine en présence d'IL-2 et d'IL-12 pendant deux jours puis une restimulation par de l'IL-2 ou la combinaison PMA/ionomycine pendant 3 jours. Ces cellules produisent alors de l'IL-10 et de l'IFN- γ , mais ne sécrètent pas d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13. Les cellules NK2 sont obtenues après une stimulation initiale par la PMA/ionomycine en présence d'IL-2, d'IL-12 et d'anti-IFN- γ pendant deux jours puis une restimulation par de l'IL-2 ou la combinaison PMA/ionomycine pendant 3 jours. Ces cellules produisent alors de l'IL-5 et de l'IL-13, mais ne sécrètent pas d'IFN- γ , d'IL-10 et d'IL-4. D'un point de vue cytotoxique, les cellules NK1 présentent de meilleures capacités cytotoxiques vis-à-vis des cellules cibles YAC-1 comparativement aux cellules NK2 (Katsumoto T. *et al.*, 2004). Une troisième sous-population de cellules NK, les cellules NK3-like, ont été décrites et sont impliquées dans la régulation des diabètes de type 1 auto-immuns (réponse auto-immune Th1). Le traitement de souris NOD (Non Obese Diabetic) avec du poly(I:C) empêche les diabètes de type 1 spontanés, en déviant la réponse immune vers un profil Th2. En effet, les souris NOD traitées au poly(I:C) possèdent des taux d'IgE sériques augmentés, une augmentation de la production d'IL-4 et une diminution de celle de l'IFN- γ dans le pancréas comparativement aux souris NOD non traitées avec le poly(I:C). Les cellules NK sont impliquées dans cette déviation de la réponse immune puisque leur déplétion abroge l'effet protecteur du poly(I:C) et la déviation de la réponse immune au niveau du pancréas. Les cellules NK purifiées à partir des souris NOD traitées au poly(I:C) puis restimulées *in vitro* au poly(I:C) produisent plus d'IL-10 et de TGF- β mais moins d'IFN- γ comparativement aux cellules NK purifiées à partir des souris NOD non traitées au poly(I:C), suggérant ainsi un phénotype NK3-like (Zhou R. *et al.*, 2007).

b. Les interactions avec les cellules dendritiques

En fonction de leur origine, les DC sont divisées en deux types : les DC myéloïdes (mDC) qui comme leur nom l'indique sont d'origine myéloïde et les DC plasmacytoïdes (pDC) d'origine lymphoïde. Les mDC sont des cellules clé de l'interface immunité innée/immunité adaptative. En effet, après capture de l'antigène, ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène apprêté aux lymphocytes T, initiant ainsi la réponse immune adaptative. Outre leur fonction de CPA, les mDC sont capables d'interagir de façon réciproque avec les cellules NK, et ce via un contact

cellulaire direct. Les pDC sont des cellules de l'immunité innée principalement impliquées dans les réponses anti-virales essentiellement via la sécrétion d'IFN- α et de TNF- α . Comme les mDC, ces cellules sont capables d'établir un dialogue croisé avec les cellules NK.

i. Les conditions nécessaires pour un dialogue croisé entre les cellules NK et les DC

Les études initiales sur les interactions entre les cellules NK et les DC ont montré que l'activation des cellules NK est nécessaire pour un dialogue croisé efficace entre ces deux types cellulaires (Carbone E. *et al.*, 1999; Ferlazzo G. *et al.*, 2002; Gerosa F. *et al.*, 2002; Piccioli D. *et al.*, 2002; Wilson J.L. *et al.*, 1999), ainsi que la formation d'une synapse immunologique.

Ce dialogue croisé peut s'opérer au niveau des sites inflammatoires et des organes lymphoïdes secondaires. En fonction de la localisation, les signaux activateurs diffèrent. Après recrutement au niveau des sites inflammatoires par différentes chimiokines produites par les macrophages, les neutrophiles, les DC et les cellules endothéliales, différentes sources pourraient fournir les signaux d'activation appropriés aux cellules NK pour la mise en place du dialogue NK/DC. Ceux-ci incluent non seulement un engagement direct de leurs TLR avec les produits dérivés des pathogènes mais également les cytokines libérées par d'autres types cellulaires au niveau du site inflammatoire (Moretta L. *et al.*, 2006). Chez l'homme, dans les ganglions lymphatiques inflammés, les cellules NK CD56^{bright} et les DC sont retrouvées dans les zones de cellules T (Ferlazzo G. *et al.*, 2004). De même, chez la souris, en conditions inflammatoires, la plupart des cellules NK murines sont préférentiellement recrutées dans la zone des cellules T des ganglions lymphatiques, proche des HEV, en étroit contact avec les DC (Bajenoff M. *et al.*, 2006). Dans les ganglions lymphatiques inflammés, l'IL-2 pourrait être la cytokine responsable de l'activation des cellules NK. En effet, les DC matures induisent l'activation des cellules T qui libèrent alors de grandes quantités d'IL-2. Outre son effet sur la prolifération des cellules T et des cellules NK, cette cytokine active également les cellules NK qui peuvent ainsi interagir avec les DC (Moretta L. *et al.*, 2006).

In vitro, les molécules d'adhérence LFA-1 et/ou CD2 exprimées à la surface des cellules NK ont été montrées être indispensables à la formation de la synapse. En effet, un pré-traitement des DC avec des anticorps bloquant anti-LFA-1 ligands (anti-ICAM-1, -2 et -3) et anti-LFA-3 inhibent fortement l'établissement de cette synapse, mais diminuent aussi la survie des cellules NK. Ainsi, la formation de la synapse est essentielle à la survie des cellules NK lors des interactions avec les DC (Brilot F. *et al.*, 2007). *In vivo*, en condition basale, les cellules PNA⁻CD49b⁺ (considérées comme des cellules NK dans cet article) des ganglions lymphatiques présentent une faible vitesse (2-3 $\mu\text{m}/\text{min}$) et établissent des interactions de longue durée avec les DC (minimum 25 minutes), montrant ainsi l'existence d'une synapse immunologique *in vivo* entre les cellules NK et les DC (Bajenoff M. *et al.*,

2006). Néanmoins, dans une étude plus récente utilisant des souris NCR1^{GFP/+} (marquage GFP sur toutes les cellules NKp46⁺, marqueur actuellement le plus spécifique des cellules NK), il a été montré que les cellules NK localisées dans les régions périphériques des zones T des ganglions lymphatiques sont très motiles (9,4 µm/min) et interagissent de nombreuses fois avec les DC lors de contacts de courte durée (<5 minutes) (Beuneu H. *et al.*, 2009). Une motilité similaire des cellules NK dans les ganglions lymphatiques a également été retrouvée à la suite d'un transfert de splénocytes de souris Rag^{-/-} marqués au CFSE à des souris wild type (Garrod K.R. *et al.*, 2007).

ii. L'effet des interactions NK/DC sur la DC

La lyse des DC immatures (iDC)

Dans cette partie, l'ensemble des résultats décrits a été obtenu dans des systèmes autologues. Ainsi, les cellules NK et les DC provenant du même donneur, les résultats observés ne sont pas biaisés par la reconnaissance par les cellules NK du CMH I du non Soi.

In vitro, les cellules NK activées par l'IL-2 sont capables de lyser les iDC dérivées de monocytes (Carbone E. *et al.*, 1999; Wilson J.L. *et al.*, 1999). La lyse des iDC par les cellules NK est dépendante du ratio NK:DC. Ainsi, de faibles ratios NK:DC (1:1 à environ 5:1) n'entraînent pas de lyse des iDC mais leur maturation, alors que de forts ratios (à partir de 10:1) mènent à une forte lyse des iDC (Carbone E. *et al.*, 1999; Ferlazzo G. *et al.*, 2002; Piccioli D. *et al.*, 2002; Wilson J.L. *et al.*, 1999). Le NKp30, récepteur activateur présent à la surface des cellules NK, joue un rôle majeur dans la lyse des iDC. En effet, l'inhibition du NKp30 par un anticorps bloquant réduit fortement la lyse des iDC (Ferlazzo G. *et al.*, 2002). De même, chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigüe présentant fréquemment une diminution d'expression des NCR (NKp30, NKp46 et NKp44), les cellules NK présentent un défaut de lyse des iDC (Costello R.T. *et al.*, 2002; Fauriat C. *et al.*, 2005). Le TGF-β1 diminue l'expression du NKp30 à la surface des cellules NK, réduisant ainsi la lyse des iDC (Castriconi R. *et al.*, 2003). Le ou les ligands à la surface des iDC reconnus par les cellules NK ne sont pas encore réellement définis. Néanmoins, le NKp30 fixe la protéine intracellulaire BAT-3 exprimée faiblement à la surface des iDC mais dont l'expression est augmentée à la surface des iDC ayant subi un choc thermique non-léthal. Cette protéine semble impliquée dans la lyse des iDC puisque son inhibition par transfection de siRNA dans les iDC ou par un anti-BAT-3 diminue la lyse des iDC par les cellules NK (Pogge von Strandmann E. *et al.*, 2007; Simhadri V.R. *et al.*, 2008). Le récepteur DNAM-1 exprimé par les cellules NK (mais aussi par les lymphocytes T et les monocytes) coopère avec le NKp30 dans la lyse des iDC. Ce récepteur interagit avec le CD155 (récepteur au poliovirus) et le CD112 (nectine-2) exprimés à la surface des DC (Pende D. *et al.*, 2006).

Contrairement aux iDC, les DC matures ne sont pas lysées par les cellules NK (Ferlazzo G. *et al.*, 2001; Ferlazzo G. *et al.*, 2002; Wilson J.L. *et al.*, 1999). Cette différence de sensibilité a été initialement basée sur la différence d'expression des molécules de CMH I à la surface des iDC et des DC matures. En effet, les DC matures expriment des niveaux de CMH I plus importants comparativement aux iDC, ce qui les rendrait résistantes à la lyse par les cellules NK (Ferlazzo G. *et al.*, 2001). La lyse des iDC n'est pas une fonction commune à toutes les cellules NK, mais est plutôt la propriété d'une population de cellules NK caractérisées par le phénotype de surface $KIR^{\downarrow}CD94/NKG2A^+$. Comme nous l'avons vu dans le chapitre portant sur les récepteurs des cellules NK, ce récepteur reconnaît les molécules du CMH I non classiques, HLA-E (Chapitre 1, C-1-a). Les molécules HLA-A, -B et -C sont fortement diminuées à la surface des iDC comparativement aux monocytes et aux DC matures, mais sont tout de même présentes. En revanche, l'HLA-E est quasiment absent à la surface des iDC. C'est pourquoi, ces cellules sont uniquement sensibles à la lyse par les cellules NK n'exprimant pas les KIR mais exprimant le récepteur CD94/NKG2A. Néanmoins, les cellules NK $KIR^{\downarrow}CD94/NKG2A^+$ sont hétérogènes dans leur capacité à tuer les iDC. Ainsi, les cellules NK exprimant faiblement le récepteur CD94/NKG2A ($CD94/NKG2A^{dull}$) lysent plus efficacement les iDC, et ce probablement par une meilleure détection de la très faible expression du HLA-E. L'expression plus importante du HLA-E à la surface des DC matures explique, quant à elle, leur protection vis-à-vis des cellules NK (Della Chiesa M. *et al.*, 2003).

Contrairement aux mDC, les pDC ne sont pas lysées par les cellules NK activées. Cette résistance à la lyse est attribuée à la forte expression des molécules de CMH I et la faible expression des ligands des récepteurs activateurs des cellules NK à la surface des pDC. En effet, les pDC n'expriment pas les ligands MICA et ULBP1-4 du récepteur activateur NKG2D, ainsi que les ligands CD155 et CD112 du récepteur DNAM-1. Néanmoins, l'exposition des pDC à l'IL-3 induit l'expression du CD155 et du CD112, les rendant ainsi sensibles à la lyse par les cellules NK (Della Chiesa M. *et al.*, 2006).

La différenciation et la maturation des DC

Outre la lyse des iDC, les cellules NK sont également capables d'induire la maturation des DC lors de leurs interactions. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, celle-ci semble s'opérer lorsque le ratio NK:DC est faible (1:1 jusqu'à environ 5:1). Ainsi, à ces faibles ratios, une coculture autologue NK/iDC augmente l'expression des marqueurs de maturation CD83, CD86 et HLA-DR à la surface des DC. Comme pour la lyse des iDC par les cellules NK, cette maturation est dépendante de l'interaction NK/iDC. En effet, si les deux types cellulaires sont séparés par un transwell, aucune maturation des DC n'est observée. Le TNF- α est également nécessaire à cette maturation puisqu'un anticorps neutralisant anti-TNF- α abroge totalement cette maturation (Piccioli D. *et al.*, 2002). Une

étude ultérieure réalisée dans des conditions allogéniques a montré que le TNF- α est produit à la suite de l'engagement du NKp30. Les cellules NK impliquées dans ce processus de maturation sont les cellules NK KIR⁻CD94/NKG2A^{dull} (Vitale M. *et al.*, 2005), population également principalement impliquée dans la lyse des iDC (Della Chiesa M. *et al.*, 2003). Lors de ces interactions dans un système autologue, le taux de Ca²⁺ dans l'iDC est augmenté et l'iDC réarrange son cytosquelette. Ainsi, la tubuline et les lysosomes sécrétoires contenant l'IL-18 et la cathepsine D se retrouvent au niveau de la synapse immunologique. Cette polarisation est suivie par la sécrétion de l'IL-18 (et également de la cathepsine D). L'IL-18 libérée induit alors la sécrétion d'High Mobility Group B1 (HMGB1) par les cellules NK, favorisant ainsi la maturation des DC (Semino C. *et al.*, 2005). Outre le ratio NK:DC, la localisation cytoplasmique ou nucléaire de l'HMGB1 dans les cellules NK est déterminante dans l'induction ou non de la maturation des iDC autologues. A la suite de l'engagement du NKp30, des clones de cellules NK CD56⁺CD94⁺ exprimant initialement l'HMGB1 dans leur nucleus ne libèrent pas l'HMGB1 et donc n'induisent pas la maturation des iDC. En revanche, les clones exprimant l'HMGB1 dans leur cytoplasme (probablement à l'intérieur de granules différents de ceux impliqués dans la cytotoxicité) libèrent l'HMGB1, induisant ainsi la maturation des iDC et la production de TNF- α . Le TNF- α et l'HMGB1 formeraient une boucle pro-inflammatoire, comme elles induisent leur sécrétion réciproque (Semino C. *et al.*, 2007). De même, le TNF- α libéré après l'engagement du NKp30 pourrait également mener à la libération directe d'HMGB1, aboutissant de nouveau à une production réciproque de ces deux cytokines (Rendon-Mitchell B. *et al.*, 2003).

Après activation par l'IL-15, les cellules NK, et plus particulièrement les cellules NK CD56^{bright}, induisent la différenciation *in vitro* des monocytes en DC. Celle-ci est dépendante d'une interaction directe entre les deux types cellulaires via le CD40L exprimé par les cellules NK et le CD40 exprimé par les monocytes, mais également du GM-CSF sécrété par les cellules NK activées (notamment les cellules NK CD56^{bright}). Les DC ainsi différenciées, activées ou non, induisent la production d'IFN- γ par les cellules T CD4⁺ allogéniques, aboutissant à une polarisation Th1. *In vivo*, ces interactions pourraient avoir lieu au niveau des sites inflammatoires chroniques présents par exemple dans l'arthrite rhumatoïde (Zhang A.L. *et al.*, 2007).

Concernant les pDC, une coculture autologue de ces cellules avec des cellules NK activées par l'IL-2 à un ratio 1:2 induit une augmentation de l'expression du CD83 à la surface des pDC traduisant ainsi leur maturation. Cette maturation nécessite un contact direct entre les deux types cellulaires puisqu'elle ne s'opère pas lorsque les cellules NK activées et les pDC sont séparées par un transwell. En présence de CpG-ODN, les cellules NK activées par l'IL-2 amplifient la production d'IFN- α et de TNF- α par les pDC, et ce par le biais d'une interaction directe entre les deux types cellulaires. Dans

cette étude, l'activation des cellules NK est indispensable pour la maturation et la production de cytokines par les pDC (Gerosa F. *et al.*, 2005), alors que dans une autre elle ne l'est pas. En effet, en présence de CpG ODN, les cellules NK non activées induisent la maturation et amplifient la sécrétion d'IL-6 et d'IFN- α par les pDC autologues (Della Chiesa M. *et al.*, 2006). Cette différence pourrait s'expliquer par le temps de coculture différent (18 heures (Gerosa F. *et al.*, 2005) versus 24 heures (Della Chiesa M. *et al.*, 2006)) et/ou par les ratios NK:pDC différents (2:1 (Gerosa F. *et al.*, 2005) versus 5:1 ou 10:1 (Della Chiesa M. *et al.*, 2006)).

iii. *L'effet des interactions NK/DC ou NK/monocytes sur la cellule NK*

Les interactions avec les mDC

L'activation des cellules NK par les cytokines produites par les mDC

L'IL-12 est cruciale pour l'induction de la libération d'IFN- γ par les cellules NK, mais également pour l'amplification de leurs capacités cytotoxiques (Trinchieri G., 2003; Walzer T. *et al.*, 2005). La formation de synapses stimulatrices entre les cellules NK et les DC permettrait de concentrer l'IL-12 préformée et de la délivrer aux cellules NK (Borg C. *et al.*, 2004). L'IL-18 produite par les iDC et/ou les macrophages n'amplifie pas l'activité cytolytique des cellules NK mais induit une activité helper. En effet, l'IL-18 initie le développement d'un type unique de cellules NK helper caractérisées par un phénotype CD56⁺CD16⁺ mais également par l'expression du CD83, du CCR7 et du CD25. Ces cellules acquièrent la capacité de migrer vers les ganglions où elles promeuvent la production d'IL-12 par les iDC, induisant ainsi une polarisation Th1 des lymphocytes T CD4⁺ (Mailliard R.B. *et al.*, 2005).

Les complexes IL-15/IL-15R α présents à la surface des DC permettent l'activation des cellules NK via une *trans*-présentation. *In vitro*, l'activation des DC murines avec des ligands de TLR (poly(I:C) ou LPS) induit la formation de complexes pré-assemblés IL-15/IL-15R α à l'intérieur du réticulum endoplasmique/Golgi. Ces complexes sont ensuite libérés et sont retrouvés soit sous forme soluble, soit fixés à la membrane de la DC. Les DC activées de souris wild-type induisent l'activation des cellules NK (sécrétion d'IFN- γ), alors que les DC activées de souris déficientes en IL-15 ou IL-15R α n'activent pas les cellules NK de souris wild type montrant ainsi l'importance des complexes IL-15/IL-15R α fixés à la surface des DC dans l'activation des cellules NK (Mortier E. *et al.*, 2008). Outre l'activation des cellules NK, ce complexe semble responsable de la survie des cellules NK lors de leurs interactions avec les DC. Les DC maturées au poly(I:C) expriment de façon plus abondante l'IL-15R α à leur surface que les iDC. Les cellules NK isolées du sang périphérique expriment des niveaux intermédiaires d'IL-15R α , mais aussi l'IL-15R β pouvant ainsi former le récepteur de forte affinité pour l'IL-2. Par analyse 3D, il a été observé que l'IL-15R α est localisée avec les KIR et le CD94 au centre de

la synapse NK/DC, synapse formée préférentiellement avec les cellules NK CD56^{bright}CD16⁻. L'IL-15R α est nécessaire à la survie des cellules NK puisqu'un pré-traitement des cellules NK avec un anticorps bloquant anti-IL15R α mène à l'apoptose des cellules NK après interaction avec les DC matures (Brilot F. *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'implication de la *trans*-présentation des complexes IL-15/IL-15R α n'a pas été démontrée. Néanmoins, au vu des résultats de l'étude de Mortier et ses collaborateurs (Mortier E. *et al.*, 2008), il est fort probable que la *trans*-présentation de l'IL-15 soit à l'origine de la survie des cellules NK.

L'activation des cellules NK par la chimiokine CX₃CL1

La chimiokine CX₃CL1 joue un rôle crucial dans l'organisation du cytosquelette et dans l'activation de la cellule NK (Pallandre J.R. *et al.*, 2008). CX₃CL1 est une chimiokine se présentant soit sous forme soluble, soit ancrée à la membrane des iDC et DC matures avec néanmoins une expression accrue à la surface des DC matures (Papadopoulos E.J. *et al.*, 1999). Comme nous l'avons vu dans le chapitre portant sur les récepteurs de chimiokines des cellules NK (Chapitre 1, B-5), les cellules NK et plus particulièrement les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺ expriment le récepteur à CX₃CL1 (CX₃CR1). Ainsi, la présence d'un anticorps bloquant anti-CX₃CL1 inhibe la formation de la synapse humaine entre les DC maturées au LPS et les cellules NK. Outre son rôle dans la formation de la synapse, CX₃CL1 intervient dans l'activation des cellules NK murines ou humaines. Chez la souris, dans un système autologue, une coculture de cellules NK isolées de souris wild type avec des DC matures (ratio 10:1) conduit à la production d'IFN- γ . En revanche, une coculture de cellules NK isolées de souris déficientes en CX₃CR1 avec des DC matures autologues n'aboutit pas à la production d'IFN- γ . De même, chez l'homme, la coculture de cellules NK avec des DC matures autologues conduit à la production d'IFN- γ , qui est abrogée lors d'une coculture en présence d'un anticorps bloquant anti-CX₃CR1. La production d'IFN- γ peut être restaurée par l'ajout d'anticorps anti-CMH I, suggérant ainsi une relation directe entre la signalisation induite par l'interaction CX₃CL1/CX₃CR1 et la fonction des KIR inhibiteurs. En effet, l'interaction CX₃CL1/CX₃CR1 empêche non seulement l'accumulation de récepteurs KIR inhibiteurs au niveau de la synapse mais également la transduction du signal inhibiteur induit par l'interaction KIR/CMH I (Pallandre J.R. *et al.*, 2008).

Les effets inhibiteurs des mDC

Outre les effets activateurs des DC matures sur les cellules NK, des effets inhibiteurs ont été également décrits. Chez l'homme, l'activine A produite par les DC matures atténue plusieurs fonctions des cellules NK humaines (Robson N.C. *et al.*, 2009). L'activine A est un membre de la superfamille de TGF- β qui est rapidement et fortement sécrétée par les DC activées après exposition

à des bactéries (*Escherichia coli*), à des ligands de TLR2/6, -3, -4 ou -7/8 (Pam3Cys, poly(I:C), LPS et R-848) ou au CD40L (Robson N.C. *et al.*, 2008). Les ARNm des récepteurs de l'activine A de type I (ALK4) et de type II (ActRIIA et ActRIIB) sont exprimés par les cellules NK au repos et sont up-régulés dans les cellules NK activées (IL-2+IL-12). En présence d'activine A, les ARNm d'ALK4 sont davantage up-régulés, suggérant ainsi que les cellules NK humaines expriment des récepteurs fonctionnels à l'activine A. Ainsi, l'activine A sécrétée par les DC matures diminue la production d'IFN- γ par les cellules NK. En effet, lors d'une coculture NK/iDC (Ratio 2:1) en présence de poly(I:C) et d'IL-12, la production d'IFN- γ par les cellules NK est augmentée par l'ajout d'un antagoniste de l'activine A (la follistatine) ou d'un antagoniste du récepteur ALK4. L'activine A supprime également fortement la prolifération des cellules NK CD56^{dim} ou CD56^{bright} en réponse à la combinaison IL-2+IL-12+Ligand TLR (LPS ou poly(I:C)). En revanche, elle n'a aucun effet sur la cytotoxicité des cellules NK activées vis-à-vis de cellules cibles (K562 ou Jurkat) (Robson N.C. *et al.*, 2009).

De plus, chez la souris, lors d'une coculture autologue cellules NK/DC (Ratio 1:1) en présence de CpG-ODN, les expressions de la molécule de CMH I Qa-1^b à la surface des DC et de son récepteur inhibiteur CD94/NKG2A à la surface des cellules NK sont augmentées, permettant ainsi une modulation de l'activation des cellules NK. En effet, une coculture en présence de CpG-ODN de cellules NK de souris isolées de souris wild-type avec des DC générées à partir de souris déficientes en Qa-1^b résulte en une plus forte sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK comparativement à une coculture avec des DC générées de souris wild type (Colmenero P. *et al.*, 2007).

Les interactions avec les pDC

Les pDC préalablement stimulées (IL-3+CpG ou virus influenza inactivé) induisent l'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des cellules NK humaines. De plus, après une coculture pDC stimulées/NK, les cellules NK présentent une cytotoxicité accrue vis-à-vis de cellules cibles (cellules Daudi, K562, FO-1...). Néanmoins, l'activation et l'amplification de la cytotoxicité ne sont pas dues à une interaction directe entre les cellules NK et les pDC, mais à la sécrétion de facteurs solubles par les pDC. Les IFN de type I sont impliqués dans l'amplification de la cytotoxicité, alors que l'activation des cellules NK est due au TNF- α et à l'IFN- α (Gerosa F. *et al.*, 2005; Romagnani C. *et al.*, 2005). Concernant la production de cytokines et plus particulièrement de l'IFN- γ par les cellules NK, les pDC stimulées ou leur surnageant n'induisent que de très faibles quantités d'IFN- γ . Enfin, les pDC stimulées induisent la prolifération des cellules NK CD56^{bright} (Romagnani C. *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que les pDC activées par un virus non inactivé (HCMV) augmentent l'expression du CD69 à la surface de la cellule NK et induisent une sécrétion abondante d'IFN- γ et de TNF- α par les cellules NK. En revanche, aucune amplification de la cytotoxicité des cellules NK contre les cellules

K562 n'est observée après coculture des cellules NK avec les pDC infectées par le HCMV (Cederarv M. *et al.*, 2009).

Les interactions avec les monocytes

Chez l'homme, outre l'effet des cellules NK activées sur la différenciation des monocytes en DC, les monocytes activés sont capables d'induire l'activation des cellules NK. L'activation des monocytes par des ligands de TLR (LPS, Poly(I:C) et Pam3Cys) mène à une augmentation de l'expression de MICA, un des ligands du récepteur activateur NKG2D présent à la surface des cellules NK (Kloss M. *et al.*, 2008). La coculture de monocytes activés par le LPS avec des cellules NK autologues conduit à la diminution de l'expression du NKG2D à la surface des cellules NK, traduisant ainsi une interaction entre les monocytes et les cellules NK via MICA/NKG2D (Kloss M. *et al.*, 2008; Ogasawara K. *et al.*, 2003). Cette interaction n'aboutit pas à la lyse des monocytes même si les cellules NK sont activées par l'IL-2, mais conduit à la production d'IFN- γ par les cellules NK activées (Ogasawara K. *et al.*, 2003).

c. Les interactions entre les cellules NK et les lymphocytes T

Les cellules NK interagissent essentiellement avec les lymphocytes via la sécrétion de facteurs solubles (cytokines, chimiokines) et les interactions NK/DC. Néanmoins, une interaction directe entre les cellules NK et les cellules T est également possible.

i. Les interactions avec les lymphocytes effecteurs

Les interactions via les cytokines, les chimiokines et les interactions NK/DC

Les cellules NK initient la réponse immunitaire adaptative via leur production de cytokines et chimiokines. Lors d'infections virales, l'IFN- γ produit par les cellules NK joue un rôle clé dans la réponse antivirale initiale en particulier par l'activation de la sécrétion d'IL-12 par les macrophages. L'IL-12 permet alors la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes effecteurs Th1 et le développement de cellules T CD8⁺ cytotoxiques (Zingoni A. *et al.*, 2005). Lors d'une infection au MCMV, l'IFN- γ produit par les cellules NK dans le foie est également essentiel à la sécrétion locale de CXCL9, attirant ainsi les cellules T activées au niveau du site infecté (Salazar-Mather T.P. *et al.*, 2000). L'IL-12 semble jouer un rôle important dans l'activation des cellules NK et le développement de la réponse Th1. En effet, *in vivo*, le traitement de souris infectées par *Leishmania major* avec un anticorps anti-IL-12 neutralisant inhibe les réponses cytotoxiques des cellules NK, ainsi que leur production d'IFN- γ dans les ganglions lymphatiques. En conséquence, chez ces souris, le développement de la réponse Th1 est abrogé alors que la réponse Th2 est amplifiée (Scharton-Kersten T. *et al.*, 1995). En résumé, les cellules NK, et notamment l'IFN- γ qu'elles produisent, jouent

un rôle dans la polarisation Th1. En revanche, aucune étude n'a montré de rôle de ces cellules dans la polarisation Th2. Néanmoins, lors d'une infection avec les antigènes de *Mycoplasma pulmonis* chez la souris, la déplétion en cellules NK conduit à une diminution de la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-17 et à une augmentation de la production d'IFN- γ par les cellules ganglionnaires restimulées *in vitro* par les antigènes de *M. pulmonis* (Bodhankar S. *et al.*, 2009), suggérant une implication des cellules NK dans la production de cytokines Th2. Concernant les réponses T cytotoxiques spécifiques d'antigènes, une déplétion en cellules NK *in vivo* et *in vitro* diminue ces réponses, suggérant un rôle des cellules NK dans leur génération (Kos F.J. and Engleman E.G., 1995; Kos F.J. and Engleman E.G., 1996). Outre les cytokines, les cellules NK produisent des chimiokines capables de recruter les cellules T. En effet, par exemple, lors d'une infection virale au MCMV ou d'une infection bactérienne à *Listeria monocytogenes*, les cellules NK produisent les chimiokines CCL3, CCL4, CCL5 et XCL1 (Dorner B.G. *et al.*, 2002; Dorner B.G. *et al.*, 2004).

Les interactions entre les cellules NK et les DC jouent également un rôle essentiel dans la polarisation de la réponse immune adaptative. Dans les ganglions inflammés, les cellules NK sont colocalisées avec les DC matures et les cellules T (Bajenoff M. *et al.*, 2006). Ainsi, chez l'homme ou chez la souris, l'IFN- γ produit par les cellules NK après interaction avec les DC matures conduit à une polarisation Th1 (Bajenoff M. *et al.*, 2006; Morandi B. *et al.*, 2006). L'IFN- γ produit par les cellules NK recrutées est indispensable à la polarisation Th1, puisque la déplétion des cellules NK l'affecte considérablement. En effet, dans les ganglions drainants des souris déplétées en cellules NK, après injection de DC maturées au LPS, la prolifération des lymphocytes T est réduite de 75% et le nombre de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ est réduit de 90% (Martin-Fontecha A. *et al.*, 2004). De plus, lors d'infections virales ou de tumeurs, la diminution d'expression de CMH I à la surface des cellules infectées ou tumorales induit leur lyse par les cellules NK. Les cellules NK alors activées produisent de l'IFN- γ qui entraîne la production d'IL-12 par les DC, aboutissant à une réponse T CD8⁺ cytotoxique (Mocikat R. *et al.*, 2003). Les produits issus de la lyse des cellules cibles pourraient également être pris en charge par les DC, aboutissant à une réponse T CD8⁺ cytotoxique. Enfin, l'exposition des cellules NK à des cytokines libérées durant les réponses immunes innées dans les tissus périphériques inflammés ou dans les organes lymphoïdes secondaires semble avoir un impact sur le priming des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. A la suite d'une coculture avec des cellules NK préactivées avec l'IL-12 (ratio: 5 DC pour 1 cellule NK), les DC humaines allogéniques mises en culture avec des lymphocytes T CD4⁺ naïfs allogéniques induisent leur polarisation en cellules Th1. En revanche, à la suite d'une coculture avec des cellules NK préactivées avec l'IL-18, les DC sont incapables de polariser les cellules T CD4⁺ naïves en lymphocytes Th1. Néanmoins, la coculture de cellules NK préactivées à l'IL-18, de DC et de lymphocytes T CD4⁺ naïfs conduit à la polarisation Th1. La production d'IL-2 par les lymphocytes T

naïfs après interaction avec les DC pourrait être à l'origine d'une production d'IFN- γ par les cellules NK et de la polarisation Th1 ultérieure. Contrairement à la préactivation par l'IL-12 ou l'IL-18, les cellules NK préactivées par l'IL-4 ne possèdent pas d'activité helper. En effet, les DC cultivées avec ces cellules NK sont incapables de polariser les lymphocytes vers un profil Th1, Th2, Treg ou Th17 (Agaugue S. *et al.*, 2008).

Les interactions directes entre les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺

L'activation des lymphocytes T CD4⁺ requiert plusieurs signaux: l'interaction entre le TCR à la surface des cellules T et le complexe CMH II/antigène apprêté présent à la surface de la cellule présentatrice d'antigène (CPA) et des signaux costimulateurs. Cette co-stimulation peut soit simplement amplifier l'activation initiale en permettant une meilleure interaction TCR- complexe CMH II/antigène apprêté, soit promouvoir la prolifération, augmenter la survie cellulaire ou induire les fonctions effectrices des cellules T. Ces molécules co-stimulatrices sont des récepteurs appartenant à la superfamille des immunoglobulines (CD28, CD2, ICOS...) et à la superfamille des récepteurs au TNF (OX40, CD27, CD30...) dont les ligands sont présents à la surface des CPA activées. Par exemple, le CD28 interagit avec le CD80 ou le CD86, et l'OX40 interagit avec l'OX40L (Croft M., 2003).

En 1984, Phillips et ses collaborateurs ont montré que les cellules NK humaines activées expriment le CMH II (Phillips J.H. *et al.*, 1984). Ce n'est qu'en 1991 que des clones de cellules NK humains CD56^{bright} ou CD56^{dim} obtenus à partir de 3 donneurs ont été montrés capables d'apprêter l'antigène et de le présenter via leur CMH II (HLA-DR uniquement) aux lymphocytes T CD4⁺, induisant ainsi leur prolifération (Roncarolo M.G. *et al.*, 1991). Plus tardivement, les molécules de co-stimulation impliquées dans cette interaction ont été identifiées. Ainsi, l'activation des cellules NK par l'IL-12 et l'IL-15 induit l'expression du CD86, ligand du CD28. De plus, la stimulation des récepteurs activateurs CD16 et KIR induit l'expression d'OX40L sur les cellules NK préalablement activées par l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-15 (Zingoni A. *et al.*, 2004). L'interaction entre OX40 présent à la surface des cellules T activées et OX40L présent entre autre sur les CPA activées augmente plusieurs fonctions des cellules T, incluant la prolifération, la production de cytokines et l'amplification de la réponse T mémoire (Chen A.I. *et al.*, 1999; Croft M., 2003; Gramaglia I. *et al.*, 2000; Rogers P.R. *et al.*, 2001). Ainsi, les interactions entre les cellules T et les cellules NK via les couples CD28/CD86 et OX40/OX40L fournissent les signaux de co-stimulation nécessaires à la prolifération et à la production de cytokines par les cellules T CD4⁺ autologues (Zingoni A. *et al.*, 2004). *In vivo*, ces interactions pourraient avoir lieu dans les ganglions lymphatiques inflammés où les cellules T et NK sont colocalisées (Fehniger T.A. *et al.*, 2003).

L'expression du CMH II par les cellules NK murines activées a également été montrée, même si certaines équipes identifient ces cellules comme des IKDC (décrites dans le chapitre 1, A-1-d), et non des cellules NK. Ces cellules NK activées sont capables de présenter le peptide Dby à des lymphocytes T spécifiques et d'induire leur prolifération (Vosshenrich C.A. *et al.*, 2007). Outre les ganglions lymphatiques, ces interactions pourraient avoir lieu au niveau d'organes périphériques inflammés, tel que le foie où les cellules T et NK s'accumulent après une infection (Salazar-Mather T.P. *et al.*, 2000). Cependant physiologiquement, la fonction de présentation antigénique des cellules NK reste à démontrer.

ii. *Les interactions avec les lymphocytes T régulateurs (Treg)*

Les Treg naturels (nTreg) CD4⁺CD25⁺, suppresseurs des fonctions des cellules NK

La mise en évidence de la fonction suppressive

Plusieurs études ont montré que les nTreg sont capables d'inhiber fortement les fonctions effectrices des cellules NK. Ces études démontrent que, *in vitro*, la prolifération des cellules NK non activées ainsi que leur cytotoxicité vis-à-vis de cellules cibles tumorales sont significativement inhibées par les nTreg. En revanche, ces cellules sont incapables d'empêcher la production d'IFN- γ par les cellules NK activées par l'IL-2 et l'IL-15, alors qu'elles l'inhibent lorsque les cellules NK ont été activées par l'IL-12 (Ghiringhelli F. *et al.*, 2005). *In vivo*, la déplétion des nTreg par administration d'un anticorps déplétant anti-CD25 amplifie le rejet des cellules tumorales exprimant l'un des ligands du récepteur NKG2D (Rae-1) et réduit le nombre de métastases pulmonaires. Ces effets de la déplétion en nTreg sont dépendants des cellules NK puisqu'une déplétion de ces cellules abolit les effets positifs de la déplétion des nTreg (Smyth M.J. *et al.*, 2006). Un autre modèle tumoral murin (expression de Fas-L à la surface des cellules tumorales) confirme que la présence de cellules nTreg activées (anti-CD3) inhibe, alors que leur absence stimule, l'activité cytotoxique des cellules NK. De plus, la présence de nTreg réduit le nombre de cellules NK recrutées au niveau du site tumoral (Simon A.K. *et al.*, 2007). Dans un modèle d'immunothérapie tumorale avec le VSV (vesicular stomatitis virus, virus oncolytique), la déplétion en nTreg associée à l'administration d'IL-2 génère des cellules NK hyperréactives. *In vitro*, ces cellules sont cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales et produisent d'abondantes quantités d'IFN- γ après exposition à ces cellules tumorales. *In vivo*, ce traitement a plusieurs conséquences sur les cellules NK. Tout d'abord, le syndrome de fuite vasculaire non toxique dépendant des cellules NK est augmenté, permettant ainsi un meilleur accès à la tumeur. De plus, ce traitement mène à une activité cytolytique directe et à une sécrétion de métalloprotéinases par les cellules NK qui perturbent l'architecture de la tumeur facilitant la propagation et la réplication virale à l'intérieur de la tumeur (Kottke T. *et al.*, 2008). Lors d'une greffe allogénique de moelle osseuse, la

déplétion en nTreg amplifie le rejet de la greffe, réduisant ainsi le taux de survie à long terme. Cette amplification du rejet est médiée par les cellules NK, puisque leur déplétion empêche le rejet de la greffe (Barao I. *et al.*, 2006).

La suppression par le TGF- β membranaire

Dans trois des études précédemment citées, le TGF- β est responsable de la suppression des fonctions effectrices des cellules NK (Barao I. *et al.*, 2006; Ghiringhelli F. *et al.*, 2005; Smyth M.J. *et al.*, 2006). Le TGF- β peut être soit fixé à la membrane des nTreg, soit sécrété. Dans deux des études, la suppression des fonctions effectrices des cellules NK est attribuée au TGF- β fixé à la membrane (Ghiringhelli F. *et al.*, 2005; Smyth M.J. *et al.*, 2006). En effet, lors d'une coculture de cellules NK avec des cellules nTreg, aucune sécrétion de TGF- β n'est détectée (Ghiringhelli F. *et al.*, 2005). De plus, lorsque des nTreg activés (anti-CD3/CD28) sont séparés des cellules NK et des cellules tumorales par un transwell, aucune suppression de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales n'est observée. De même, le surnageant de cellules nTreg activées n'a aucun effet inhibiteur sur cette cytotoxicité (Smyth M.J. *et al.*, 2006). La troisième étude, quant à elle, ne dissocie pas les deux formes (Barao I. *et al.*, 2006). A la suite d'une coculture nTreg/NK, le TGF- β est également responsable de la diminution de l'expression du récepteur NKG2D à la surface des cellules NK (Ghiringhelli F. *et al.*, 2005).

La fonction cytotoxique des nTreg

Les cellules nTreg activées expriment le granzyme A mais très peu de granzyme B et sont cytotoxiques vis-à-vis de cellules cibles autologues (cellules CD4⁺, CD8⁺ ou CD14⁺). Cette cytotoxicité est dépendante de la perforine (Grossman W.J. *et al.*, 2004). Dans un modèle murin, il a été montré que le granzyme B et la perforine libérés par les nTreg sont responsables de la mort des cellules NK mais aussi des T CD8⁺ au niveau du site tumoral (Cao X. *et al.*, 2007).

Le contrôle du développement et de l'accumulation des cellules NK dans les ganglions lymphatiques

Chez la souris, des interactions NK/nTreg peuvent également avoir lieu au niveau des organes lymphoïdes secondaires en condition basale. En absence de nTreg, les nombres de DC et de cellules NK1.1⁺ sont augmentés dans la rate et les ganglions lymphatiques (Kim J.M. *et al.*, 2007), suggérant une augmentation des cellules NK et/ou NKT. Une étude ultérieure a montré qu'en condition basale les nTreg contrôlent le dialogue croisé entre les cellules NK et les DC dans les ganglions lymphatiques. La déplétion en nTreg conduit également à une augmentation du pourcentage et du nombre absolu de cellules NK dans les ganglions lymphatiques. Cette accumulation n'est pas due à un recrutement des cellules NK mais à leur prolifération suite à la *trans*-présentation de l'IL-15R α par les DC. En effet,

en condition basale et en absence de nTreg, les DC résidentes expriment l'IL-15R α dont l'expression est dépendante du TGF- β (Terme M. *et al.*, 2008). L'étude de Giroux et de ses collaborateurs confirme la nécessité et la suffisance des nTreg dans la prévention de l'accumulation des cellules NK dans les ganglions lymphatiques en condition basale; les nTreg contrôlant la différenciation des NKp en cellules NK. En revanche, dans la rate, les nTreg n'ont aucune influence sur la différenciation des NKp en cellules NK. Ceci pourrait s'expliquer par les différences de localisation des NKp et des nTreg entre ces deux organes. En effet, dans les ganglions lymphatiques, les NKp sont principalement localisés dans les aires de cellules T où la plupart des nTreg sont localisés. En revanche, dans la rate, la plupart des cellules NK sont localisées dans la pulpe rouge donc à l'extérieur des zones de cellules T (Giroux M. *et al.*, 2007).

Les cellules NK, suppresseurs des Treg

L'inhibition de la génération de Treg

Les cellules NK activées peuvent inhiber l'induction de réponses tolérogènes. Chez l'homme, dans un système de coculture autologue *in vitro*, les cellules NK activées par l'IL-2 empêchent l'expression du facteur de transcription Foxp3 par cellules T CD4⁺CD25⁻ activées par des microbilles anti-CD3/CD28, empêchant ainsi leur conversion en Treg. Après restimulation de ces cellules T CD4⁺ avec des microbilles anti-CD3/CD28, celles-ci prolifèrent fortement et produisent de grandes quantités d'IFN- γ , initiant ainsi une polarisation Th1. Le facteur responsable de l'inhibition de l'induction de Foxp3 est l'IFN- γ produit par les cellules NK activées. En effet, une exposition des cellules T CD4⁺CD25⁻ au surnageant des cellules NK activées avant leur stimulation avec les microbilles anti-CD3/CD28 inhibe l'induction de Foxp3. De plus, une coculture de cellules NK activées avec des cellules T CD4⁺CD25⁻ en présence d'anticorps neutralisant anti-IFN- γ et de microbilles anti-CD3/CD28 restaure en partie l'induction de Foxp3. Néanmoins, l'IFN- γ ne modifie pas l'expression de Foxp3 dans les cellules déjà différenciées CD4⁺CD25⁺. De même, chez la souris, les cellules NK activées par l'IL-2, et plus précisément l'IFN- γ produit par ces cellules, empêchent également la conversion des cellules T CD4⁺CD25⁻ en Treg (Brillard E. *et al.*, 2007).

La lyse des Treg

Outre leur effet sur la génération de Treg, les cellules NK activées sont capables de lyser les Treg qui se développent en réponse à un pathogène intracellulaire. Chez l'homme, une coculture autologue de monocytes avec des cellules T CD4⁺ issus de patients réactifs à la tuberculine en présence de lysat tuberculinique conduit à la génération de cellules T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. En revanche, la présence dans cette coculture de cellules NK activées soit par la combinaison IL-12+IL-15+IL-18, soit par le lysat tuberculinique inhibe fortement la génération des Treg. Les cellules NK non activées, quant à elles,

n'affectent pas la génération de ces Treg (Roy S. *et al.*, 2008). Contrairement à l'étude de Brillard et ses collaborateurs (Brillard E. *et al.*, 2007), l'inhibition de l'expansion des Treg n'est pas médiée par l'IFN- γ puisque l'ajout d'un anticorps anti-IFN- γ ne restaure absolument pas cette expansion. En revanche, les cellules NK activées (combinaison de cytokines) lysent les Treg générés à la suite de la coculture monocytes/T CD4⁺ en présence du lysat tuberculique, mais ne lysent pas les nTreg (CD4⁺CD25⁺) fraîchement isolés. Les récepteurs exprimés par les cellules NK et l'un des ligands à la surface des Treg responsables de cette lyse ont été identifiés. Ainsi, les cellules NK activées par la combinaison de cytokines ont une expression augmentée des récepteurs activateurs NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4 et CD16. Les cellules NK activées ne lysent pas les Treg générés à la suite de la coculture monocytes/T CD4⁺ lorsque des anticorps anti-NKp46 ou anti-NKG2D sont ajoutés. En revanche, des anticorps anti-DNAM-1, anti-2B4 ou anti-CD16 n'ont aucun effet, n'impliquant ainsi que le NKp46 et le NKG2D dans la lyse des Treg. Au niveau des Treg générés à la suite de la coculture monocytes/T CD4⁺, les ligands du NKG2D (ULBP1-3 et MICA/B), et plus particulièrement ULBP1 sont augmentés à leur surface comparativement aux nTreg fraîchement isolés et aux cellules T CD4⁺CD25⁻. La présence d'anticorps anti-ULBP1 inhibe fortement la lyse par les cellules NK des Treg, alors que des anticorps dirigés contre les autres ligands (anti-ULBP2, anti-ULBP3 ou anti-MICA/B) n'ont aucun effet, suggérant ainsi l'implication d'ULBP1 dans la lyse des Treg. Concernant l'expression des molécules de CMH I à la surface des Treg générés à la suite de la coculture monocytes/T CD4⁺, aucune modification n'est observée (Roy S. *et al.*, 2008).

CHAPITRE 2: L'ASTHME ALLERGIQUE

Introduction

Données épidémiologiques

Les pathologies allergiques sont des réactions d'hypersensibilité entraînant différents symptômes en fonction de l'organe exposé à l'allergène. Parmi celles-ci se trouvent l'asthme allergique, la rhinite allergique, la dermatite atopique, le choc anaphylactique et les allergies alimentaires. Des études épidémiologiques montrent une recrudescence importante de ces pathologies durant les vingt dernières années, et ce notamment dans les pays industrialisés. Ainsi, par exemple, en France, l'augmentation est d'environ 25% tous les 10 ans et on estime qu'environ 50% d'enfants seront allergiques en 2015. Parmi les maladies allergiques, l'asthme constitue un problème important de santé publique du fait de son augmentation de fréquence, de sa mortalité et de l'augmentation de sa sévérité (50% d'asthmes persistants), entraînant ainsi un surcoût socio-économique. En France, on note 3,5 millions d'asthmatiques, avec une prévalence nationale de 5,8% et une prévalence dans la région Nord Pas-de-Calais plus élevée à 6,7%. L'augmentation d'une génération à l'autre a été de 40%. L'asthme touche davantage les milieux socio économiques défavorisés (Com-Ruelle L. *et al.*, 2000) et la mortalité par l'asthme en France était chiffrée aux alentours de 1000 en 2004 (*d'après le Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (INSERM). Effectifs des décès dus à l'asthme*).

Notions sur les allergènes

Les allergènes sont des antigènes capables d'induire sous certaines conditions la synthèse d'IgE chez les individus prédisposés et de se lier spécifiquement à ces molécules d'IgE fixées à la surface des cellules effectrices, déclenchant ainsi la réaction allergique.

Globalement, les allergènes sont divisés en cinq types : les pneumallergènes, les trophallergènes, les allergènes de contact, les allergènes médicamenteux et les venins d'hyménoptères. Les pneumallergènes, véhiculés par l'air, comprennent principalement les acariens de la poussière de maison (*Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae*), les pollens végétaux (ambrosie, cyprès, bouleau, platane) et les allergènes d'animaux (poils et squames d'animaux tels que les chiens et chats), mais également les moisissures et les débris d'insectes dans les habitats humides. Ces pneumallergènes entraînent généralement des manifestations respiratoires, conjonctivales ou oculaires. Les trophallergènes sont présents dans de nombreux aliments (œufs, lait, poissons, crustacés, arachide...) et sont responsables de manifestations digestives mais

également respiratoires et cutanées. Les allergènes de contact, tel que le latex, causent majoritairement des réactions allergiques cutanées mais peuvent dans certains cas provoquer de l'asthme et des chocs anaphylactiques. Les allergies médicamenteuses (antibiotiques, certains anesthésiques) vont de la simple réaction urticarienne au choc anaphylactique. Les venins d'hyménoptères peuvent induire des réactions allergiques violentes comme le choc anaphylactique et l'œdème de Quincke.

A. LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ASTHME ALLERGIQUE

L'asthme est une maladie chronique des voies respiratoires dont les symptômes majeurs sont des accès de dyspnées aiguës, sifflantes, souvent nocturnes, récidivantes et réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement (1987). Ces accès sont couramment appelés crises d'asthme. L'installation de l'inflammation pulmonaire conduit à un rétrécissement du calibre des bronches limitant la capacité respiratoire et entraînant leur sensibilité accrue. De nombreux stimuli sont à l'origine de la crise d'asthme. En effet, outre le contact avec l'allergène, les sujets touchés acquièrent une sensibilité accrue à des facteurs non spécifiques tels que la fumée de tabac, l'air froid et les irritants chimiques (Delfino R.J., 2002).

1. La caractérisation de l'asthme allergique

L'asthme allergique est caractérisé par:

- un infiltrat polymorphe (Beasley R. *et al.*, 1989) comprenant des éosinophiles (Bousquet J. *et al.*, 1990), mais également des cellules T, des mastocytes et des neutrophiles au niveau de la muqueuse pulmonaire. Cette inflammation est présente à un stade précoce de la maladie et est souvent associée à un remodelage des voies respiratoires, caractérisé par une destruction de l'épithélium, du muscle lisse et une altération de la prolifération microvasculaire et de la matrice.

- une obstruction diffuse, variable et réversible (McFadden E.R., Jr. and Gilbert I.A., 1992). Le rétrécissement des voies aériennes est en rapport avec une contraction excessive du muscle lisse bronchique, un œdème sous-muqueux et une hypersécrétion de mucus.

- le développement d'une hyperréactivité bronchique (HRB) non spécifique (agent bronchoconstricteur) et spécifique vis-à-vis de l'allergène (Juniper E.F. *et al.*, 1978), causée par une grande variété de mécanismes associés à l'inflammation des voies aériennes.

- des taux sériques d'IgE totales supérieures à 100 KU/l et des pricks tests cutanés positifs.

2. Les phases de la réaction allergique: la phase de sensibilisation et la phase effectrice

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

a. La phase de sensibilisation à l'allergène: Synthèse d'IgE et leur fixation sur les récepteurs FcεRI

Les DC résidant au niveau de l'épithélium bronchique capturent l'allergène inhalé conduisant ainsi à sa maturation. Lors de ce processus de maturation, les DC acquièrent l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 permettant ainsi leur migration vers les ganglions drainant les poumons et augmentent leur expression de molécules de CMH II et de molécules de costimulation (CD80 et CD86 par exemple) impliquées dans la réponse lymphocytaire. Les DC matures interagissent alors avec les lymphocytes T naïfs présents dans les ganglions, initiant une réponse immune primaire de profil Th2. Les lymphocytes Th2 produisent alors des cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) et parmi celles-ci l'IL-4 et l'IL-13 conduisent à la production d'IgE par les lymphocytes B. Les IgE se fixent sur les mastocytes et les basophiles via le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI) exprimés à leur surface (Hammad H. and Lambrecht B.N., 2008; Larche M. *et al.*, 2006; Wills-Karp M., 1999) (Figure 16). Cette phase de sensibilisation se déroule chez les sujets prédisposés à la fois par leur patrimoine génétique et leur environnement.

i. Les IgE et leur synthèse

Les IgE sériques ont une demi-vie courte (2,5 jours) et sont présentes à de faibles concentrations chez l'adulte normal (<100 ng/ml). En revanche, lorsqu'elles sont fixées à leurs récepteurs de haute affinité (FcεRI), leur demi-vie est augmentée car cette fixation les protège des protéases sériques. Par exemple, les IgE peuvent persister plusieurs mois à la surface des mastocytes. D'un point de vue structural, similairement aux différentes classes d'Ig, les IgE sont composées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes lourdes contiennent quatre domaines constants (Cε1-Cε4) et un domaine variable et les chaînes légères un domaine constant et un domaine variable. Elles sont produites par les lymphocytes B activés lors de la commutation isotypique. Cette dernière consiste en un changement de classe des domaines constants des chaînes lourdes sans affecter le domaine variable et donc la spécificité vis-à-vis de l'antigène (Gould H.J. and Sutton B.J., 2008).

La commutation isotypique vers les IgE

Après la différenciation Th2 induite par les DC, les lymphocytes Th2 produisant l'IL-4 et l'IL-13 interagissent avec des lymphocytes B (cellules Th2) (Galli S.J. *et al.*, 2008). La production de cytokines Th2 et l'interaction CD40-Ligand (CD40L) (cellules T) / CD40 (cellule B) sont toutes deux indispensables à la transcription des gènes codant C ϵ et donc à la production d'IgE (Bacharier L.B. and Geha R.S., 2000; Galli S.J. *et al.*, 2008). Outre les DC, les lymphocytes B peuvent jouer le rôle de CPA. Plus précisément, l'allergène se fixe sur les IgM spécifiques présents à la surface des lymphocytes B naïfs. Les complexes IgM/allergène sont alors internalisés, l'allergène apprêté et les fragments antigéniques couplés au CMH II transitent jusqu'à la surface du lymphocyte B. Ces complexes CMH II/antigènes apprêtés sont alors reconnus par les TCR des lymphocytes T. A la suite de cette interaction, les lymphocytes T activés produisent de l'IL-4 et/ou de l'IL-13 et expriment le CD40L qui interagit avec le CD40 présent à la surface du lymphocyte B, permettant ainsi la production d'IgE (Bacharier L.B. and Geha R.S., 2000). Une partie des lymphocytes B sécrète alors les IgE et sont appelés plasmocytes, alors qu'une autre partie ne les sécrète pas mais les exprime à leur surface. Ces derniers constituent les lymphocytes B mémoire. Les IgE ainsi sécrétées se fixent notamment sur le Fc ϵ RI présent à la surface des mastocytes et des basophiles (Larche M. *et al.*, 2006).

ii. Les récepteurs aux IgE

Le Fc ϵ RI, récepteur de haute affinité pour les IgE

Ce récepteur de forte affinité pour les IgE est exprimé sous la forme du tétramère $\alpha\beta\gamma_2$ à la surface des mastocytes et des basophiles et sous la forme du trimère $\alpha\gamma_2$ sur diverses cellules humaines incluant les DC, les cellules de Langerhans, les monocytes, les éosinophiles, les plaquettes et les cellules musculaires lisses (Bieber T. *et al.*, 1992; Gould H.J. and Sutton B.J., 2008; Gounni A.S. *et al.*, 1994). Les deux domaines extracellulaires de la chaîne α (α_1 et α_2) fixent les IgE et plus particulièrement les domaines C ϵ_3 , alors que les domaines intracellulaires des chaînes β et γ contiennent les motifs ITAM nécessaires à la transduction du signal (Gould H.J. and Sutton B.J., 2008).

Le Fc ϵ RII, récepteur de faible affinité pour les IgE

Egalement nommé CD23, ce récepteur de faible affinité pour les IgE appartient à la superfamille des lectines de type C. La forme fixée à la membrane contient trois domaines de «tête» extracellulaires espacés de la membrane par un «pédoncule» composé de trois hélices α enroulées. Cette région est

sensible à la protéolyse, induisant ainsi la libération de fragments solubles variés (CD23 solubles) dont l'activité fonctionnelle est dépendante de leur statut oligomérique. La principale protéase endogène responsable de ce clivage est l'ADAM10 (Gould H.J. and Sutton B.J., 2008; Lemieux G.A. *et al.*, 2007; Weskamp G. *et al.*, 2006). Le CD23 membranaire est exprimé sous deux isoformes en fonction de la séquence intracellulaire N-terminale : le CD23a et le CD23b. Le CD23a est exprimé par les cellules B activées par l'antigène avant leur différenciation en plasmocytes, alors que l'expression de CD23b est induite par l'IL-4 sur une variété de cellules incluant les macrophages, les monocytes, les éosinophiles, les cellules de Langerhans, les lymphocytes T, les cellules B et les cellules épithéliales. La fixation des IgE sur le CD23 est indépendante du domaine carbohydre du CD23. Le CD23 via son domaine carbohydre lie le CD21, exprimé sur les lymphocytes B, les lymphocytes T activés et les basophiles. Au niveau du lymphocyte B, cette fixation joue un rôle crucial dans la régulation de la synthèse des IgE (Gould H.J. and Sutton B.J., 2008).

b. La phase effectrice

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

La réaction immédiate se déroule dans les 20 minutes suivant l'exposition à l'allergène. Celle-ci se caractérise par une obstruction bronchique marquée due à un spasme du muscle lisse bronchique, une sécrétion de mucus et un œdème de chorion. D'un point de vue mécanistique, l'allergène se fixe sur les complexes FcεRI/IgE présents à la surface des mastocytes luminaux ou intra-épithéliaux, entraînant la dimérisation des récepteurs pour les IgE. Cette dernière est indispensable à la transduction du signal aboutissant à la libération de médiateurs préformés et néoformés aux propriétés vasoactives et/ou chimiotactiques (histamine, prostaglandines (PG), leucotriènes (LT), Platelet-Activating Factor (PAF), chimiokines et cytokines). Ces derniers induisent une vasodilatation et une bronchoconstriction et augmentent la production de mucus par les cellules caliciformes et la perméabilité vasculaire. Outre leur rôle dans la réaction immédiate, les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement de cellules inflammatoires de par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales vasculaires (via le TNF-α par exemple) et la libération de facteurs chimiotactiques (LTB4, PGD2, CXCL8 et CCL2) (Figure 17). La transduction du signal aboutit également à la production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance impliqués dans la pathogénèse des réactions allergiques.

La réaction retardée apparaît 2 à 6 heures après l'exposition à l'allergène. Elle est essentiellement liée à une inflammation de la muqueuse caractérisée par un afflux d'éosinophiles, de lymphocytes et de basophiles. Ces cellules libèrent à leur tour des substances pro-inflammatoires cytotoxiques, telles

que les protéines des granules des éosinophiles (Major Basic Protein (MBP), Eosinophil Cationic Protein (ECP), Eosinophil Peroxydase (EPO)), responsables de la destruction de l'épithélium et de l'inflammation de la sous-muqueuse diminuant alors le diamètre des voies aériennes. Les sous-populations lymphocytaires T auxiliaires majoritairement Th2 interviennent dans le recrutement des cellules effectrices et dans l'activation de l'épithélium bronchique (Figure 18). Cette inflammation est chronique et aboutit à long terme à une modification de l'architecture des voies respiratoires, également nommée remodelage bronchique. Ce dernier se caractérise par la desquamation de l'épithélium, une métaplasie des cellules caliciformes, un épaissement de la membrane basale et une hyperplasie des cellules musculaires lisses (Galli S.J. *et al.*, 2008).

B. LES PRINCIPAUX MEDIATEURS CELLULAIRES DE LA REACTION INFLAMMATOIRE ALLERGIQUE

Lors de la phase de sensibilisation, chez les sujets allergiques, les DC induisent une polarisation lymphocytaire Th2 aboutissant à la synthèse d'IgE par le lymphocyte B. Ici, nous décrivons les DC et les lymphocytes T effecteurs. Les lymphocytes B ont un rôle primordial dans l'initiation de la réaction inflammatoire allergique puisqu'ils sont à l'origine de la production d'IgE. Néanmoins, la production et la sécrétion d'IgE par les lymphocytes B ayant été mentionnées dans le paragraphe précédent (Chapitre 2, A-2-a-i), les lymphocytes B ne seront pas abordés dans cette partie. Nous décrivons également les lymphocytes Th17 et leur rôle ambigu dans l'asthme allergique, ainsi que les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces derniers ne sont pas des effecteurs de la réaction inflammatoire allergique, mais des régulateurs faisant défaut chez les sujets allergiques.

Concernant la phase effectrice, nous nous intéresserons aux mastocytes, aux éosinophiles, aux basophiles, aux macrophages alvéolaires, aux neutrophiles et aux cellules NKT. Néanmoins, d'autres cellules telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les fibroblastes ou encore les cellules musculaires lisses participent également à l'inflammation essentiellement par leur sécrétion de cytokines et de chimiokines.

Plusieurs arguments étant en faveur d'une implication des cellules NK dans la réaction pulmonaire allergique, un dernier paragraphe leur sera consacré.

1. Les cellules dendritiques

Les DC, et plus particulièrement les mDC sont des CPA professionnelles intervenant dans les processus d'immunosurveillance au niveau des interfaces de l'organisme avec le milieu extérieur, constituant ainsi de véritables sentinelles. En effet, elles colonisent les épithéliums de revêtement comme la peau, l'épithélium intestinal ou encore l'épithélium bronchique. Ces cellules sont caractérisées par un potentiel migratoire très important. Ainsi, elles migrent jusqu'aux muqueuses

via la circulation sanguine, où elles capturent et apprêtent l'antigène. Ces DC activées migrent alors vers les ganglions drainants où elles présentent les peptides antigéniques (issus de l'apprêtement de l'antigène) aux lymphocytes T, initiant ainsi la réponse immune adaptative (Banchereau J. *et al.*, 2000).

a. Les DC pulmonaires

Chez la souris, différentes sous-populations de DC ont été caractérisées en fonction de l'expression du marqueur myéloïde CD11b et de leur localisation. La lamina basale de l'épithélium bronchique et les artéριοles possèdent un réseau bien développé de DC intraépithéliales, et ce même en condition basale. D'un point de vue phénotypique, 95% de ces cellules sont I-A^{high}CD11c⁺CD11b^{low-int}CD103⁺langerin⁺ et 5% I-A^{high}CD11c⁺CD11b^{high}CD103⁺langerin⁺. De plus, ces DC expriment les protéines de jonctions serrées claudine-1, claudine-7 et ZO-2, leur permettant d'ouvrir les jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Ainsi, les cellules peuvent envoyer leurs dendrites ou migrer à travers l'épithélium bronchique, où elles peuvent sonder le contenu de la lumière bronchique et capturer l'antigène, et ceci tout en préservant l'intégrité de l'épithélium (Sung S.S. *et al.*, 2006). Les mDC CD11b^{high}CD11c⁺CD103⁻ sont présentes au niveau de la sous-muqueuse, et plus particulièrement en conditions inflammatoires. Les DC présentes le long de la paroi alvéolaire peuvent capturer l'ovalbumine (OVA) ou des spores d'anthrax bactériens inhalés par formation d'extensions intra-alvéolaires et ensuite migrer vers les ganglions médiastinaux de façon CCR7-dépendante (Cleret A. *et al.*, 2007; del Rio M.L. *et al.*, 2007; Kool M. and Lambrecht B.N., 2007; Wikstrom M.E. and Stumbles P.A., 2007). Les pDC CD11b⁻CD11c^{int}PDCA-1⁺ sont, quant à elles, principalement trouvées dans l'intersticium pulmonaire et produisent de grandes quantités d'IFN- α en réponse à une infection virale ou à une stimulation avec des CpG (Kool M. and Lambrecht B.N., 2007). Les pDC semblent capables de capturer un antigène inhalé. Néanmoins, cette fonction est controversée. En effet, dans une étude, 24 à 48 heures après l'inhalation d'un antigène fluorescent, 50 à 60% des pDC sont positives pour l'antigène (de Heer H.J. *et al.*, 2004), alors que dans une autre étude seul un très faible pourcentage le capture (Kool M. and Lambrecht B.N., 2007). Chez l'homme, les mDC et les pDC sont également retrouvées dans les poumons en condition basale (Demedts I.K. *et al.*, 2005; Masten B.J. *et al.*, 2006).

b. Les DC et l'orientation de la réponse immune

Selon le degré de maturité, le profil de sécrétion cytokinique ou leur nombre, les DC n'induisent pas le même type de réaction. Par exemple, *in vitro*, à un faible ratio mDC/cellules T (1:300), les mDC induisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2. En revanche, un fort ratio mDC /cellules T (1:4) favorise le développement d'une réponse mixte Th1/Th2 (Tanaka H. *et al.*,

2000). La nature des molécules costimulatrices et l'environnement cytokinique sont également primordiaux pour l'orientation de la réponse immunitaire.

i. La différenciation Th1/Th2

Les molécules costimulatrices

L'engagement du lymphocyte T avec la CPA est tout d'abord conditionné par la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique exprimé à la surface de la CPA par le TCR du lymphocyte T. La durée de stimulation est déterminante pour le lymphocyte T puisqu'elle conditionne son niveau d'activation, sa différenciation et/ou sa mort (Lanzavecchia A. *et al.*, 1999). C'est pourquoi, des co-sigaux sont nécessaires à l'activation complète de la cellule T qui est alors notamment capable de proliférer et de se différencier (Croft M., 2003).

L'engagement du TCR induit l'expression du CD40L à la surface de la cellule T, interagissant alors avec le CD40 exprimé à la surface de DC. Cette interaction conduit à l'expression de molécules de costimulation de la famille B7 à la surface des DC, et plus particulièrement du CD80 et du CD86 (Banchereau J. *et al.*, 2000; Jaiswal A.I. *et al.*, 1996), interagissant avec le CD28 ou le CTLA-4 présent à la surface des lymphocytes T (Banchereau J. *et al.*, 2000; Elgueta R. *et al.*, 2009; Jaiswal A.I. *et al.*, 1996). Alors que l'interaction entre le CTLA-4 et le CD80 ou CD86 induit un cosignal inhibiteur, les interactions CD28/CD80 et CD28/CD86 sont costimulatrices (Elgueta R. *et al.*, 2009). Bien que ces deux interactions ne soient pas associées à un profil particulier (MacPhee I.A. *et al.*, 2001), elles sont toutes deux indispensables au développement d'une réponse Th2 que ce soit *in vitro* (Balbo P. *et al.*, 2001; Broeren C.P. *et al.*, 2000) ou *in vivo* (Mark D.A. *et al.*, 2000).

La DC exprime l'Ox40-Ligand (OX40L) soit constitutivement, soit à la suite de l'interaction CD40/CD40L (Murata K. *et al.*, 2000; Ohshima Y. *et al.*, 1997). L'Ox40 est exprimé sur les lymphocytes T helpers activés et sur les Treg. *In vitro*, l'interaction OX40/OX40L est nécessaire au développement de la réponse Th2 puisque des anticorps bloquants anti-OX40L inhibent fortement l'induction de lymphocytes Th2 par les DC maturées avec du SEA (de Jong E.C. *et al.*, 2002) ou de la Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) (Ito T. *et al.*, 2005). Une étude plus récente a montré que, *in vivo*, cette interaction n'est pas nécessaire à l'induction de la polarisation Th2 en elle-même, mais favorise la prolifération et la survie à long terme des lymphocytes Th2 (Jenkins S.J. *et al.*, 2007).

Les cytokines impliquées

Elles peuvent provenir de différentes sources cellulaires activées incluant les DC et les cellules épithéliales. Les DC sont capables de produire des cytokines impliquées dans la polarisation lymphocytaire telles que l'IL-12, IL-18, l'IL-27, l'IL-6 et l'IL-25.

L'IL-12, l'IL-18 et l'IL-27 favorisent la polarisation Th1. L'IL-12 induit la production d'IFN- γ par les lymphocytes T tout en inhibant la production d'IL-4 (Manetti R. *et al.*, 1993; Murphy E.E. *et al.*, 1994; Wu C.Y. *et al.*, 1993). L'IL-18 agit de concert avec l'IL-12 dans la maturation et la production d'IFN- γ par les lymphocytes T (Okamura H. *et al.*, 1995). En synergie avec d'autres cytokines, l'IL-18 peut également avoir des effets pro-Th2 (Nakanishi K. *et al.*, 2001; Nakanishi K. *et al.*, 2001). Les effets pro-Th1 et pro-Th2 de l'IL-18 seront décrits ultérieurement (Chapitre 2, C-1-b-i). L'IL-27 contribue à l'orientation de la réponse immune vers un profil Th1 (Smits H.H. *et al.*, 2004).

L'IL-6 et l'IL-25, quant à elles, induisent préférentiellement une réponse Th2. L'IL-6 inhibe la production d'IL-12 favorisant ainsi une polarisation Th2 (Dodge I.L. *et al.*, 2003) et l'IL-25 promeut des réponses Th2 en induisant la production de cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Fort M.M. *et al.*, 2001).

La TSLP joue également un rôle essentiel dans la polarisation lymphocytaire par activation des DC. L'expression de l'ARNm de cette cytokine est retrouvée dans divers types cellulaires incluant les cellules épithéliales bronchiques non activées, les fibroblastes pulmonaires non activés, les cellules musculaires lisses bronchiques activées ou non (IL-4, IL-13, TNF- α) et les mastocytes activés via leurs récepteurs aux IgE (Soumelis V. *et al.*, 2002). Les basophiles activés par l'allergène produisent aussi la TSLP (Sokol C.L. *et al.*, 2007). Les mDC activées par la TSLP présentent une expression membranaire accrue des molécules de CMH II, CD40, CD80, CD86, CD83, OX40L et produisent les chimiokines CCL17 et CCL22 (deux chimiokines impliquées dans la réaction pulmonaire allergique) (Ito T. *et al.*, 2005; Soumelis V. *et al.*, 2002). Les mDC stimulées par la TSLP interviennent également dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ allogéniques en lymphocytes Th2 produisant les cytokines Th2 classiques (IL-4, IL-5 et IL-13), mais également de grandes quantités de TNF- α et de faibles quantités d'IFN- γ et d'IL-10 (Soumelis V. *et al.*, 2002). Les DC activées par la TSLP induisent aussi la différenciation des lymphocytes T CD8⁺ en cellules effectrices peu cytotoxiques produisant de l'IL-5 et de l'IL-13 (Gilliet M. *et al.*, 2003). Similairement à l'homme, les mDC murines stimulées par la TSLP mûrissent et induisent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en cellules Th2 (Al-Shami A. *et al.*, 2005; Zhou B. *et al.*, 2005).

ii. La différenciation des Treg

Normalement, l'inhalation d'une protéine antigénique inoffensive (les aéroallergènes par exemple) induit une tolérance immunologique dans les poumons. Chez la souris, cette tolérance immunologique est observée après l'inhalation d'OVA. Lorsque l'antigène est administré la première fois en présence d'un adjuvant Th2 (alum), cette tolérance est rompue et une réponse immunologique menant à une inflammation se met en place (de Heer H.J. *et al.*, 2004). Néanmoins, cette tolérance peut être restaurée à la suite d'expositions prolongées à l'OVA (Van Hove C.L. *et al.*, 2007). La tolérance est en partie liée à l'élimination des cellules T réactives de l'antigène et à l'induction et/ou l'expansion de Treg dans les ganglions médiastinaux (Akbari O. *et al.*, 2002; Hintzen G. *et al.*, 2006; Ostroukhova M. *et al.*, 2004; Van Hove C.L. *et al.*, 2007).

Les pDC induisent la génération de Treg. En effet, *in vitro*, des lymphocytes T CD4⁺ naïfs précultivés avec des pDC isolées de souris ayant reçu une inhalation d'OVA empêchent la prolifération de cellules T CD4⁺ naïves induites par des splénocytes activés par l'OVA (de Heer H.J. *et al.*, 2004). Dans les ganglions drainants, le développement de Treg IL-10⁺ induit par des DC productrices d'IL-10 est dépendant de l'interaction ICOS/ICOS-L (Akbari O. *et al.*, 2002). Les pDC activées expriment le ligand du Glucocorticoid-Inducible TNF Receptor (GITR) et les CD86/CD80 dont les ligands respectifs GITR et CTLA-4 sont exprimés par les cellules Treg. Les interactions GITR-Ligand/GITR, CD80/CTLA-4 et CD86/CTLA-4 activent l'enzyme Indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les pDC (Grohmann U. *et al.*, 2007). L'activation de l'IDO conduit à la dégradation du tryptophane (acide aminé essentiel) en divers catabolites incluant la kynurénine. La privation en tryptophane par elle-même ainsi que la kynurénine inhibent la prolifération des lymphocytes effecteurs et augmentent leur apoptose, alors qu'elles augmentent la formation de lymphocytes Treg (Curti A. *et al.*, 2009).

Des DC tolérogéniques produisant de grandes quantités d'IL-10 ont été mises en évidence. *In vitro*, elles sont induites par des cytokines immunomodulatrices (IL-10, TGF- β), par certains pathogènes ou allergènes, par des antigènes tumoraux, par des protéines endogènes (telle que la ferritine) ou par des immunosuppresseurs (dexaméthasone et vitamine D3) (Wu K. *et al.*, 2007). De plus, les Treg naturels CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} du sang périphérique induisent des DC tolérogéniques via un mécanisme dépendant de l'IL-10. D'un point de vue phénotypique, outre l'augmentation d'expression de l'IL-10, elles sont caractérisées par une diminution de l'expression de l'HLA-DR et des molécules costimulatrices CD40 et CD80 (Nguyen K.D. *et al.*, 2009). Chez l'homme, une population de DC tolérogéniques (DC-10) a été mise en évidence dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes secondaires. Phénotypiquement, les DC-10 sont CD14⁺CD16⁺CD11c⁺CD11b⁺CD83⁺HLA-DR⁺CD1a⁻CD1c⁻ILT-2⁺ILT-3⁺ILT-4⁺HLA-G⁺ (Allan S.E. *et al.*, 2008). D'un point de vue fonctionnel, les DC

tolérogéniques sont capables d'induire la différenciation de certaines sous-populations de Treg (Treg naturels et Tr1), l'apoptose et l'anergie des lymphocytes T effecteurs (Adler H.S. and Steinbrink K., 2007; Allan S.E. *et al.*, 2008; Wu K. *et al.*, 2007). L'induction des Tr1 par les cellules DC-10 requiert la production autocrine d'IL-10. Cette dernière induit l'expression des molécules tolérogéniques ILT-4 et HLA-G sur les DC-10 et augmente l'expression du HLA-G fixé à la membrane des cellules T. L'interaction entre l'ILT-4 et l'HLA-G est nécessaire à l'induction des Tr1 puisque l'addition d'anticorps neutralisant anti-ILT-4 ou anti-HLA-G l'inhibe partiellement (Allan S.E. *et al.*, 2008; Gregori S. *et al.*, 2009).

c. Mise en évidence des fonctions des DC dans la réaction pulmonaire allergique expérimentale

i. *L'induction de l'asthme expérimental par les DC*

L'injection par voie intratrachéale de mDC activées *in vitro* par l'OVA suivie de provocations à l'OVA ou trois transferts adoptifs de mDC activées *in vitro* par l'OVA induisent le développement d'un asthme expérimental (Lambrecht B.N. *et al.*, 2000; van Rijt L.S. *et al.*, 2005; van Rijt L.S. *et al.*, 2002), suggérant l'importance des mDC dans cette pathologie. De plus, dans des modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique, la déplétion des DC pulmonaires avant les provocations à l'OVA abroge l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (Lambrecht B.N. *et al.*, 1998; van Rijt L.S. *et al.*, 2005). La déplétion des DC CD11c⁺ pulmonaires lors d'une réaction pulmonaire allergique déjà établie diminue également l'inflammation pulmonaire allergique (van Rijt L.S. *et al.*, 2005).

Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez le rat, le nombre de DC au niveau de l'épithélium bronchique et de la sous-muqueuse est augmenté dans les deux premières heures suivant la dernière provocation à l'OVA et atteint son maximum à 24 heures (Huh J.C. *et al.*, 2003). Dans le modèle d'asthme expérimental induit par l'injection de mDC activées *in vitro* par l'OVA et de provocations ultérieures à l'OVA, le nombre de DC CMH II⁺CD11c⁺ est augmenté dans le sang périphérique, le LBA et les ganglions drainants et corrèle avec l'expansion des précurseurs myéloïdes hématopoïétiques CD31^{high}LyC6⁻ dans la moelle osseuse. Ces derniers se différencient *in vitro* en DC CMH II⁺CD11c⁺ en présence de GM-CSF, mais également en éosinophiles en présence d'IL-5. Ces cytokines étant présentes lors d'un asthme expérimental, l'augmentation du nombre de DC dans tous les compartiments analysés, mais également de celui d'éosinophiles, pourrait être attribuée à une différenciation accrue de leurs précurseurs (van Rijt L.S. *et al.*, 2002). Au niveau pulmonaire, après provocations à l'OVA, les DC CD11c⁺CMH-II⁺ sont activées (augmentation des molécules costimulatrices CD80, CD40, ICAM-1, PDL-1 et PDL-2) et sont colocalisées avec les lymphocytes T

CD4⁺ dans les infiltrats péribronchiques et périvasculaires, suggérant un rôle de ces DC dans le priming des lymphocytes T CD4⁺ activés ou mémoire (van Rijt L.S. *et al.*, 2005).

ii. Les DC et la tolérance dans l'asthme expérimental

Chez la souris, la tolérance serait induite par des DC qui ne présentent pas de hauts niveaux d'expression de CMH, de molécules d'adhérence et de molécules de costimulation (Kool M. and Lambrecht B.N., 2007). Concernant les mDC et les pDC, l'établissement de la tolérance immunologique vis-à-vis de l'antigène inhalé est attribué aux pDC puisque leur déplétion au moment de la première inhalation de l'antigène conduit à une réponse Th2 (présence d'IgE sériques, éosinophilie pulmonaire, hyperplasie des cellules caliciformes et production de cytokines Th2). De plus, le transfert adoptif de pDC pulsées à l'OVA avant la sensibilisation des souris avec de l'OVA en présence d'alum diminue très fortement le développement de la réponse Th2. D'un point de vue mécanistique, les pDC empêchent la génération de lymphocytes T effecteurs producteurs de cytokines induite par les mDC, sans pour autant affecter la prolifération des cellules T (de Heer H.J. *et al.*, 2004).

Dans un modèle murin de tolérance à l'allergène induit par une exposition prolongée à l'OVA, le nombre de mDC pulmonaires ainsi que leur expression de molécules co-stimulatrices diminuent. Ces modifications sont associées à la réduction de l'HRB et de l'inflammation pulmonaire allergique (éosinophilie pulmonaire, taux de cytokines Th2 et fibrose péribronchique). Les taux d'IL-10 sont, quant à eux, augmentés, suggérant l'intervention des Treg dans le développement de cette tolérance. L'inflammation est restaurée par l'administration de DC CD11b⁺ matures, suggérant l'importance de ces cellules dans l'inflammation et le remodelage bronchique (Koya T. *et al.*, 2006).

d. La caractérisation des DC chez les sujets allergiques

i. Les modifications quantitatives et phénotypiques des DC dérivées de monocytes (MD-DC), des mDC et des pDC

Chez les sujets asthmatiques, une provocation allergénique induit une rapide diminution du nombre de mDC circulantes CD33^{bright}CD14⁻CD16⁻HLA-DR⁺ (Upham J.W. *et al.*, 2002) et une augmentation de mDC mais également de pDC dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques 24 heures après une provocation allergénique (Bratke K. *et al.*, 2007). Outre les modifications quantitatives, des différences phénotypiques et fonctionnelles existent entre les sujets allergiques et les sujets non allergiques.

Chez les sujets allergiques à *Dermatophagoides pteronyssinus*, la stimulation par Der p 1 (un des allergènes majeurs de *Dermatophagoides pteronyssinus*) de DC dérivées de monocytes (MD-DC) induit une augmentation de l'expression du CD83 (marqueur de maturation) et du CD86 qui n'est pas observée chez les sujets contrôle (non allergiques ou allergiques à un allergène non relevant comme les graminées). En revanche, l'expression du CD80 n'est pas augmentée à la surface des MD-DC stimulées par Der p 1 de sujets allergiques à *Dermatophagoides pteronyssinus* alors qu'elle l'est chez les sujets contrôle (Hammad H. *et al.*, 2001).

Après stimulation par Der p 1, contrairement au mDC et pDC isolées du sang périphérique de sujets non allergiques, les mDC et pDC isolées du sang périphérique de sujets allergiques à Der p 1 ne présentent aucune augmentation de l'expression d'HLA-DR et des molécules de costimulation CD80 et CD86, suggérant un défaut de maturation des DC des sujets allergiques en réponse à l'allergène (Charbonnier A.S. *et al.*, 2003).

ii. Modifications fonctionnelles des MD-DC, des mDC et des pDC

Les MD-DC de sujets allergiques activées par Der p 1 produisent de grandes quantités de TNF- α , d'IL-1 β et d'IL-6 comparativement aux DC non activées. En revanche, chez les sujets non allergiques, seule une augmentation transitoire de la production de TNF- α et d'IL-6 est observée. Dans un système hétérologue, les MD-DC de sujets allergiques activées par Der p 1 induisent une meilleure prolifération des lymphocytes T comparativement aux MD-DC de sujets non allergiques activées par Der p 1. Dans un système autologue, les MD-DC de sujets allergiques activées par Der p 1 induisent la production d'IL-4 par les lymphocytes T, alors que chez les sujets contrôle les MD-DC activées par Der p 1 induisent la production d'IFN- γ (Hammad H. *et al.*, 2001).

Le rôle des mDC et des pDC chez les sujets allergiques semble plus complexe que ce qui est observé dans les modèles animaux d'asthme expérimental. Chez des sujets allergiques, *in vitro*, des pDC purifiées et pulsées avec des allergènes de pollen semblent plus efficaces que les mDC dans l'induction des réponses Th2 (prolifération des lymphocytes T CD4⁺ autologues et production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13)). Néanmoins, les pDC activées avec les allergènes de pollen induisent aussi la production d'IFN- γ par les lymphocytes T autologues (Farkas L. *et al.*, 2004). Chez les sujets allergiques, les mDC stimulées par Der p 1 ne produisent pas d'IL-10 contrairement aux mDC de sujets non allergiques. Après coculture avec des mDC de sujets allergiques stimulées par Derp 1, les lymphocytes T CD4⁺ allogéniques produisent une grande quantité d'IFN- γ , alors que chez les sujets non allergiques celle-ci n'est pas observée. Ainsi, chez les sujets allergiques, la stimulation des mDC par Der p 1 semble induire une polarisation Th1. Toutefois, l'IL-5 et l'IL-13, deux cytokines Th2 étant

augmentées dans l'étude de Farkas et ses collaborateurs, n'ont pas été étudiées ce qui incite à nuancer le fait que les mDC de sujets allergiques induisent une polarisation Th1. Chez les sujets allergiques, la coculture de pDC stimulées par Der p 1 et de lymphocytes T CD4⁺ allogéniques conduit à la production d'IL-4. Cette dernière n'est pas observée chez les sujets non allergiques (Charbonnier A.S. *et al.*, 2003). Ainsi, chez les sujets allergiques, les pDC semblent induire une polarisation Th2 (Charbonnier A.S. *et al.*, 2003; Farkas L. *et al.*, 2004), alors que dans les modèles animaux ces cellules sont tolérogéniques.

2. Les lymphocytes Th1 et Th2

Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans les réponses immunes à médiation cellulaire, et plus particulièrement dans les processus immunitaires déclenchés contre des microorganismes intracellulaires (mycobactéries et virus par exemple). Les lymphocytes Th2, quant à eux, sont à l'origine d'une réponse immune à médiation humorale. Cette dernière se met en place envers des micro-organismes extracellulaires (parasites) et des allergènes et se traduit par une forte production d'IL-4 et d'IL-5, la synthèse d'IgE et une éosinophilie en réponse à l'IL-5.

Jusqu'à la découverte des Treg, la plupart des pathologies immunitaires étaient expliquée par une dérégulation de l'équilibre entre les réponses Th1 et Th2.

a. Les principales caractéristiques phénotypiques des lymphocytes Th1 et Th2

La principale caractéristique différenciant les lymphocytes Th1 des lymphocytes Th2 est leur profil cytokinique. Ainsi, les lymphocytes Th1 sont caractérisés par la production d'IL-2, d'IFN- γ et de TNF- β , alors que les lymphocytes Th2 sont caractérisés par leur sécrétion d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9, d'IL-10, d'IL-13 et d'IL-25 (Romagnani S., 2004). Les lymphocytes Th1 et Th2 produisent également différentes chimiokines. En effet, les lymphocytes Th1 produisent essentiellement CCL5 et les lymphocytes Th2 CCL1 et CCL22 (Smit J.J. and Lukacs N.W., 2006).

Des marqueurs de surface ont aussi été identifiés et sont pour certains impliqués dans leur différenciation.

i. *L'expression des récepteurs aux cytokines et chimiokines sur les lymphocytes Th1*

L'expression de la chaîne β 2 du récepteur de l'IL-12 (IL-12R β 2) est induite par l'activation du TCR puis maintenue par l'IL-12 ou par une stimulation avec l'IFN- γ (Rogge L. *et al.*, 1997; Szabo S.J. *et al.*, 1997). La chaîne β 1 (IL-12R β 1), quant à elle, est constitutivement exprimée sur les cellules T CD4⁺ naïves et son expression est augmentée dans les cellules Th1 via un mécanisme dépendant de l'IRF-1

(Kano S. *et al.*, 2008). L'IL-12R β 1 ou l'IL-12R β 2 fixe l'IL-12 avec une faible affinité alors que le complexe IL-12R β 1/IL-12R β 2 la fixe avec une forte affinité. De plus, la chaîne IL-12R β 2 contient des résidus tyrosine dans son domaine cytoplasmique permettant la transduction du signal. Ainsi, seules les cellules exprimant le complexe IL-12R β 1/IL-12R β 2 sont capables de répondre à l'IL-12 (Presky D.H. *et al.*, 1996). L'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-18 (IL-18R α) est également augmentée durant la différenciation Th1. Bien que l'IL-18 ne soit pas directement impliquée dans la différenciation Th1, cette cytokine peut agir en synergie avec l'IL-12 pour induire l'IFN- γ , faisant ainsi de celle-ci un facteur important dans les réponses Th1 (Robinson D. *et al.*, 1997; Yang J. *et al.*, 2001). Alors que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs expriment les chaînes α et β du récepteur de l'IFN- γ , les lymphocytes Th1 expriment uniquement la chaîne α du récepteur de l'IFN- γ . La perte de cette chaîne durant la différenciation rend les cellules Th1 non réactives à l'IFN- γ (Groux H. *et al.*, 1997; Pernis A. *et al.*, 1995).

En général, les lymphocytes T CD4 naïfs expriment les CCR7 et CXCR4 nécessaires à leur entrée dans les ganglions lymphatiques (Sallusto F. *et al.*, 1998; Smit J.J. and Lukacs N.W., 2006). Après activation et différenciation, les lymphocytes Th1 expriment préférentiellement les récepteurs aux chimiokines CCR5 et CXCR3 (Bonecchi R. *et al.*, 1998; Loetscher P. *et al.*, 1998; Sallusto F. *et al.*, 1998).

Outre l'expression des récepteurs de cytokines et chimiokines, les lymphocytes Th1 activés expriment aussi préférentiellement le marqueur d'activation LAG-3 (Annunziato F. *et al.*, 1999; Annunziato F. *et al.*, 1996).

ii. L'expression des récepteurs aux cytokines et chimiokines sur les lymphocytes Th2

Contrairement aux lymphocytes Th1, les lymphocytes Th2 expriment uniquement l'IL-12R β 1 (Rogge L. *et al.*, 1997), les rendant ainsi non réactives à l'IL-12 (Presky D.H. *et al.*, 1996). Durant la différenciation Th2, l'expression de l'IL-4R α est augmentée par l'IL-4. De plus, l'expression de l'IL-2R α (CD25) est plus importante à la surface des lymphocytes Th2 comparativement aux lymphocytes Th1. Cette forte expression de l'IL-2R α pourrait leur conférer une hyper-réactivité vis-à-vis de l'IL-2 (Zhu J. and Paul W.E., 2008). L'IL-33R α (T1/ST2), récepteur appartenant à la superfamille de l'IL-1R (incluant l'IL-18R α), est exprimé uniquement par les lymphocytes Th2 (Schmitz J. *et al.*, 2005). L'interaction entre l'IL-33 et le récepteur T1/ST2 amplifie la production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13) par les lymphocytes Th2 polarisés *in vitro* activés avec la combinaison anti-CD3/CD28 (Schmitz J. *et al.*, 2005). Les lymphocytes Th2 expriment les deux chaînes α et β du récepteur de l'IFN- γ , rendant ainsi ces cellules réactives à l'IFN- γ (Groux H. *et al.*, 1997; Pernis A. *et al.*, 1995). L'interaction entre l'IFN- γ et son récepteur inhibe alors la production d'IL-4 par les lymphocytes Th2.

Après activation et différenciation, les lymphocytes Th2 expriment préférentiellement les récepteurs aux chimiokines CCR3, CCR4 et CCR8 (Bonecchi R. *et al.*, 1998; D'Ambrosio D. *et al.*, 1998; Sallusto F. *et al.*, 1998; Sallusto F. *et al.*, 1997). Ces cellules Th2 semblent également exprimer préférentiellement le CXCR4, mais cette expression est controversée (Rot A. and von Andrian U.H., 2004).

Outre les récepteurs de cytokines et de chimiokines, les lymphocytes Th2 expriment sélectivement le CRTH2, récepteur à la PGD2 (Nagata K. *et al.*, 1999) et le marqueur d'activation CD30 qui est quasi-absent de la surface des cellules Th1 (Annunziato F. *et al.*, 1999; Annunziato F. *et al.*, 1996).

b. La polarisation des cellules vers le profil Th1 ou Th2

Chez l'homme, les lymphocytes T auxiliaires immatures se différencient en cellules T CD4⁺ naïves sécrétant de l'IL-2 qu'elles utilisent comme facteur de croissance autocrine. Ces lymphocytes T naïfs évoluent ensuite vers un profil Th0, caractérisé par un profil intermédiaire de sécrétion de cytokines incluant l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5 et l'IFN- γ (Seder R.A. and Paul W.E., 1994). Ces lymphocytes acquièrent alors très rapidement la capacité de synthétiser d'autres cytokines définissant leur profil (Th1 ou Th2) ou leurs aptitudes à coopérer avec d'autres types cellulaires. La polarisation est sous contrôle d'un certain nombre de facteurs incluant les conditions d'activation (liaison au TCR, molécules de costimulation), la nature de la CPA et l'environnement. Plus précisément, les cytokines IL-2, IL-4, IL-12 et l'IFN- γ contrôlent la polarisation Th1 ou Th2 en activant de façon différentielle les facteurs de transcription à l'origine de cette polarisation. Ces quatre cytokines activent la voie Jak/Stat (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription), mais la nature des Jak et Stat impliqués dans la transduction du signal diffère. Globalement, après liaison de la cytokine à son récepteur, les protéines de la famille Jak qui lui sont associées s'activent, phosphorylant alors des résidus tyrosine présents sur les facteurs cytoplasmiques Stat. Cette phosphorylation des Stat conduit soit à l'activation d'autres facteurs, soit à leur dimérisation et leur translocation nucléaire où ils agissent alors comme des facteurs de transcription. L'IL-4 active Jak1 et Jak3 qui activent alors Stat6, l'IL-2 active Jak1 et Jak3 qui phosphorylent Stat5, l'IL-12 active Jak2 et Tyk2 qui phosphorylent Stat4 et l'IFN- γ active Jak1 et Jak2 qui activent Stat1 (Murray P.J., 2007).

Dans cette partie, nous nous intéresserons aux principaux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation Th1 ou Th2 lors d'une réaction immunitaire. Des facteurs de transcription comme NF- κ B, NFAT et AP-1 sont également importants mais ne sont pas spécifiques des lymphocytes Th1 ou Th2 et ne seront donc pas abordés dans ce paragraphe. Ces facteurs sont activés après la stimulation via le TCR ou par les molécules costimulatrices.

i. La différenciation Th1 (Figure 19)

Dans l'initiation des réponses Th1, les CPA, et plus particulièrement les DC activées, stimulent les lymphocytes T CD4⁺ naïfs possédant le TCR adéquat. Outre l'interaction entre le complexe CMH-II/peptide antigénique apprêté, les DC activées (stimulation via une combinaison de TLR ou via un TLR en présence d'une cytokine (IFN de type 1 ou IFN- γ) (Trinchieri G. and Sher A., 2007)) produisent de grandes quantités d'IL-12 conduisant à la production d'IFN- γ par les cellules NK (Murphy K.M. and Reiner S.L., 2002; Zhu J. and Paul W.E., 2008). L'IFN- γ amorce alors la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ activés via leur TCR en lymphocytes Th1. Les étapes conduisant à une différenciation Th1 complète sont représentées sur la figure 19. Brièvement, l'interaction entre l'IFN- γ et son récepteur présent sur le lymphocyte T CD4⁺ induit une cascade de signalisation impliquant Stat1 et les facteurs de transcription T-bet, Hlx et Runx3 conduisant notamment à la production d'IFN- γ et de l'IL-12R β 2 (Djuretic I.M. *et al.*, 2007; Lighvani A.A. *et al.*, 2001; Mullen A.C. *et al.*, 2002; Murphy K.M. and Reiner S.L., 2002; Naoe Y. *et al.*, 2007; Szabo S.J. *et al.*, 2000; Zhu J. and Paul W.E., 2008). L'IL-12R β 2 transite alors jusqu'à la membrane où il s'associe à l'IL-12R β 1 aboutissant à un complexe fonctionnel. Les lymphocytes fixent alors l'IL-12 entraînant une cascade de signalisation impliquant Stat4 et les facteurs de transcription T-bet et Hlx, qui aboutit à l'expression de l'IL-12R β 2 et de l'IL-18R α et à la production d'IFN- γ (Kaplan M.H. *et al.*, 1996; Murphy K.M. and Reiner S.L., 2002; Thierfelder W.E. *et al.*, 1996; Thieu V.T. *et al.*, 2008; Zhu J. and Paul W.E., 2008). Ainsi, les cellules Th1 pleinement différenciées sont réactives à l'IL-12 et à l'IL-18. Ces deux cytokines agissant de concert induisent la production d'IFN- γ par les cellules Th1 en absence de stimulation via leur TCR. Cette production de cytokines indépendante de l'antigène est probablement importante dans l'amplification des réponses Th1 via le recrutement de cellules Th1 pré-existantes (Robinson D. *et al.*, 1997; Yang J. *et al.*, 2001; Zhu J. and Paul W.E., 2008).

ii. La différenciation Th2 (Figure 20)

L'IL-2 et l'IL-4 sont toutes deux nécessaires à la différenciation Th2 (Cote-Sierra J. *et al.*, 2004; Le Gros G. *et al.*, 1990). La stimulation du lymphocyte CD4⁺ via son TCR conduit à une cascade de signalisation aboutissant notamment à la production et la sécrétion d'IL-2. L'IL-2 agit alors de façon autocrine puisqu'elle se fixe sur son récepteur présent à la surface du lymphocyte T CD4⁺, amorçant alors la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ activés via leur TCR en lymphocytes Th2. Les étapes conduisant à une différenciation Th2 complète sont représentées sur la figure 20. Brièvement, l'interaction entre l'IL-2 et son récepteur présent à la surface du lymphocyte T CD4⁺ induit une cascade de signalisation impliquant les protéines Stat5 (Stat5a et Stat5b), et plus particulièrement Stat5a nécessaire à la polarisation Th2 (Cote-Sierra J. *et al.*, 2004; Zhu J. *et al.*, 2003). Ainsi, en dépit

de la présence de Stat5b, des cellules T CD4⁺ déficientes en Stat5a sont incapables de produire de l'IL-4 après stimulation anti-CD3/CD28 et IL-2, montrant ainsi un défaut de polarisation Th2 (Cote-Sierra J. *et al.*, 2004). Stat5a se fixe dans le second intron du gène de *il4*, permettant ainsi l'accessibilité à ce gène pour d'autres facteurs (Cote-Sierra J. *et al.*, 2004; Zhu J. *et al.*, 2003). L'IL-4, provenant soit d'une source cellulaire exogène soit du lymphocyte T CD4⁺ après une interaction entre le complexe CMH II/peptide antigénique et TCR en présence de faibles concentrations d'antigène (signal résultant à la transcription et la traduction de l'IL-2 et de GATA-3), se fixe à son récepteur présent à la surface du lymphocyte T CD4⁺ (Yamane H. *et al.*, 2005; Zhu J. and Paul W.E., 2008). Cette interaction induit une cascade de signalisation impliquant Stat6, GATA-3, c-maf et IRF-4 (Ho I.C. *et al.*, 1998; Kaplan M.H. *et al.*, 1996; Kurata H. *et al.*, 1999; Lohoff M. *et al.*, 2002; Pai S.Y. *et al.*, 2004; Rengarajan J. *et al.*, 2002; Shimoda K. *et al.*, 1996; Takeda K. *et al.*, 1996; Zhang D.H. *et al.*, 1997; Zheng W. and Flavell R.A., 1997; Zhu J. *et al.*, 2001; Zhu J. *et al.*, 2004; Zhu J. and Paul W.E., 2008). L'IRF-4 semble permettre l'expression de GATA-3 puisque la production d'IL-4 est restaurée par une surexpression de GATA-3 dans les cellules déficientes en IRF-4 (Lohoff M. *et al.*, 2002). La voie de signalisation IL-4/Stat6 aboutit à la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), à l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR4 et CCR8 expliquant leur expression préférentielle sur les lymphocytes Th2, à l'expression du répresseur transcriptionnel Gfi et à la survie et la prolifération des lymphocytes T mémoire (Finkelman F.D. *et al.*, 2000; Kim J.I. *et al.*, 1999; Zhang S. *et al.*, 2000; Zhu J. *et al.*, 2002; Zhu J. *et al.*, 2006; Zhu J. *et al.*, 2004; Zhu J. and Paul W.E., 2008).

iii. La régulation croisée entre les facteurs impliqués dans les voies de différenciation Th1 et Th2

Les voies de différenciation Th1 et Th2 sont antagonistes l'une de l'autre, et ce à plusieurs niveaux comme l'illustre la figure 21. Par exemple, GATA-3 réprime la production de stat4 (Kaminuma O. *et al.*, 2004) et T-bet empêche à GATA-3 de se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (Hwang E.S. *et al.*, 2005).

c. L'implication des lymphocytes Th1 et Th2 dans la réaction pulmonaire allergique

i. Les observations chez les sujets allergiques

Les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle majeur dans l'allergie. Chez des sujets atteints d'un asthme sévère aigu, les lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique présentent une augmentation d'expression de trois marqueurs d'activation lymphocytaire (IL-2R, HLA-DR et VLA-1) comparativement à ceux de sujets contrôle (asthme moyen, COPD ou sujets « sains »), suggérant leur activation (Corrigan C.J. and Kay A.B., 1990). Dans les LBA de sujets atteints d'asthme allergique, les lymphocytes T CD4⁺ sont

activés (augmentation du CD25) 24 heures après provocation allergénique. Des études ont montré que l'activation des cellules T dans les LBA peut être corrélée à la sévérité de l'asthme (évaluée par l'HRB) et à l'éosinophilie bronchique (Robinson D. *et al.*, 1993; Robinson D.S. *et al.*, 1993; Walker C. *et al.*, 1991). De plus, outre leur activation, les lymphocytes T possèdent des taux d'ARNm de l'IL-4 et de l'IL-5 plus importants (Robinson D. *et al.*, 1993), suggérant une augmentation du nombre de lymphocytes Th2. Des biopsies de tissus pulmonaires présentent également un nombre accru de lymphocytes T CD4⁺ activés au sein de la muqueuse (Azzawi M. *et al.*, 1990). Les ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-5 sont détectés dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques allergiques (Ying S. *et al.*, 1997). De plus, le nombre de cellules exprimant les facteurs de transcription GATA-3, c-Maf et Stat6 est plus important dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques allergiques comparativement aux sujets contrôle (Christodoulopoulos P. *et al.*, 2001; Nakamura Y. *et al.*, 1999). *A contrario*, le nombre de cellules exprimant T-bet (associé au profil Th1) est réduit (Finotto S. *et al.*, 2002). L'augmentation du nombre de cellules exprimant GATA-3, c-Maf et Stat6 est également retrouvée dans les expectorations induites de patients asthmatiques (Taha R. *et al.*, 2003).

Par inhibition de la fonction des lymphocytes Th2, les lymphocytes Th1 peuvent avoir un effet protecteur et bénéfique dans l'asthme. Ainsi, l'immunothérapie avec des allergènes tels que le venin d'hyménoptère ou les graminées est capable d'augmenter l'expression de l'IFN- γ et de diminuer dans la plupart des cas la production d'IL-4 (Akoum H. *et al.*, 1996; Jutel M. *et al.*, 1995; Secrist H. *et al.*, 1993; Varney V.A. *et al.*, 1993). De même, une immunothérapie avec des extraits de l'acarien *Dermatophagoides pteronyssinus* améliore la fonction pulmonaire des enfants atteints d'asthme allergique. Cette amélioration peut être attribuée à la diminution des taux sériques d'IL-4 et d'IL-13 et à l'augmentation des taux sériques d'IFN- γ (Chen Z.G. *et al.*, 2009).

ii. Les modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique

Les modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique ont permis d'établir les rôles respectifs des lymphocytes Th1 et Th2.

La mise en évidence de l'implication des lymphocytes Th2 dans la réaction pulmonaire allergique

Afin d'identifier le rôle des lymphocytes Th2, des expériences de transfert de lymphocytes T CD4⁺ issus de souris transgéniques DO11.10 (TCR spécifique de l'OVA) polarisés *in vitro* en lymphocytes Th2 ont été réalisées. Le transfert de cellules Th2 à des souris naïves suivi de provocations à l'OVA induit le développement d'une HRB et d'une inflammation pulmonaire allergique (éosinophiles et cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans le LBA, infiltrats péribronchiques et périvasculaires contenant essentiellement des lymphocytes et des éosinophiles, hyperplasie des cellules caliciformes et

surproduction de mucus) (Cohn L. *et al.*, 1997; Cohn L. *et al.*, 1999; Cohn L. *et al.*, 1998). Chez des souris SCID, un jour après une administration intranasale d'OVA, le transfert de ces cellules Th2 suivi de provocations à l'OVA conduit également à l'induction de l'HRB et de l'inflammation pulmonaire allergique (Hansen G. *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle crucial des lymphocytes Th2 dans le développement de la réaction pulmonaire allergique. Le transfert adoptif de ces cellules Th2 suivi d'une sensibilisation et de provocations à l'OVA n'amplifie pas l'inflammation pulmonaire allergique comparativement à des souris sensibilisées et provoquées à l'OVA (Randolph D.A. *et al.*, 1999).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les facteurs de transcription Stat6 et GATA-3 sont indispensables à la différenciation des lymphocytes Th2. Ces facteurs sont cruciaux au développement de la réaction pulmonaire allergique, renforçant l'importance des lymphocytes Th2 dans cette pathologie. Des souris déficientes en Stat6 sensibilisées et provoquées à l'OVA ne développent pas de réaction pulmonaire allergique (Akimoto T. *et al.*, 1998; Kuperman D. *et al.*, 1998). Chez des souris sensibilisées à l'OVA, l'administration intranasale d'un peptide inhibiteur ou de siRNA de Stat6 avant les provocations à l'OVA réduit l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (Darcan-Nicolaisen Y. *et al.*, 2009; McCusker C.T. *et al.*, 2007). Similairement à Stat6, chez les souris sensibilisées à l'OVA, l'administration par voie intranasale ou intratrachéale d'un antisens, d'ARN interférence ou de DNazyme spécifique de GATA-3 inhibe la réaction pulmonaire allergique (Finotto S. *et al.*, 2001; Lee C.C. *et al.*, 2008; Sel S. *et al.*, 2008). La neutralisation de la MAP kinase p38, molécule phosphorylant GATA-3, atténue également l'inflammation pulmonaire allergique induite par la sensibilisation et les provocations à l'OVA (Duan W. *et al.*, 2005; Underwood D.C. *et al.*, 2000).

Le rôle des lymphocytes Th1 dans la réaction pulmonaire allergique

Le rôle des lymphocytes Th1 dans le développement de la réaction pulmonaire allergique semble complexe. Alors que dans certaines études les cellules Th1 atténuent la réaction pulmonaire allergique, dans d'autres études elles la potentialisent.

L'atténuation de la réaction pulmonaire allergique par les lymphocytes Th1

Contrairement au transfert de cellules Th2, le transfert de cellules Th1 polarisées *in vitro* à partir des cellules T issues de souris transgéniques DO11.10 suivi de provocations à l'OVA à des souris BALB/c naïves n'induit pas d'HRB ni d'inflammation pulmonaire allergique (Cohn L. *et al.*, 1997; Cohn L. *et al.*, 1999; Cohn L. *et al.*, 1998). Le transfert de ces cellules Th1 à des souris SCID naïves n'induit pas d'HRB et conduit à une faible production de mucus et à la présence d'infiltrats périsvasculaires contenant

notamment des lymphocytes T, des neutrophiles et quelques éosinophiles (Hansen G. *et al.*, 1999). Ainsi, le transfert de lymphocytes Th1 n'induit pas de réponse de type asthmatique allergique.

Le transfert de lymphocytes Th1 à des souris BALB/c naïves ou SCID naïves conjointement à celui de lymphocytes Th2 suivi de provocations à l'OVA diminue l'éosinophilie du LBA et la production de mucus (Cohn L. *et al.*, 1999; Hansen G. *et al.*, 1999) et augmente les taux d'IFN- γ dans le LBA (Cohn L. *et al.*, 1999). Chez les souris BALB/c, aucune modification des taux de cytokines Th2 dans le LBA n'est observée (Cohn L. *et al.*, 1999). Chez les souris SCID, l'HRB et les infiltrats péribronchiques ne sont pas modifiés (Hansen G. *et al.*, 1999). Chez des souris sensibilisées à l'OVA, le transfert adoptif de clones stables Th1 avant les provocations allergéniques diminue l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire et supprime la fibrose péribronchique et l'hyperplasie des cellules caliciformes. De plus, les taux d'IL-5 et d'IL-13 présents dans le LBA sont fortement diminués alors que le taux d'IFN- γ est nettement augmenté. Enfin, au niveau pulmonaire, les ARNm de CCL5 prédominent et ceux de CCL11 sont quasi-absents. L'ensemble de ces résultats suggère la conversion d'une réponse Th2 vers une réponse Th1 où l'inflammation péribronchique persiste via le recrutement de cellules mononucléées (Irifune K. *et al.*, 2005). Dans une autre étude, le transfert adoptif de cellules Th1 polarisées *in vitro* issues de souris transgéniques DO11.10 au moment de la première provocation à l'OVA diminue le nombre d'éosinophiles présents dans le LBA, mais ne modifie pas l'HRB. De plus, les infiltrats péribronchiques et périvasculaires contenant les lymphocytes et les éosinophiles ne sont pas diminués (Hansen G. *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats suggère donc que le transfert de lymphocytes Th1 atténue la réponse Th2.

Comme nous l'avons dans le paragraphe précédent, T-bet est indispensable à la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1. Chez des souris BALB/c sensibilisées à l'OVA, l'administration par voie intranasale de T-bet avant les provocations à l'OVA diminue le nombre d'éosinophiles dans le LBA, l'infiltration péribronchique et les taux sériques d'IgE totaux et spécifiques de l'OVA (Wang S.Y. *et al.*, 2008), renforçant l'implication des lymphocytes Th1 dans l'atténuation de la réaction pulmonaire allergique.

La potentialisation de la réaction pulmonaire allergique par les lymphocytes Th1

Une équipe a également montré que les lymphocytes Th2 seuls ne suffisaient pas au développement d'une réponse allergique pulmonaire. Le cotransfert de lymphocytes Th1 et Th2 à des souris naïves suivi de provocations à l'OVA est ici indispensable au recrutement des lymphocytes Th2 dans les poumons et au développement de l'inflammation éosinophilique. Les cellules Th1 initieraient le recrutement des cellules Th2 et des éosinophiles via l'induction de l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Celle-ci est dépendante du TNF- α puisqu'un anticorps neutralisant

anti-TNF- α l'abroge (Randolph D.A. *et al.*, 1999). Le transfert de cellules Th1 polarisées *in vitro* à partir de lymphocytes T de souris transgéniques DO11.10 suivi d'une sensibilisation et d'une provocation à l'OVA induit une augmentation du nombre de lymphocytes et monocytes/macrophages présents dans le LBA et une tendance à l'augmentation du nombre d'éosinophiles comparativement à une absence de transfert ou au transfert de cellules Th2. Au niveau du tissu pulmonaire, l'inflammation péribronchique et périvasculaire est amplifiée et la présence d'éosinophiles est également observée. Le transfert de cellules Th1 sur une réponse Th2 déjà établie (sensibilisation et provocation à l'OVA) suivi de provocations à l'OVA augmente le nombre de lymphocytes et de macrophages dans le LBA et tend à augmenter le nombre d'éosinophiles (Randolph D.A. *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent donc que les lymphocytes Th1 ne sont pas protecteurs dans ce modèle d'asthme expérimental, mais potentialiseraient plutôt la réponse inflammatoire.

3. Les lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont impliqués dans la défense contre certaines bactéries et champignons. Outre leur rôle bénéfique dans le contrôle de ces pathogènes, ils peuvent avoir des effets délétères dans certaines pathologies telle que l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE).

a. Le développement des lymphocytes Th17 (Figure 22)

i. *Les facteurs de transcription nécessaires à la différenciation Th17*

Stat3, impliqué dans les cascades de signalisation induites par l'IL-6, l'IL-21, l'IL-23 et le TGF- β , est indispensable pour la production d'IL-17 puisqu'une déplétion de Stat3 conduit à une perte de cellules produisant l'IL-17. Cette molécule est responsable entre autre de l'induction de l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) et de ROR γ t (Harris T.J. *et al.*, 2007; Mathur A.N. *et al.*, 2007).

Le récepteur nucléaire ROR γ t est très important dans la différenciation Th17 (Ivanov, II *et al.*, 2006). Ainsi, la surexpression de ROR γ t induit la production d'IL-17, alors que les cellules déficientes en ROR γ t produisent très peu d'IL-17 (Zhu J. and Paul W.E., 2008). ROR α , autre récepteur nucléaire dont l'expression est induite par l'IL-6 et le TGF- β , est fortement exprimé dans les cellules Th17. Une déficience en ROR α résulte en une diminution de l'expression de l'IL-17 à la fois *in vivo* et *in vitro*, impliquant ce récepteur dans la production d'IL-17. Ainsi, ROR γ t et ROR α agissent en synergie pour mener à une différenciation Th17 optimale puisqu'une déficience en ces deux récepteurs abroge totalement la production d'IL-17 (Yang X.O. *et al.*, 2008).

IRF-4 est nécessaire à la différenciation Th17 puisque des cellules T déficientes en IRF-4 ne produisent pas d'IL-17 (Brustle A. *et al.*, 2007; Huber M. *et al.*, 2008).

ii. Le développement chez la souris

In vitro, alors que le TGF- β seul induit l'expression du facteur de transcription Foxp3 et donc le développement de Treg (Chen W. *et al.*, 2003), le TGF- β combiné à l'IL-6 induit le développement des Th17 à partir de cellules T CD4⁺ naïves. En effet, l'IL-6 diminue l'expression de Foxp3 et donc le développement des Treg et induit l'expression de l'IL-23R (Bettelli E. *et al.*, 2006; Mangan P.R. *et al.*, 2006; Veldhoen M. *et al.*, 2006). Le rôle primordial de l'IL-6 et du TGF- β dans l'initiation de la différenciation Th17 est également retrouvé *in vivo*. En effet, des souris transgéniques pour le TGF- β présentent une exacerbation de l'EAE avec une augmentation des réponses Th17. De plus, des souris déficientes en IL-6 ont un nombre accru de lymphocytes Treg et ne développent pas d'EAE (Korn T. *et al.*, 2007; Louten J. *et al.*, 2009).

L'IL-21 peut remplacer l'IL-6 pour la différenciation des lymphocytes Th17 (Korn T. *et al.*, 2007; Nurieva R. *et al.*, 2007; Zhou L. *et al.*, 2007). Similairement à l'IL-6, l'IL-21 augmente l'expression de ROR γ t et du récepteur à l'IL-23R au niveau des cellules T naïves et inhibe le développement des Treg Foxp3⁺ induit par le TGF- β seul. L'IL-6 ou l'IL-21 peuvent induire l'expression d'IL-21 par les lymphocytes Th17, suggérant que l'IL-21 pourrait agir comme un facteur autocrine d'expansion des Th17 (Louten J. *et al.*, 2009). Cependant, *in vivo*, l'IL-21 n'est pas indispensable puisqu'en absence d'IL-21 ou d'IL-21R la différenciation des lymphocytes Th17 est normale (Coquet J.M. *et al.*, 2008; Sonderegger I. *et al.*, 2008).

L'IL-23 semble essentielle à l'expansion, au maintien et/ou à la survie des lymphocytes Th17, mais n'est pas impliquée dans les étapes précoces de la polarisation Th17 (Louten J. *et al.*, 2009). Le GM-CSF est capable de promouvoir la génération et la survie des cellules Th17 en stimulant la production d'IL-6 et d'IL-23 (Sonderegger I. *et al.*, 2008).

iii. Le développement chez l'homme

Les lymphocytes Th17 humains ont été initialement identifiés dans le sang périphérique et les intestins de sujets « sains » et de patients atteints de la maladie de Crohn (Acosta-Rodriguez E.V. *et al.*, 2007; Annunziato F. *et al.*, 2007). Ils sont caractérisés par l'expression membranaire de l'IL-23R, du CCR6 et du CD161 (Acosta-Rodriguez E.V. *et al.*, 2007; Annunziato F. *et al.*, 2007; Cosmi L. *et al.*, 2008; Kleinschek M.A. *et al.*, 2009; Wilson N.J. *et al.*, 2007) et par l'expression intracellulaire de ROR γ t, d'IL-17A, d'IL-22, d'IL-17F, d'IL-26, de CCL20 et dans certains cas d'IFN- γ (Wilson N.J. *et al.*,

2007). Contrairement à leur contrepartie murine, le développement de ces cellules ne nécessite pas la combinaison IL-6/TGF- β (Acosta-Rodriguez E.V. *et al.*, 2007; Cosmi L. *et al.*, 2008; Volpe E. *et al.*, 2008; Wilson N.J. *et al.*, 2007; Yang L. *et al.*, 2008) et les conditions précises pour le développement de ces cellules restent controversées.

L'IL-23 et l'IL-1 β émergent comme cytokines critiques et suffisantes pour le développement des lymphocytes Th17 (Acosta-Rodriguez E.V. *et al.*, 2007; Chen Z. *et al.*, 2007; Wilson N.J. *et al.*, 2007), alors que le rôle du TGF- β est sujet à controverse (Acosta-Rodriguez E.V. *et al.*, 2007; Cosmi L. *et al.*, 2008; Manel N. *et al.*, 2008; Volpe E. *et al.*, 2008; Yang L. *et al.*, 2008). Néanmoins, le TGF- β est nécessaire pour l'expression de RORC2 (récepteur nucléaire très proche de ROR γ t murin) induite par la combinaison IL-1 β /IL-23/IL-6 (Burgler S. *et al.*, 2009) et semble contribuer indirectement à l'expansion des lymphocytes Th17 en inhibant les cellules Th1 (Santarlaschi V. *et al.*, 2009). La PGE2 associée à l'IL-23 ou à la combinaison IL-23/IL-1 β initie la différenciation, la maturation et l'expansion des lymphocytes Th17 (Boniface K. *et al.*, 2009; Chizzolini C. *et al.*, 2008).

b. Les lymphocytes Th17 et la réaction pulmonaire allergique

i. *L'implication des lymphocytes Th17, et plus particulièrement de l'IL-17, dans l'asthme sévère humain*

La stimulation de PBMC isolées de patients asthmatiques allergiques avec l'allergène induit la production d'IL-17, alors que celle-ci est absente lorsque les PBMC sont issues de patients asthmatiques non allergiques, de sujets non asthmatiques ou de sujets contrôle (Hashimoto T. *et al.*, 2005). Chez les patients asthmatiques allergiques, les taux plasmatiques d'IL-17 sont augmentés comparativement aux sujets contrôle (Wong C.K. *et al.*, 2001). De plus, chez les patients asthmatiques, l'expression de l'IL-17 est augmentée dans le LBA, les expectorations induites et les biopsies bronchiques (Al-Ramli W. *et al.*, 2009; Molet S. *et al.*, 2001; Sun Y.C. *et al.*, 2005). Au niveau des expectorations induites et des biopsies bronchiques, le nombre de cellules exprimant l'IL-17 corrèle positivement avec la sévérité de l'asthme (Al-Ramli W. *et al.*, 2009; Sun Y.C. *et al.*, 2005). Dans les LBA et les expectorations induites, la plupart des cellules exprimant l'IL-17 sont des éosinophiles (Molet S. *et al.*, 2001). Dans les biopsies bronchiques de patients asthmatiques, l'IL-17 est quasi-exclusivement exprimée dans des cellules mononucléées présentes dans les infiltrats cellulaires (par les cellules T très probablement) au niveau des tissus subépithéliaux. L'IL-17F est également présente dans les infiltrats cellulaires mais aussi dans les cellules épithéliales. De même que pour l'IL-17, une corrélation positive existe entre le nombre de cellules exprimant l'IL-17F et la sévérité de l'asthme (Al-Ramli W. *et al.*, 2009). Au vu de ces résultats, l'IL-17 semble particulièrement

impliqué dans l'asthme sévère. Dans les expectorations induites de patients atteints d'asthme persistant, l'expression de l'IL-17 corrèle avec l'influx de neutrophiles (Sun Y.C. *et al.*, 2005), suggérant la participation de l'IL-17 dans le recrutement des neutrophiles. En effet, au niveau bronchique, l'IL-17 peut amplifier la production ou l'expression par les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules des muscles lisses de cytokines et/ou de chimiokines impliquées dans le développement et le recrutement des neutrophiles. Ainsi, en réponse à l'IL-17, les fibroblastes produisent de l'IL-6, du CXCL1 et du CXCL8, les cellules épithéliales expriment le G-CSF, le CXCL1, le CXCL8 et le CCL20 et les cellules musculaires lisses produisent de l'IL-6 et du CXCL8. CXCL1 et CXCL8 sont des chimioattractants pour les neutrophiles, alors que l'IL-6 et le G-CSF sont impliqués dans le développement des neutrophiles et la granulopoïèse (Hennes S. *et al.*, 2004; Kawaguchi M. *et al.*, 2001; Louten J. *et al.*, 2009; Molet S. *et al.*, 2001). L'IL-17 induit également l'expression des gènes de la mucine *muc5ac* et *mucRb* par les cellules épithéliales (Chen Y. *et al.*, 2003).

Bien que l'ensemble de ces résultats montre l'implication de l'IL-17 dans l'asthme sévère, et plus particulièrement dans le recrutement des neutrophiles, aucune preuve formelle ne démontre que cette cytokine est produite par les lymphocytes Th17. En effet, l'IL-17 est produite par les cellules Th17 mais également par les lymphocytes T CD8⁺, les cellules NK, les cellules NKT, les macrophages alvéolaires, les éosinophiles et les cellules T $\gamma\delta$. Les neutrophiles pourraient également être des sources cellulaires d'IL-17 puisque ces cellules expriment l'ARNm (Louten J. *et al.*, 2009; Molet S. *et al.*, 2001; Song C. *et al.*, 2008).

ii. *L'implication des lymphocytes Th17 dans les modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique*

Dans ce paragraphe, nous décrivons le rôle de l'IL-17 en général dans l'asthme expérimental puis l'implication plus spécifique des lymphocytes Th17.

L'implication de l'IL-17 dans l'asthme expérimental

Des souris sensibilisées et provoquées à l'OVA présentent une production accrue d'IL-17 qui corrèle avec la production d'IL-23. La restimulation *in vitro* par l'IL-23 des cellules de ganglions médiastinaux de ces souris induit la production d'IL-17 (Schnyder-Candrian S. *et al.*, 2006). Dans ce modèle murin d'asthme expérimental, les souris déficientes en IL-17R présentent des réponses Th2 atténuées (éosinophilie du LBA, taux sériques d'IgE et production d'IL-5 par les cellules ganglionnaires restimulées *in vitro* par l'OVA), suggérant la nécessité de l'IL-17 dans la mise en place de la réponse Th2. L'administration d'IL-17 à des souris wild-type au moment des provocations à l'OVA réduit considérablement l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique, suggérant un rôle protecteur de

l'IL-17 lors de la phase effectrice. Cette diminution de l'inflammation pulmonaire allergique semble être en partie liée à l'abrogation totale ou partielle de la production de CCL5, CCL11 et CCL17 dans les poumons (Schnyder-Candrian S. *et al.*, 2006).

Au vu de ces résultats, l'IL-17 semble être nécessaire à la sensibilisation à l'allergène mais protecteur lors de la phase effectrice. Toutefois, l'implication de l'IL-17 dans la mise en place de la réponse Th2 doit être prise avec précaution puisque cette cytokine semble importante dans la mise en place de la formation du centre germinatif (Hsu H.C. *et al.*, 2008). Ainsi, chez des souris déficientes en IL-17R, les réponses T spécifiques d'antigènes, et en particulier les réponses Th2 pourraient être réduites.

L'implication des cellules Th17 dans l'asthme expérimental

Afin d'analyser spécifiquement le rôle des lymphocytes Th17, des expériences de transfert de lymphocytes T CD4⁺ naïfs issus de souris transgéniques DO11.10 polarisés *in vitro* en lymphocytes Th17 ont été réalisées. Contrairement à un transfert de lymphocytes Th2, le transfert adoptif de ces lymphocytes Th17 à des souris BALB/c naïves suivi d'une provocation à l'OVA n'induit pas d'HRB, de recrutement d'éosinophiles dans le LBA, de production d'IL-5 et d'IL-13 (LBA) et d'expression des ARNm de CCL11 et CCL24 (tissu pulmonaire) mais augmente le nombre de neutrophiles (LBA). En revanche, le cotransfert de cellules Th2 et Th17 avant la provocation allergénique amplifie l'HRB, l'inflammation pulmonaire allergique (infiltrats péribronchiques contenant des éosinophiles, lymphocytes et neutrophiles) et l'expression des ARNm CCL11 et CCL24 dans le tissu pulmonaire par rapport à un transfert unique de lymphocytes Th2, suggérant que les cellules Th17 amplifient les réponses Th2. Toutefois, le cotransfert cellules Th2/Th17 ne modifie pas les taux d'IL-5 et d'IL-13 présents dans le LBA. Chez des souris BALB/c sensibilisées à l'OVA, le transfert de cellules Th17 avant la provocation allergénique augmente le nombre de neutrophiles et d'éosinophiles présents dans le LBA. Ainsi, les cellules Th17 sont capables d'amplifier le recrutement d'éosinophiles dans une réponse Th2 déjà établie (Wakashin H. *et al.*, 2008).

Néanmoins, ce travail ne permet pas d'affirmer de façon sûre l'implication des lymphocytes Th17 dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique. En effet, la polarisation *in vitro* des lymphocytes Th17 n'aboutit qu'à 50% de cellules produisant de l'IL-17 (Wakashin H. *et al.*, 2008). Ainsi, les cellules n'étant pas polarisées en Th17 pourraient être responsables de l'amplification de la réponse Th2. De plus, après différenciation, les lymphocytes Th17 présentent une plasticité continue puisque, sous certaines conditions, ils sont capables de ne plus produire d'IL-17 mais d'amplifier leur production d'IFN- γ (Lee Y.K. *et al.*, 2009).

4. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Par définition, un lymphocyte T à activité régulatrice supprime une réponse immunitaire *in vitro* et *in vivo* via la production de cytokines immuno-suppressives (IL-10, TGF- β) ou de molécules costimulatrices inhibitrices. Les Treg peuvent être divisés en deux classes : les Treg naturels et les Treg adaptatifs. Un défaut de Treg a été observé dans les pathologies auto-immunes et les maladies allergiques.

a. Les caractéristiques générales des Treg

i. *Les Treg naturels*

Les Treg naturels sont générés dans le thymus, lieu où ils acquièrent également leur phénotype régulateur et leur fonction suppressive. Ils migrent ensuite vers les organes lymphoïdes où ils acquièrent leur phénotype mémoire (Cupedo T. *et al.*, 2005). Le développement thymique et l'homéostasie périphérique des Treg sont contrôlés par le CD28 (Tang Q. *et al.*, 2003). Ainsi, l'absence de signalisation CD80/CD86-CD28 induit une profonde réduction de Treg (Salomon B. *et al.*, 2000).

Les principales molécules membranaires exprimées par les Treg naturels

Ces cellules expriment constitutivement et fortement le CD25 à leur surface (chaîne α du récepteur de l'IL-2). Les Treg CD4⁺CD25⁺ représentent approximativement 10% des cellules T CD4⁺ circulantes chez la souris (Sakaguchi S. *et al.*, 1995) et 6 à 10% chez l'homme (Dieckmann D. *et al.*, 2001; Iellem A. *et al.*, 2001). Outre la forte expression du CD25 à la surface, les Treg murins quiescents expriment d'autres molécules de surface tels que le CTLA-4 (Read S. *et al.*, 2000), la neuropiline-1 (Bruder D. *et al.*, 2004), trois membres de la famille de récepteurs au TNF- α (GITR, OX40 et 4-1BB) (McHugh R.S. *et al.*, 2002), le CD103 (Lehmann J. *et al.*, 2002; McHugh R.S. *et al.*, 2002) et le CD45RB^{low} (Read S. *et al.*, 1998). Après activation (anti-CD3 et IL-2), l'expression membranaire du CTLA-4, OX40 et 4-1BB est fortement augmentée, alors que celle du CD103 n'est pas modifiée et celle du GITR légèrement augmentée (McHugh R.S. *et al.*, 2002). Les Treg naturels humains expriment constitutivement en intracellulaire le CTLA-4 (expression à la surface après activation) (Iellem A. *et al.*, 2001; Shevach E.M., 2001) et en surface les récepteurs chimiokines CCR4 et CCR8 (Iellem A. *et al.*, 2001).

Foxp3, facteur de transcription caractéristique des Treg naturels

Que ce soit chez l'homme ou chez la souris, les Treg naturels expriment fortement le facteur de transcription Foxp3, molécule contribuant en grande partie à leur développement et leur fonction suppressive. Ainsi, la suppression ou la réduction de Foxp3 abroge leur fonction suppressive et l'ajout

de Foxp3 à des cellules T effectrices CD25⁻ les rend suppressives (Fontenot J.D. *et al.*, 2003; Hori S. *et al.*, 2003; Khattri R. *et al.*, 2003; Wan Y.Y. and Flavell R.A., 2007). De plus, chez l'homme, des mutations du gène *foxp3* induisent un syndrome IPEX (Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy and X-linked), incluant un développement de maladies auto-immunes et allergiques. Similairement à l'homme, des mutations de ce gène chez la souris (souris scurfy) conduisent à un syndrome équivalent à l'IPEX (Bennett C.L. *et al.*, 2001). L'expression de Foxp3 peut également être induite dans les cellules T naïves CD4⁺CD25⁻ par le TGF-β, convertissant ainsi ces cellules en Treg (CD25⁺CD45RB^{-/low}CTLA-4⁺, expression intracellulaire pour le CTLA-4) (Chen W. *et al.*, 2003). A l'inverse, l'expression des facteurs de transcription T-bet (associé au profil Th1) et GATA-3 (associé au profil Th2) dans les cellules T CD4⁺ activées inhibent l'expression de Foxp3 (Mantel P.Y. *et al.*, 2007; Wei J. *et al.*, 2007).

Les mécanismes par lesquels Foxp3 rend des cellules suppressives ne sont pas clairement déterminés. Néanmoins, après activation avec un anti-CD3, l'expression ectopique de Foxp3 dans les cellules T CD4⁺CD25⁻ réprime la production de cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN-γ et augmente l'expression du CD25, du CTLA-4 et du GITR (Hori S. *et al.*, 2003). L'inhibition de la production d'IL-2 et d'IFN-γ pourrait être due à l'interaction de Foxp3 avec le facteur de transcription AML1/Runx1. Foxp3 interagissant avec AML1 empêcherait la fixation d'AML1/Runx1 au niveau des promoteurs des gènes de l'IL-2 et de l'IFN-γ et donc la transcription de ces gènes (Ono M. *et al.*, 2007). De plus, Foxp3 empêche la différenciation de cellules T CD4⁺ naïves activées en cellules Th17. *In vitro*, des cellules T CD4⁺ naïves cultivées en présence d'anticorps activateurs anti-TCR et de TGF-β co-expriment les facteurs de transcription Foxp3 et RORγt (facteur de transcription nécessaire au développement des cellules Th17). *In vivo*, dans la lamina propria du petit intestin, 10% de cellules T CD4⁺RORγt⁺ expriment Foxp3. La production de l'IL-17 dans ces cellules CD4⁺Foxp3⁺RORγt⁺ est nettement moindre comparée aux cellules CD4⁺Foxp3⁻RORγt⁺. Cette diminution est au moins en partie liée à une interaction directe entre Foxp3 et RORγt empêchant ainsi l'activité de RORγt (Zhou L. *et al.*, 2008).

Les fonctions suppressives des Treg naturels

Une fois activée, les Treg naturels exercent leur fonction suppressive soit par contact direct avec « leur cellule cible », soit par la sécrétion de cytokines. Les cellules activées sont capables de produire de l'IL-10, du TGF-β et de l'IL-35. Chez l'homme, deux sous-populations de Treg Foxp3⁺ activées (par l'anti-CD3 et l'IL-2) avec des profils cytokiniques différents ont été identifiées en fonction de l'expression d'ICOS. Ainsi, les cellules ICOS⁺ inhibent la maturation des DC (absence d'augmentation du CD86) via l'IL-10 sécrétée et celle des cellules T effectrices via le TGF-β fixé à leur membrane, alors que les cellules ICOS⁻ utilisent uniquement le TGF-β membranaire. La suppression des fonctions des

cellules T effectrices via le TGF- β membranaire nécessite un contact direct entre les 2 types cellulaires (Ito T. *et al.*, 2008).

Chez la souris, les Treg CD4⁺CD25⁺ expriment constitutivement l'ARNm et la protéine IL-35, dont l'expression du gène semble régulée par Foxp3, expliquant ainsi son absence d'expression dans les cellules T effectrices. Les cellules T effectrices CD4⁺CD25⁻ cultivées en présence d'anti-CD3/CD28 et d'IL-35 ne prolifèrent pas suggérant l'effet suppresseur de cette cytokine. De plus, après coculture de Treg avec des lymphocytes T effecteurs en présence d'anti-CD3/CD28, l'IL-35 est retrouvée dans le surnageant. Cette production est plus importante que celle observée après stimulation des Treg, suggérant une potentialisation de cette production par les lymphocytes T effecteurs (Collison L.W. *et al.*, 2009; Collison L.W. *et al.*, 2007). Chez l'homme, l'IL-35 n'est pas exprimée constitutivement par les Treg et n'est pas non plus induite par une stimulation anti-CD3/CD28. En revanche, les cellules T effectrices pourraient exprimer l'IL-35 après stimulation (Bardel E. *et al.*, 2008), montrant une totale divergence entre l'homme et la souris.

Les Treg naturels sont également capables d'inhiber indirectement la prolifération et l'activation des cellules T effectrices via leurs effets sur les CPA telles que les DC. *In vitro*, en présence d'OVA, les cellules Treg CD4⁺CD25⁺ de souris DO11.10 empêchent l'agrégation des cellules T naïves CD4⁺CD25⁻ autour des DC en s'agrégeant préférentiellement autour de celles-ci via le LFA-1. Ainsi, les Treg naturels empêchent l'accès des DC aux cellules T CD4⁺ effectrices, réduisant ainsi les réponses effectrices. Les Treg interagissent également avec les DC, induisant alors une diminution d'expression du CD80 et du CD86 à la surface des DC. La diminution de ces molécules dépend du LFA-1 et du CTLA-4 (Onishi Y. *et al.*, 2008).

Outre leur fonction sur les T effecteurs et les DC, les Treg peuvent aussi inhiber les fonctions effectrices des mastocytes et des neutrophiles. Les Treg naturels inhibent la dégranulation des mastocytes *in vitro* et *in vivo* par les interactions OX40 (Treg)/OX40L (mastocyte) (Gri G. *et al.*, 2008). En présence de LPS, les Treg inhibent la production de cytokines (IL-8, IL-6 et TNF- α) par les neutrophiles et induisent leur apoptose. Ces effets suppresseurs sont en partie médiés par l'IL-10 et le TGF- β (Lewkowicz P. *et al.*, 2006). Les Treg interagissent également avec d'autres types cellulaires tels que les cellules NK (chapitre 1, E-3) ou les cellules B (Meiler F. *et al.*, 2008).

ii. Les Treg adaptatifs

Contrairement aux Treg naturels, les Treg adaptatifs sont générés en périphérie et sont spécifiques d'un antigène. Ils sont divisés en plusieurs sous-populations incluant les Tr1, les Th3 et les Treg CD8⁺. Jusqu'à présent, seuls les Tr1 ont été montrés être impliqués dans l'asthme allergique. C'est

pourquoi, nous ne décrivons que cette sous-population. Ces cellules sont également impliquées dans la tolérance des transplants et dans la régulation des réponses auto-immunes. En revanche, elles peuvent avoir un rôle néfaste dans les cancers et les maladies infectieuses chroniques.

L'induction des Tr1

Les Tr1 peuvent être générés de différentes manières. Ainsi, ils peuvent être induits *in vitro* et *in vivo* à partir de cellules T naïves soit après stimulation en présence d'IL-10 (Groux H. *et al.*, 1997) ou d'immunosuppresseurs (combinaison dexaméthasone /vitamine D3) (Barrat F.J. *et al.*, 2002), soit après stimulation avec des peptides antigéniques (Sundstedt A. *et al.*, 2003). Un traitement de cellules T CD4⁺ quiescentes avec des anticorps anti-CD3/anti-CD46 induit aussi des Tr1 (Kemper C. *et al.*, 2003). *In vitro*, des lymphocytes T naïfs cultivés de façon répétitive avec des iDC allogéniques se différencient également en cellules Tr1, et ce grâce à l'IL-10 sécrétée par les iDC (Levings M.K. *et al.*, 2005). Il a été également proposé que ces cellules puissent être générées à partir de cellules Th1 et Th2 pleinement différenciées lors de stimulations chroniques. Ces Tr1 seraient alors capables de produire uniquement de l'IL-10 (Hawrylowicz C.M. and O'Garra A., 2005). Les DC tolérogéniques produisant de grandes quantités d'IL-10 induisent aussi la différenciation de Tr1 (Chapitre 2, B-1-b-ii).

Les principales molécules exprimées par les Tr1 en fonction de leur statut d'activation

Quelque soit le statut d'activation, les Tr1 n'expriment pas Foxp3 (Vieira P.L. *et al.*, 2004). Après activation *in vitro* par l'anti-CD3/CD28, l'expression des marqueurs d'activation tels que le CD40L, CD69, CD25, CD28, CTLA-4 et HLA-DR est augmentée. A l'état quiescent, les Tr1 expriment les chaînes IL-2R α , IL-15R α (fortement), IL-2/IL-15R β et IL-2/IL-15R γ , permettant ainsi une réponse vis-à-vis de l'IL-2 et de l'IL-15. L'IL-15 induit la prolifération des Tr1, et ce même en absence d'activation via leur TCR. De plus, en combinaison avec l'IL-2, l'expansion de clones Tr1 est amplifiée (Bacchetta R. *et al.*, 2002). Une culture à long terme de clones Tr1 en présence d'IL-15 n'entraîne pas de modifications phénotypique et fonctionnelle de ces cellules (amplification de la production d'IFN- γ tout de même observée). Par conséquent, l'IL-15 est un important facteur de croissance pour les clones Tr1 *in vitro* et pourrait également représenter un facteur de survie pour les Tr1 *in vivo*. En effet, l'IL-15 maintient la survie des cellules T mémoire qui expriment constitutivement la chaîne IL-2/IL-15R β , suggérant que la fixation de l'IL-15 au récepteur IL-2/IL-15R β présent à la surface des Tr1 permettrait leur survie (Roncarolo M.G. *et al.*, 2006).

Les Tr1 non activés expriment des récepteurs de chimiokines caractéristiques des cellules Th1 et Th2. En effet, ils expriment les CXCR3 et CCR5 associés aux cellules Th1 et les CCR3, CCR4 et CCR8 (ARNm pour CCR8) associés aux cellules Th2. Ils expriment également le CCR1, CCR2, CXCR1 et CXCR4. Ainsi,

ces cellules migrent en réponse à de nombreuses chimiokines incluant CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11, CCL17, CXCL8, CXCL10 et CXCL12. Après activation via leur TCR, l'expression des récepteurs de chimiokines est modifiée. Ainsi, l'expression des récepteurs aux chimiokines CCR1, CCR3, CCR5, CXCR1 et CXCR3 est très fortement diminuée, alors que celle du CCR2 et CCR4 est réduite à moindre mesure et celle du CXCR4 non modifiée. Par conséquent, les Tr1 activés ne migrent plus qu'en réponse à un spectre restreint de cytokines incluant CCL1, CCL2, CCL17 et CXCL12 (Sebastiani S. *et al.*, 2001).

Les fonctions suppressives des Tr1

Après activation via leur TCR (activation polyclonale ou antigène spécifique), les cellules Tr1 prolifèrent peu mais produisent un panel de cytokines qui est fonction des conditions expérimentales utilisées pour les générer. La faible capacité proliférative des Tr1 activés est en partie attribuée à la production autocrine d'IL-10 puisque l'ajout d'un anticorps anti-IL-10 restaure partiellement la prolifération (Bacchetta R. *et al.*, 1994; Groux H. *et al.*, 1997). Concernant la production de cytokines, ces cellules produisent toujours de fortes quantités d'IL-10, des quantités variables de TGF- β et ne produisent jamais d'IL-4. La production de faibles quantités d'IFN- γ et d'IL-5 est observée dans certaines études (Wu K. *et al.*, 2007). Ainsi, les Tr1 régulent les réponses immunes par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β et possèdent la capacité de supprimer les réponses T naïves et mémoire *in vivo* et *in vitro* (Bacchetta R. *et al.*, 1994; Barrat F.J. *et al.*, 2002; Groux H. *et al.*, 1997; Levings M.K. *et al.*, 2001). Bien que l'activation via leur TCR soit indispensable pour l'induction de leurs fonctions suppressives, une fois activée, les Tr1 peuvent médier des activités suppressives vis-à-vis d'autres antigènes, et ce probablement via la libération locale d'IL-10 et de TGF- β (McGuirk P. *et al.*, 2002) agissant à la fois sur les CPA et les cellules T.

Les effets suppressifs des Tr1 sont partiellement ou complètement inhibés par l'ajout d'anticorps neutralisant anti-IL-10 ou anti-TGF- β (Levings M.K. *et al.*, 2005; Levings M.K. *et al.*, 2001), suggérant la présence d'autres mécanismes suppressifs. En effet, les Tr1 générés *in vitro* avec les anticorps anti-CD3/anti-CD46 expriment le granzyme B et suppriment les réponses des cellules T via un mécanisme dépendant à la fois des perforine/granzyme et de l'IL-10 (Grossman W.J. *et al.*, 2004; Kemper C. *et al.*, 2003). De plus, PD-1 et CTLA-4 sont dans certains cas importants pour les fonctions suppressives des Tr1 (Akdis M. *et al.*, 2004).

b. Les Treg dans la pathologie allergique asthmatique

i. *Le rôle des Treg dans les modèles animaux d'inflammation pulmonaire allergique*

Les premières études montrant que les Treg naturels de phénotype CD4⁺CD25⁺ étaient capables de supprimer certains paramètres de la réaction pulmonaire allergique utilisaient des modèles complexes impliquant des souris transgéniques ou des transferts de cellules à des souris receveuses déficientes en cellules T (Hadeiba H. and Locksley R.M., 2003; Jaffar Z. *et al.*, 2004; Suto A. *et al.*, 2001). Dans ce paragraphe, nous ne détaillerons que les études réalisées chez des souris immunocompétentes et non transgéniques.

Dans un modèle murin de sensibilisation et de provocations allergiques à l'OVA, le transfert par voie intraveineuse de cellules T CD4⁺CD25⁺ spécifiques d'antigène (provenant de souris DO11.10) avant les provocations allergiques réduit l'HRB, le recrutement d'éosinophiles et la production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13) dans le LBA et le tissu pulmonaire, alors que la production d'IL-10 est augmentée. Cette dernière est nécessaire à la réduction de la réponse Th2 et provient non pas des cellules T CD4⁺CD25⁺ transférées mais des cellules T CD4⁺ pulmonaires (Kearley J. *et al.*, 2005). Le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁺ par voie intratrachéale avant les provocations à l'OVA inhibe la réaction pulmonaire allergique par l'intermédiaire de la production de TGF- β et d'IL-10 par les cellules T CD4⁺CD25⁺ (Joetham A. *et al.*, 2007).

Une étude utilisant un autre modèle d'inflammation pulmonaire allergique a montré que, chez des souris C3H/HeJ, la déplétion des Treg par un anticorps anti-CD25 avant le premier contact avec l'allergène (acariens de la poussière de maison (HDM)) augmente l'HRB, le nombre d'éosinophiles dans le LBA, les taux d'IgE sériques spécifiques de l'allergène et la production de cytokines Th2 dans les poumons (surtout IL-5 et IL-13, mais aussi IL-4). Cette déplétion induit également une augmentation du nombre de mDC pulmonaires matures (augmentation de l'expression du CD86, du CD80 et du CMH II). *In vitro*, les DC CD11c⁺ pulmonaires de souris déplétées en Treg et traitées à l'HDM induisent une plus forte prolifération des cellules T, ainsi qu'une plus forte production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) comparativement aux DC pulmonaires de souris non déplétées en Treg mais traitées à l'HDM. En revanche, chez les souris A/J (souris plus sensibles au développement de l'HRB induite par l'allergène), la déplétion en Treg augmente le nombre d'éosinophiles dans le LBA, mais ne modifie ni l'HRB, ni les taux sériques d'IgE spécifiques de l'HDM, ni la production de cytokines Th2 dans les poumons, ni le nombre de mDC pulmonaires (Lewkowich I.P. *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces études réalisées dans des modèles aigus d'inflammation pulmonaire allergique montre que les Treg naturels sont impliqués dans la régulation des réponses Th2 induites par

l'allergène. Néanmoins, en fonction des études, le rôle des Treg CD4⁺CD25⁺ sur les différents paramètres de la réaction pulmonaire allergique fluctue. Ces divergences pourraient tout d'abord s'expliquer par des voies d'administration différentes mais également par un nombre variable de Treg administrés et le moment de l'administration. De plus, la nature des Treg naturels utilisés pourraient également être à l'origine de certaines divergences. En effet, les Treg naturels purifiés à partir de souris transgéniques DO11.10 peuvent être considérés comme des Treg naturels spécifiques de l'OVA. Ainsi, ces Treg transférés sont tous spécifiques de l'allergène donc peuvent tous réagir avec l'OVA entraînant alors une plus forte suppression.

Outre leur rôle régulateur lors du développement de l'inflammation bronchique induite par l'allergène, les Treg naturels sont capables d'inhiber l'inflammation pulmonaire allergique déjà établie et d'empêcher le remodelage bronchique. Ainsi, dans un modèle d'asthme chronique, le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁺ spécifiques de l'OVA (cellules provenant de souris DO11.10) par voie intraveineuse après le développement de l'inflammation pulmonaire mais avant le remodelage bronchique réduit l'inflammation Th2 et le taux de TGF- β pulmonaires mais augmente la production d'IL-10 dans les LBA et les poumons. En revanche, les taux sériques d'IgE totales et spécifiques de l'OVA et l'HRB ne sont pas modifiés. Ce transfert de cellules T CD4⁺CD25⁺ réduit également l'hypersécrétion de mucus et les dépôts pérbronchiques de collagène, deux caractéristiques du remodelage bronchique. Par contre, le transfert de cellules T CD4⁺CD25⁺ après l'initiation du remodelage bronchique n'a aucun effet sur l'ensemble des paramètres analysés dans l'étude (éosinophilie pulmonaire, sécrétion de mucus, dépôts de collagène et HRB). Ceci pourrait s'expliquer par une absence d'effet des cellules T CD4⁺CD25⁺ sur un remodelage bronchique déjà établi ou par un défaut de recrutement des cellules T CD4⁺CD25⁺ transférées dans les poumons. En effet, lorsque le transfert est effectué aussi tardivement, les cellules T CD4⁺CD25⁺ ne sont pas détectées au moment de l'analyse, suggérant un défaut de recrutement de ces cellules au niveau pulmonaire (Kearley J. *et al.*, 2008).

ii. Le rôle des Treg dans l'asthme et l'allergie chez l'homme

In vitro, les cellules T CD4⁺CD25⁻ de donneurs non allergiques stimulées par un allergène prolifèrent rapidement et produisent de l'IL-5 en l'absence de cellules T CD4⁺CD25⁺, suggérant un rôle inhibiteur des cellules T CD4⁺CD25⁺ (Ling E.M. *et al.*, 2004). Chez les sujets allergiques, les effets suppressifs des cellules T CD4⁺CD25⁺ sur les cellules T CD4⁺CD25⁻ stimulées par l'allergène sont réduits, et ce davantage chez les patients ayant une rhinite allergique active durant la saison des pollens (Grindebacke H. *et al.*, 2004; Ling E.M. *et al.*, 2004). Chez des enfants asthmatiques allergiques vis-à-vis d'acariens présents dans les poussières de maison, une réduction similaire des effets suppressifs

des T CD4⁺CD25⁺ du sang périphérique est observée comparativement à des sujets non allergiques. Cette réduction pourrait être en partie liée à une production amplifiée de TNF- α , diminuant alors l'expression de Foxp3. En effet, en présence d'anti-TNF- α , l'activité fonctionnelle des Treg naturels et l'expression de Foxp3 sont restaurées ce qui pourrait expliquer au moins en partie l'efficacité de la thérapie anti-TNF- α observée dans le traitement de l'asthme sévère chronique (Lin Y.L. *et al.*, 2008). Les cellules T CD4⁺CD25⁺ des LBA d'enfants asthmatiques réduisent moins la prolifération de cellules T effectrices et leur production de cytokines/chimiokines (IL-4, IL-13, CCL17 et CCL22) comparativement à celles des LBA de sujets contrôle (Hartl D. *et al.*, 2007). Outre la réduction de leur fonction suppressive, les Treg naturels CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-} isolés du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques sont moins efficaces dans l'induction de DC tolérogéniques comparativement aux Treg naturels de sujets contrôle. Ce défaut d'induction est lié à l'expression réduite de l'IL-10 par les Treg naturels des sujets allergiques asthmatiques et est corrélé à la sévérité de l'asthme (Nguyen K.D. *et al.*, 2009). Un traitement avec des corticostéroïdes inhalés restaure les fonctions suppressives de ces cellules et augmente l'expression de l'IL-10 et l'induction des DC tolérogéniques (Hartl D. *et al.*, 2007; Nguyen K.D. *et al.*, 2009).

Des modifications quantitatives ont également été observées chez les patients asthmatiques. Ainsi, dans les LBA d'enfants asthmatiques, le pourcentage de cellules T CD4⁺CD25⁺ et les taux d'ARNm de Foxp3 sont plus faibles comparativement à ceux trouvés dans les LBA de sujets contrôle ou d'enfants souffrant de toux chronique. Le pourcentage de T CD4⁺CD25⁺ corrèle positivement avec la VEMS (volume expiratoire maximum seconde). Un traitement des enfants par des corticostéroïdes inhalés pendant 4 semaines augmente le pourcentage de cellules T CD4⁺CD25⁺ et les taux d'ARNm de Foxp3 (Hartl D. *et al.*, 2007). La réduction de la fréquence de T CD4⁺CD25⁺ dans les LBA de ces sujets pourrait être liée à un défaut de recrutement via le CCL1. En effet, les cellules T CD4⁺CD25⁺ isolées du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques présentent des défauts de migration vis-à-vis de CCL1 mais pas vis-à-vis de CCL17 et CCL22 (trois chimiokines impliquées dans l'infiltration pulmonaire des lymphocytes Th2) (Nguyen K.D. *et al.*, 2009).

Concernant les Tr1, la balance entre les cellules Th2 et les cellules Tr1 spécifiques de l'antigène pourrait être décisive dans le développement de l'allergie. Dans le sang de sujets allergiques, la fréquence de cellules Tr1 est réduite, alors que celle des Th2 est augmentée (Akdis M. *et al.*, 2004).

5. Les mastocytes

a. Les caractéristiques générales

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires résidant dans les tissus qui répondent à des signaux de l'immunité innée et de l'immunité adaptative en libérant des médiateurs inflammatoires. Ces cellules sont essentiellement impliquées dans la pathogénèse des maladies allergiques (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006), mais aussi dans la lutte anti-parasitaire et anti-bactérienne.

Les mastocytes sont produits à partir de cellules souches pluripotentes CD34⁺. Les progéniteurs mastocytaires circulent dans le sang et se domicilient dans les tissus. Sous l'influence de facteurs locaux, et plus particulièrement du Stem Cell Factor (SCF) produit par les cellules stromales (incluant les fibroblastes et les cellules endothéliales), ces progéniteurs se différencient en mastocytes (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006).

Les mastocytes au repos expriment le récepteur du SCF (Kit), le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI), le FcγRII (CD32) et toute une variété d'autres récepteurs qui sont fonction de leur état de différenciation et de leur localisation. Ainsi, elles peuvent notamment exprimer des récepteurs du complément (C3aR et C5aR), des récepteurs de cytokines (IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-9R, IL-10R, GM-CSFR, IFN-γR) et des récepteurs de chimiokines (CCR1, CCR3, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CX₃CR1) (Juremalm M. and Nilsson G., 2005; Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006).

Les mastocytes activés libèrent des médiateurs préformés, néoformés et synthétisés. Les médiateurs préformés sont contenus dans des granules sécrétoires et libérés dans l'environnement cellulaire quelques minutes après l'activation. Ces granules contiennent notamment de l'histamine, des protéases neutres (tryptases, carboxypeptidases A et éventuellement les chymases) et des protéoglycanes (héparines et chondroïtine sulfate E). Les médiateurs néoformés sont des médiateurs lipidiques dérivés du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique. Les principaux médiateurs lipidiques des mastocytes sont les prostaglandines PGD₂ et PGE₂ et les leucotriènes LTB₄ et LTC₄ ainsi que les LTE₄ et LTD₄ issus du clivage du LTC₄ (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). Les médiateurs synthétisés sont essentiellement des cytokines et des chimiokines.

En fonction de leur contenu en protéases et plus particulièrement en tryptases et chymases, les mastocytes (MC) sont divisés en deux sous-types majeurs : les MC_T et les MC_{TC}. Les MC_T ne contiennent que de la tryptase, alors que les MC_{TC} contiennent de la tryptase et de la chymase. Les MC_{TC} prédominent dans la peau et dans la sous-muqueuse de l'intestin grêle. Les MC_T, quant à eux, prédominent dans la muqueuse de l'intestin grêle et dans les alvéoles pulmonaires (Irani A.M. *et al.*, 1989).

b. L'activation et le recrutement des mastocytes

Outre l'activation via l'agrégation des FcεRI, les mastocytes peuvent être activés par les molécules du complément C3a et C5a via les récepteurs C3aR et C5aR, par le Nerve Growth Factor (NGF) via le récepteur TRKA et par les IgG via le FcγRI induit par l'IFN-γ (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006; Tkaczyk C. *et al.*, 2002). Les mastocytes sont également activés par les ligands de TLR. Ainsi, par exemple, le mastocyte est activé par de l'ARN double brin via le TLR3, entraînant une sécrétion d'IFN de type I. Les mastocytes expriment aussi les TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 et TLR9 (Kulka M. *et al.*, 2004).

Durant l'inflammation allergique, les chimiokines CCL5, CCL11 et CCL24 produites par les cellules épithéliales bronchiques et le muscle lisse pourraient être en partie responsables du recrutement des mastocytes au niveau des poumons (Marone G. *et al.*, 2005). Outre son rôle chimiotactique, CCL11 augmente la production d'IL-13 dépendante du FcεRI (Price K.S. *et al.*, 2003). La PGD2 libérée notamment par les mastocytes durant la réponse allergique est un puissant chimioattractant pour les mastocytes mais également pour les basophiles, les éosinophiles et les cellules Th2 via son interaction avec le CRTH2 (Hirai H. *et al.*, 2001; Marone G. *et al.*, 2005).

c. Les médiateurs et les fonctions effectrices des mastocytes dans les réactions allergiques

i. *Les granules préformés*

L'histamine provoque une importante vasodilatation pouvant aboutir à une chute de la pression artérielle qui peut être fatale en cas de choc anaphylactique et augmente la perméabilité vasculaire générant ainsi un œdème. Elle induit également la contraction des muscles lisses et la sécrétion de mucus (White M.V., 1990). Cette molécule a été montrée comme facilitant la maturation des DC ainsi que leur migration vers la peau (Baumer W. *et al.*, 2008; Caron G. *et al.*, 2001), suggérant un rôle clé dans les réactions allergiques.

Les granules préformés contiennent également des protéases : la tryptase, la carboxypeptidase A et les chymases. Comme nous l'avons vu précédemment, au niveau pulmonaire, les mastocytes contenant des chymases sont peu nombreux. Les chymases sont capables d'attirer les neutrophiles, les éosinophiles et les monocytes. Dans l'asthme, la présence de chymase dans les petites bronches est corrélée positivement avec la préservation de la fonction pulmonaire des patients asthmatiques, suggérant ainsi un rôle protecteur de la chymase dans cette pathologie (Balzar S. *et al.*, 2005). De nombreuses études suggèrent un rôle de la tryptase (contenue dans les MC_T) dans l'inflammation pulmonaire allergique. Ainsi, des inhibiteurs de tryptase suppriment les réponses inflammatoires et l'HRB chez les moutons allergiques après provocation avec l'antigène et possèdent également des

effets bénéfiques chez le cochon allergique (Clark J.M. *et al.*, 1995; Sylvin H. *et al.*, 2002). De plus, l'instillation de tryptase induit une bronchoconstriction médiée par l'histamine qui est abrogée par l'administration d'un inhibiteur de tryptase chez l'homme, le mouton et le cochon d'Inde (Barrios V.E. *et al.*, 1998; Berger P. *et al.*, 1999; Molinari J.F. *et al.*, 1996). La tryptase est également impliquée dans la fibrose de par son action mitogène sur les fibroblastes et son effet stimulateur sur la synthèse de collagène, renforçant ainsi son implication dans l'asthme allergique (Levi-Schaffer F. and Piliponsky A.M., 2003). La carboxypeptidase A est quant à elle peu caractérisée. Néanmoins, elle semble être un facteur mitogène pour les fibroblastes dermiques humains (Abe M. *et al.*, 2000).

Les granules préformés contiennent aussi des protéoglycanes dont l'héparine et les chondroïtines sulfates E. La propriété principale de ces substances est leur capacité à retenir les chimiokines au niveau endothélial et tissulaire, favorisant ainsi le recrutement de leucocytes en situation inflammatoire.

D'autres médiateurs sont contenus dans ces granules tels que la sérotonine, la cathepsine G, des peroxydases, des phospholipases et la MBP (Major Basic Protein). Les fonctions de la MBP seront étudiées dans le paragraphe portant sur les éosinophiles.

ii. Les médiateurs lipidiques

Le LTC₄ et ses métabolites extracellulaires LTD₄ et LTE₄ sont les principaux leucotriènes libérés par les mastocytes activés. Ces cellules sont également capables de libérer le LTB₄, mais ce à moindre mesure (Metcalf D.D., 2008). Ces médiateurs lipidiques sont bronchoconstricteurs et augmentent la perméabilité vasculaire (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006).

Les mastocytes activés sont également une source importante de PGD₂. Outre son effet bronchoconstricteur, cette protanglandine est un puissant chimioattractant pour les éosinophiles, les basophiles, les neutrophiles et les cellules Th2 (Hirai H. *et al.*, 2001; Marone G. *et al.*, 2005; Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). De plus, elle est impliquée dans la maturation des DC et dans l'orientation de la réponse immune ultérieure en favorisant la polarisation Th2 (Gosset P. *et al.*, 2003).

Certaines populations de mastocytes représentent une source importante de PAF (Metcalf D.D., 2008), chimioattractant et activateur des éosinophiles par exemple.

iii. Les cytokines et chimiokines

Les mastocytes activés sont une source importante de TNF- α . Contrairement à la plupart des autres cytokines, celle-ci est préformée et rapidement libérée après stimulation du mastocyte. Les mastocytes activés synthétisent de nouveau du TNF- α et le sécrètent (Gordon J.R. and Galli S.J.,

1990). Cette cytokine augmente l'expression des molécules d'adhérence endothéliales et épithéliales et l'HRB (Klein L.M. *et al.*, 1989; Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006).

Les mastocytes produisent également tout un panel d'autres cytokines incluant l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-3, l'IL-4 (peu), l'IL-5, l'IL-6, l'IL-13, l'IL-16, l'IL-18, l'IL-25, les IFN de type I et le TGF- β , ainsi que des facteurs de croissance tels que le GM-CSF, le SCF et le NGF (Ikeda K. *et al.*, 2003; Marone G. *et al.*, 2005; Metcalfe D.D., 2008). De par la sécrétion de ces molécules, les mastocytes favorisent essentiellement les réponses Th2. L'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont critiques pour le développement et la survie des éosinophiles (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006), mais amplifient également la libération d'histamine et la synthèse d'IL-4 par les basophiles (Marone G. *et al.*, 2005). De même, l'IL-18 et le NGF amplifient la production de cytokines (IL-13 et d'IL-4) et la libération d'histamine par les basophiles (Sin A.Z. *et al.*, 2001; Yoshimoto T. *et al.*, 1999). L'IL-25, cytokine induisant l'expression des gènes de l'IL-4 et de l'IL-13, permet l'amplification de l'inflammation allergique (Ikeda K. *et al.*, 2003). Le SCF libéré par les mastocytes pulmonaires agit de façon autocrine en permettant la croissance, la différenciation et le recrutement d'autres mastocytes (Marone G. *et al.*, 2005). Néanmoins, les mastocytes peuvent aussi favoriser les réponses Th1. En effet, l'IL-18 joue un rôle important dans l'activation des cellules NK et dans les réponses Th1. De plus, l'IL-18 associée à l'IL-12 possède des propriétés anti-allergiques puisque cette association diminue la production d'IgE par les cellules B et la production d'IL-4 et d'IL-13 par les basophiles (Yoshimoto T. *et al.*, 1999). Les mastocytes produisent également des chimiokines incluant CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL11 et CXCL8, permettant ainsi le recrutement leucocytaire (Metcalfe D.D., 2008).

iv. Les mastocytes et la réaction allergique

Comme nous l'avons vu dans ce chapitre, les mastocytes, dont le nombre est augmenté dans les pathologies allergiques, jouent un rôle majeur dans la réaction pulmonaire allergique. Tout d'abord, après la liaison de l'allergène sur les complexes Fc ϵ RI/IgE présent à la surface du mastocyte et le pontage de ces complexes, les mastocytes ainsi activés initient la réaction d'hypersensibilité immédiate par la libération des médiateurs préformés et néoformés. Les mastocytes sont également impliqués dans la réaction retardée, et ce via la production de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance (Chapitre 2, A-2-b). Les mastocytes interviennent aussi dans le remodelage bronchique via la sécrétion de divers médiateurs incluant la tryptase, le TGF- β et le TNF- α (Tableau 3) (Okayama Y. *et al.*, 2007).

L'importance des mastocytes dans la réaction pulmonaire allergique est retrouvée dans les modèles murins d'asthme expérimental. Dans des modèles de sensibilisation en présence ou non d'adjuvant

Th2 (alum) et de provocations à l'OVA, des souris déficientes en mastocytes ne développent pas d'HRB et présentent une inflammation pulmonaire allergique considérablement réduite (éosinophilie pulmonaire, infiltrats péribronchiques et périvasculaires et hyperproduction de mucus) (Cyphert J.M. *et al.*, 2009; Gonzalo J.A. *et al.*, 2007; Kim Y.S. *et al.*, 2007; Nakae S. *et al.*, 2007). Après sensibilisation en présence d'alum et provocations à l'OVA, les souris déficientes en mastocytes présentent également une diminution du taux de TNF- α dans le LBA et des taux d'ARNm de CCL1, médiateurs jouant un rôle crucial dans la réaction pulmonaire allergique (Gonzalo J.A. *et al.*, 2007; Kim Y.S. *et al.*, 2007; Nakae S. *et al.*, 2007). Ainsi, l'administration pulmonaire d'un adénovirus produisant CCL1 restaure l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique chez les souris déficientes en mastocytes (Gonzalo J.A. *et al.*, 2007). Le transfert de mastocytes dérivés de moelle osseuse issus de souris wild-type aux souris déficientes avant la sensibilisation restaure l'HRB, l'inflammation pulmonaire allergique et les taux de TNF- α dans le LBA (Kim Y.S. *et al.*, 2007). En revanche, le transfert de mastocytes déficients en TNF- α avant l'immunisation (sans alum) ne restaure pas l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (Nakae S. *et al.*, 2007), renforçant l'importance du TNF- α libéré par les mastocytes dans la réaction pulmonaire allergique. Néanmoins, certaines études ne montrent pas de contribution des mastocytes dans le développement de l'inflammation pulmonaire allergique et de l'HRB non spécifique (Masuda T. *et al.*, 2003; Nakae S. *et al.*, 2007; Takeda K. *et al.*, 1997; Williams C.M. and Galli S.J., 2000). Dans ces travaux, il est possible qu'un protocole de sensibilisation plus fort ou l'utilisation d'une lignée différente de souris déficientes en mastocytes conduise à la réaction pulmonaire allergique par une voie d'activation indépendante des mastocytes.

6. Les éosinophiles

a. Les caractéristiques générales

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

Les éosinophiles expriment à leur surface des récepteurs de cytokines (IL-3R, IL-5R et GM-CSFR...), de chimiokines (CCR1, CCR3), du complément (C3aR, C5aR, CR1 et CR3), des Fc des IgG (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII), IgA (Fc α RI) et IgE (Fc ϵ RI et Fc ϵ RII) et des récepteurs de médiateurs lipidiques (PAF-R, DP-R,

CRTH2, LTB4-R, LTD4-R et LTE4-R). Ils expriment également des sélectines (PSGL-1 et L-sélectine) et des intégrines (LFA-1, Mac-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6, VLA-7, intégrines $\alpha 4\beta 7$). Grâce à la diversité de ces récepteurs, l'éosinophile peut être recruté et activé par une multitude de signaux (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006; Rothenberg M.E. and Hogan S.P., 2006).

Les éosinophiles activés libèrent des substances pro-inflammatoires incluant des médiateurs préformés, des médiateurs lipidiques néoformés et des médiateurs synthétisés (cytokines et chimiokines). Les médiateurs préformés, contenus dans des granules, sont essentiellement des protéines cationiques incluant la MBP, l'ECP, l'EPO et l'Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN) (Gleich G.J. and Adolphson C.R., 1986). Les médiateurs néoformés comprennent des prostaglandines (PGE2 et PGD2), le PAF et des leucotriènes (majoritairement LTC4) (Bandeira-Melo C. *et al.*, 2002; Henderson W.R. *et al.*, 1984). Ces cellules sont également capables de sécréter une grande variété d'enzymes telles que la métalloprotéinase MMP9 (Fujisawa T. *et al.*, 1999) et l'élastase (Lungarella G. *et al.*, 1992) ainsi que des dérivés oxygénés (de Andres B. *et al.*, 1990).

b. La migration des éosinophiles vers les tissus inflammés

Les éosinophiles matures quittent la moelle osseuse et sont recrutés au niveau des sites inflammatoires allergiques par l'action combinée de l'IL-5, de chimiokines et de molécules d'adhérence. Plusieurs CC chimiokines sont chimioattractantes pour les éosinophiles. Celles-ci incluent CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL24 et CCL26 (Alam R. *et al.*, 1993; Elsner J. *et al.*, 1998; Noso N. *et al.*, 1994; Ponath P.D. *et al.*, 1996; Rosenberg H.F. *et al.*, 2007). Les chimiokines CCL11, CCL24 et CCL26 sont communément appelées éotaxines, puisqu'initialement elles ont été décrites comme chimioattractants spécifiques des éosinophiles. CCL11, produite par les cellules épithéliales bronchiques et les fibroblastes en réponse à l'IL-4 et l'IL-13, agit en synergie avec l'IL-5 pour le recrutement des éosinophiles dans les poumons provoqués par l'allergène (Pope S.M. *et al.*, 2001; Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006; Simson L. and Foster P.S., 2000). De même, CCL11 joue un rôle crucial dans le recrutement des éosinophiles dans le tissu pulmonaire de patients asthmatiques (Park H.S. *et al.*, 2006; Pease J.E., 2006). Outre son rôle chimioattractant, elle promeut la production d'éosinophiles et est directement responsable de la sortie des progéniteurs d'éosinophiles dans la circulation périphérique (Palframan R.T. *et al.*, 1998; Sehmi R. *et al.*, 2003). Après provocation allergénique dans des modèles murins, CCL24 est produite plus tardivement que CCL11 (24h versus 6h) et agit avec l'IL-5 pour le développement de l'éosinophile pulmonaire et la production d'IL-13. Les interactions entre CCL24 et l'IL-13 induisent le recrutement d'éosinophiles (Rosenberg H.F. *et al.*, 2007). CCL26, produite par les cellules épithéliales en réponse à l'IL-4 et l'IL-13 semble responsable du recrutement prolongé d'éosinophiles (Blanchard C. *et al.*, 2005; Rosenberg H.F. *et al.*, 2007).

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

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

c. Les stimuli permettant la libération des médiateurs éosinophiliques

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

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

La dégranulation des éosinophiles et la libération d'ions superoxydes sont aussi induites par des cytokines et des chimiokines. En effet, *in vitro*, des éosinophiles cultivés en présence d'IL-5 libèrent de l'EDN, des ions superoxydes et du PAF. Le PAF ainsi libéré mène à la production de LTC₄ et à une augmentation du relargage d'EDN (Bartemes K.R. *et al.*, 1999). De plus, les chimiokines CCL5, CCL7, CCL11 ou CCL13 induisent la libération d'EDN, et ce via leur interaction avec CCR3 présent à la surface des éosinophiles (Fujisawa T. *et al.*, 2000).

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

d. Les médiateurs et les fonctions effectrices des éosinophiles

i. *Les granules préformés*

La MBP représente plus de 50% de la masse protéique des granules et constitue une protéine toxique contre les parasites (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). Chez les patients asthmatiques, la MBP présente dans le sérum et le LBA est corrélée avec l'HRB (Wardlaw A.J. *et al.*, 1988). Cette protéine augmente la contraction des cellules musculaires lisses en agissant comme un antagoniste endogène des récepteurs muscariniques M₂ (Costello R.W. *et al.*, 1997). La MBP induit également la libération d'histamine, de PGD₂, de TNF- α , de GM-CSF et de CXCL8 par les mastocytes dérivés du sang de cordons ombilicaux humains (Piliponsky A.M. *et al.*, 2002). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, des souris déficientes en MBP-1 développent une HRB et une inflammation pulmonaire allergique similaires aux souris wild-type sensibilisées et provoquées à l'OVA. Ces résultats suggèrent donc que la MBP-1 n'est pas indispensable au développement de l'asthme expérimental dans ce modèle (Denzler K.L. *et al.*, 2000).

L'ECP et l'EDN sont des ribonucléases permettant la destruction de virus ARN simple brin, conférant ainsi à l'éosinophile une fonction antivirale. Ces protéines sont, comme la MBP, toxiques pour les parasites (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). L'ECP est également impliqué dans la dégranulation des mastocytes et des basophiles, dans la sécrétion de mucus au niveau des voies aériennes et dans

la production de GAG et de TGF- β par les fibroblastes ainsi que dans leur migration (Piliponsky A.M. *et al.*, 2001; Venge P. *et al.*, 1999; Zagai U. *et al.*, 2007; Zagai U. *et al.*, 2009; Zheutlin L.M. *et al.*, 1984).

L'EPO génère, en présence de peroxyde d'hydrogène et d'halogénures ou de bromure, des acides hypohalogénés et de l'oxygène singulet capables de tuer des bactéries, des mycobactéries, certains helminthes ainsi que des cellules tumorales. Les substances générées à partir de l'EPO sont capables de détruire la matrice extracellulaire (Rees M.D. *et al.*, 2007), suggérant un rôle dans la destruction de l'épithélium bronchique observée lors de la phase retardée de la réaction allergique asthmatique. De plus, les taux sériques d'EPO et d'ECP chez les patients atteints de rhinite allergique sont prédictifs d'un développement ultérieur d'un asthme (Nielsen L.P. *et al.*, 2009). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, des souris déficientes en EPO développent une HRB et une inflammation pulmonaire allergique similaires aux souris wild-type sensibilisées et provoquées à l'OVA (Denzler K.L. *et al.*, 2001), suggérant que l'EPO n'est pas indispensable au développement de l'asthme expérimental.

ii. Le LTC₄, médiateur lipidique

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

iii. Les cytokines et chimiokines

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

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

iv. L'éosinophile, cellule présentatrice d'antigènes accessoire

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

v. L'importance de l'éosinophile dans l'asthme allergique

Lors de maladies allergiques, dont l'asthme, le nombre d'éosinophiles présents dans le sang périphérique est augmenté et une éosinophilie tissulaire est souvent retrouvée au niveau des sites inflammatoires associés à ces pathologies (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). Des souris déficientes en éosinophiles (souris PHIL) sensibilisées et provoquées à l'OVA présentent un défaut de recrutement des lymphocytes T effecteurs dans les poumons (probablement lié à l'absence de production de CCL17 et CCL22 par les éosinophiles), une diminution de l'HRB, des taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans le LBA et de l'accumulation de mucus, suggérant l'implication des éosinophiles dans la réaction pulmonaire allergique (Jacobsen E.A. *et al.*, 2008; Lee J.J. *et al.*, 2004). Néanmoins, des souris Δ dbl GATA elles aussi déficientes en éosinophiles ne montrent aucune modification de la production de mucus, de l'HRB et des taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) pulmonaires comparativement aux souris wild-type après sensibilisation et provocations à l'OVA (Humbles A.A. *et al.*, 2004). Hormis la différence de souches utilisée (BALB/c pour les souris Δ dbl GATA, C57BL/6 pour les souris PHIL) et de mutation/délétion réalisée pouvant entraîner d'autres modifications immunologiques, ces résultats sont difficilement explicables et soulignent la complexité du rôle des éosinophiles dans l'asthme. Néanmoins, dans un modèle d'asthme chronique (sensibilisation suivie de nombreuses provocations à l'OVA), les souris Δ dbl GATA sont protégées contre le remodelage bronchique: absence de dépôts péribronchiques de collagène et d'hyperplasie

des cellules musculaires lisses (Humbles A.A. *et al.*, 2004). Enfin, dans un modèle chronique d'inflammation pulmonaire allergique induite par un extrait allergénique de *Aspergillus fumigatus* (3 provocations allergéniques pendant trois semaines), les souris Δ dbl GATA présentent une réduction de la production de mucus et de cytokines Th2 (Fulkerson P.C. *et al.*, 2006).

7. Les basophiles

a. Les caractéristiques générales

Les basophiles quiescents sont des cellules circulantes représentant moins de 1% des leucocytes périphériques. Les basophiles se développent dans la moelle osseuse et ne sont libérés que lorsqu'ils sont pleinement matures. Ces cellules se développent à partir des cellules souches pluripotentes CD34⁺. Les étapes de différenciation médullaire ne sont pas encore établies. Néanmoins, l'IL-3 semble jouer un rôle crucial dans la maturation des basophiles (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006; Schroeder J.T., 2009).

Les basophiles circulants expriment divers récepteurs incluant des récepteurs de cytokines (récepteurs pour l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-33), de chimiokines (notamment CCR2, CCR3), du complément (CR1, CR3, CR4 et C5aR), de facteurs de croissance (GM-CSFR par exemple), des molécules d'adhérence (intégrines β 1 et β 2 par exemple) et des récepteurs aux Fc des Ig (Fc ϵ RI et Fc γ RII) (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006; Schroeder J.T., 2009).

Les basophiles activés libèrent des médiateurs inflammatoires dont les principaux sont l'histamine, le LTC₄, l'IL-4 et l'IL-13.

b. La migration des basophiles vers les tissus

Les basophiles expriment une variété de récepteurs fixant des facteurs chimiotactiques permettant ainsi leur attraction vers les sites de lésions allergiques. CCR3 est le principal récepteur de chimiokines présent à la surface des basophiles, ce qui leur permet de migrer en réponse à CCL5, CCL7, CCL11 et CCL13. CCL11 et CCL5 sont produites en réponse à l'IL-4 par les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes pulmonaires expliquant ainsi le recrutement de ces cellules au cours de la réaction inflammatoire allergique (Hirst S.J. *et al.*, 2002; Stellato C. *et al.*, 1999; Teran L.M. *et al.*, 1999). Les basophiles expriment également CCR2 et très faiblement CCR1 (Ugucioni M. *et al.*, 1997). Sous certaines conditions, CXCR4 est inductible à la surface des basophiles, rendant ainsi ces cellules sensibles à CXCL12. CXCL8 induit leur migration via sa fixation au CXCR2 (Schroeder J.T., 2009). Outre les récepteurs à chimiokines, les basophiles expriment le

récepteur CRTH2 permettant ainsi leur migration en réponse à la PGD2 (Hirai H. *et al.*, 2001), sécrétée notamment par les mastocytes activés.

Lors de la phase retardée de la réaction allergique, les basophiles circulant dans le sang migrent vers les tissus. Les mécanismes exacts permettant l'atteinte de l'organe ne sont pas encore déterminés. Néanmoins, des études *in vitro* ont permis d'obtenir des informations sur les molécules d'adhérence potentiellement impliquées (Bochner B.S. and Schleimer R.P., 2001). Par exemple, la L-sélectine interagirait avec MAdCAM-1 et CD34 présents à la surface des cellules endothéliales, initiant ainsi l'attachement à l'endothélium. L'adhérence ferme, indispensable pour la transmigration, est permise par des $\beta 1$ et $\beta 2$ intégrines et des ICAM. L'interaction de l'intégrine $\beta 1$ VLA-4 présente à la surface des basophiles avec VCAM-1 exprimé par les cellules endothéliales semble permettre la migration transendothéliale (Schroeder J.T., 2009). VCAM-1 est également responsable de la migration transendothéliale des éosinophiles et des cellules Th2 et son expression est augmentée par l'IL-4 et l'IL-13 (Bochner B.S. *et al.*, 1995). Or, les basophiles sont capables de sécréter ces deux cytokines, ce qui pourrait ainsi faciliter leur propre migration mais également celle des éosinophiles et des lymphocytes (Schroeder J.T., 2009).

c. L'activation et les fonctions effectrices des basophiles

Les basophiles peuvent être activés par différents signaux engendrant alors leur dégranulation immédiate et/ou la sécrétion ultérieure de cytokines. Nous citerons quelques exemples d'activation directe ou de potentialisation de l'activation avant d'aborder le rôle des basophiles dans la réaction allergique.

i. *Des exemples d'activation directe ou de potentialisation de l'activation*

L'activation la plus connue est celle dépendante de la ligation des Fc ϵ RI avec les IgE portant l'antigène. Suite à cette stimulation, le basophile libère des médiateurs inflammatoires tels que le LTC4, l'histamine, l'IL-4 et l'IL-13. Les molécules du complément C5a activent aussi les basophiles via le C5aR, induisant la libération d'histamine, la synthèse de LTC4 et l'expression des gènes codant l'IL-4 et l'IL-13 (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006). De même, les basophiles peuvent être activés via le TLR2 ou des récepteurs LIR (Schroeder J.T., 2009).

Outre leur effet chimiotactique, les chimiokines CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CXCL12 et CXCL8 sont capables d'induire ou de potentialiser la dégranulation des basophiles. En réponse à CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13 ou CXCL12, les basophiles non activés libèrent de l'histamine et cette sécrétion est amplifiée lors d'un pré-traitement avec de l'IL-3 (Jinquan T. *et al.*, 2000; Ugucioni M. *et al.*, 1997). En réponse à CXCL8, les basophiles activés par l'IL-3 libèrent de l'histamine (Krieger M. *et al.*,

1992). En absence de pré-traitement à l'IL-3, les basophiles sont incapables de sécréter le LTC₄ en réponse à toutes les chimiokines testées (CCL2, CCL7, CCL11 et CCL13) (Ugucioni M. *et al.*, 1997). Chez les sujets allergiques, l'expression d'IL-4 par les basophiles stimulés par l'allergène est amplifiée en présence de CCL11, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13 et CCL24, alors que CCL11 seule n'a pas d'effet (Devouassoux G. *et al.*, 1999).

ii. Les basophiles et la réaction allergique

Le rôle des basophiles dans la réaction immédiate n'est pas clairement démontré. Néanmoins, ces cellules circulantes possèdent un fort potentiel de sécrétion d'histamine et de LTC₄, suggérant que celles-ci pourraient contribuer aux symptômes associés à l'anaphylaxie systémique à la suite de piqûres d'insectes ou d'ingestion alimentaire (Golden D.B., 2007). De plus, des études chez des souris déficientes en basophiles ont montré un rôle de ces cellules dans l'anaphylaxie médiée par les IgG et non par les IgE, et ce par la sécrétion de PAF (Galli S.J. and Franco C.B., 2008; Tsujimura Y. *et al.*, 2008). De même, le PAF est impliqué dans l'anaphylaxie humaine (Vadas P. *et al.*, 2008). Néanmoins, chez l'homme, seules de petites quantités de PAF sont libérées par les basophiles humains à la suite d'une activation IgE dépendante (Lie W.J. *et al.*, 2003), suggérant une très faible contribution de ces cellules dans la libération de PAF.

Les basophiles sont présents dans la phase retardée des réactions allergiques, suggérant leur implication dans cette phase. Après provocation allergénique, ils sont présents dans les bronches de sujets asthmatiques (Gauvreau G.M. *et al.*, 2000; Liu M.C. *et al.*, 1991) et dans les poumons de patients décédés à la suite d'un asthme (Koshino T. *et al.*, 1993).

8. Les neutrophiles

a. Les caractéristiques générales

Les polynucléaires neutrophiles, leucocytes les plus abondants dans la circulation sanguine (60 à 70%), sont des cellules phagocytaires à courte durée de vie. Ils se différencient dans la moelle osseuse à partir de cellules souches myéloïdes selon un tronc commun avec les monocytes /macrophages puis en lignée indépendante sous l'influence d'un ensemble de cytokines, avec en particulier l'IL-3, le GM-CSF et le G-CSF. Après avoir quitté la moelle osseuse, la demi-vie des neutrophiles est de l'ordre de 4 à 10 heures. Lors de stimulations d'origine périphérique, ils peuvent se différencier à partir des cellules progénitrices myéloïdes sous l'influence du G-CSF, de l'IL-8 et de l'IL-17 (Theilgaard-Monch K. *et al.*, 2006).

Les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans les défenses de l'organisme contre les infections, et ce notamment contre les microorganismes à réplifications extracellulaires comme les bactéries. Grâce à leurs récepteurs du complément (CR1, CR3 et CR4) et leurs récepteurs des Fc des Ig (FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIIb (CD16), FcαR (CD89), FcεRII (CD23)), ils fixent et phagocytent les particules opsonisées par le complément et les anticorps. Les microorganismes phagocytés sont alors détruits de façon très efficace, processus appelé bactéricidie (Kobayashi S.D. *et al.*, 2003).

Suivant le type de stimulation, les neutrophiles sont capables de sécréter différentes cytokines (IL-1β, IL-1Ra, IL-3, IL-10, IL-12, TNF-α, IFN-α, TGF-β1, G-CSF, M-CSF et GM-CSF) et chimiokines (CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4, CCL19 et CCL20). La production d'IL-6 est, quant à elle, controversée (Cassatella M.A., 1995; Gasperini S. *et al.*, 1999; Lapinet J.A. *et al.*, 2000; Scapini P. *et al.*, 2000; Scapini P. *et al.*, 2001). Les neutrophiles sont également capables de néosynthétiser et de libérer des médiateurs lipidiques (PGE2, LTB4 et les thromboxanes A2 et B2) (Ford-Hutchinson A.W. *et al.*, 1980; Goldstein I.M. *et al.*, 1978; Higgs G.A. *et al.*, 1976; Zurier R.B., 1976). Ils sécrètent aussi de nombreuses protéases et des dérivés oxygénés (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle et oxygène singulet) (Kobayashi S.D. *et al.*, 2003).

b. La migration des neutrophiles vers les poumons

Comme pour toute migration trans-endothéliale, l'interaction entre les neutrophiles et les cellules endothéliales est indispensable. En cas d'inflammation tissulaire, les cellules endothéliales expriment notamment ICAM-1, permettant ainsi une adhérence ferme des neutrophiles via l'interaction entre LFA-1 et ICAM-1. La migration trans-endothéliale des neutrophiles est alors dépendante de l'expression pulmonaire de facteurs chimioattractants incluant le LTB4, les anaphylatoxines et les chimiokines CXCL1, CXCL8 et CXCL5 (Barnes P.J., 2007).

c. Les neutrophiles et la réaction allergique

Chez l'homme, les neutrophiles semblent impliqués dans la réaction allergique, et plus particulièrement dans l'asthme sévère. En effet, le nombre de neutrophiles dans les LBA de patients asthmatiques est augmenté (Lamblin C. *et al.*, 1998). De même, dans les biopsies bronchiques de patients atteints d'asthme sévère, le nombre de neutrophiles est augmenté (Wenzel S.E. *et al.*, 1999). Le recrutement de ces cellules dans les poumons pourrait être au moins en partie lié à l'expression de LTB4 et de CXCL8. Chez les sujets asthmatiques, les taux de LTB4 sont augmentés dans les LBA et les condensats d'air exhalé (Montuschi P. and Barnes P.J., 2002; Wardlaw A.J. *et al.*, 1989). Les sources cellulaires du LTB4 pourraient être les mastocytes mais également les neutrophiles déjà recrutés dans les poumons, amplifiant ainsi l'inflammation neutrophilique. Dans les

expectorations induites de patients atteints d'asthme, les taux de CXCL8 sont augmentés, avec les plus forts taux observés dans l'asthme sévère (Gibson P.G. *et al.*, 2001; Jatakanon A. *et al.*, 1999). Comme nous l'avons vu dans le paragraphe portant sur les cellules Th17, l'IL-17 peut induire la production de CXCL8 par les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses. Les neutrophiles déjà recrutés dans les poumons pourraient également être une source de CXCL8. Une fois présents dans les poumons, les neutrophiles activés pourraient produire des médiateurs moléculaires impliqués dans la réaction pulmonaire allergique tels que le LTB₄, la PGE₂ (bronchoconstricteur) et le CXCL8. Comme décrit au fil des paragraphes précédents, CXCL8 peut induire la dégranulation d'histamine par les basophiles et le LTB₄ est un puissant bronchoconstricteur et un chimioattractant pour les éosinophiles et les neutrophiles. Néanmoins, leur rôle dans le développement de l'HRB est incertain. Chez la souris BALB/c, après provocation allergénique (OVA), l'IL-1 et l'IL-18 sont responsables de l'afflux précoce de neutrophiles. La neutralisation avant la provocation à l'OVA de l'une ou l'autre de ces cytokines inhibe le recrutement de neutrophiles mais n'a aucun effet sur le développement de l'HRB, sur l'inflammation pulmonaire éosinophilique, l'hyperplasie des cellules caliciformes, les taux de cytokines du LBA (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13 et IFN- γ) et les taux sériques d'IgE et d'IgG1 spécifiques de l'OVA (Taube C. *et al.*, 2004).

9. Les macrophages alvéolaires

Que ce soit chez les sujets asthmatiques ou non asthmatiques, les macrophages sont prédominants dans les voies respiratoires et les alvéoles. Ainsi, ils occupent une position de choix pour répondre aux allergènes respiratoires et réguler l'inflammation dans les voies respiratoires.

a. Les observations sur les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques

i. *L'activation des macrophages alvéolaires via une voie dépendante des IgE*

Chez les sujets asthmatiques allergiques, l'expression du Fc ϵ R2, récepteur de faible affinité pour les IgE, est augmentée comparativement aux sujets contrôle (Melewicz F.M. *et al.*, 1982; Williams J. *et al.*, 1992), suggérant une activation possible via les IgE couplées à l'allergène. *In vitro*, en réponse aux antigènes et par l'intermédiaire des IgE, les macrophages alvéolaires sont capables de libérer des leucotriènes (LTB₄ et LTC₄), des prostaglandines (PGD₂ et PGF₂ α), le tromboxane, des anions superoxydes et des enzymes lysosomales (Fuller R.W. *et al.*, 1986; Hamid Q. *et al.*, 2003; Joseph M. *et al.*, 1980; Rankin J.A., 1989). Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, la plupart de ces médiateurs sont capables d'induire une bronchoconstriction, un recrutement cellulaire ou une altération de la perméabilité vasculaire. Toujours en réponse à une stimulation dépendante des IgE, les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques allergiques produisent davantage d'IL-6 et de

TNF- α comparativement à ceux de sujets contrôle (Gosset P. *et al.*, 1992). De plus, cette stimulation induit la production d'IL-1 β , CCL2, CCL3 et CXCL8 par les macrophages alvéolaires isolés des LBA de sujets allergiques asthmatiques et de sujets contrôle (Gosset P. *et al.*, 1999). Ainsi, les cytokines et chimiokines produites par les macrophages activés via les IgE couplées à l'antigène peuvent intervenir dans le recrutement cellulaire et dans l'activation des cellules endothéliales.

L'ensemble de ces résultats suggère un rôle effecteur des macrophages alvéolaires dans la réaction inflammatoire allergique. Toutefois, en réponse à une stimulation dépendante des IgE, les macrophages alvéolaires produisent également des cytokines anti-inflammatoires incluant l'IL-10 et l'IL-1Ra, suggérant un rôle immunorégulateur dans la réaction inflammatoire allergique. Les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques allergiques produisent autant d'IL-10 mais moins d'IL-1Ra que ceux de sujets contrôle (Gosset P. *et al.*, 1999).

ii. L'activation des macrophages via une voie indépendante des IgE

Indépendamment des IgE, les macrophages alvéolaires activés (PMA/ionophore calcique ou ionophore calcique seul) peuvent produire de l'IL-4 et du PAF (Arnoux B. *et al.*, 1980; Pouliot P. *et al.*, 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, le PAF peut par exemple contribuer au recrutement d'éosinophiles et à l'activation des mastocytes et l'IL-4 à la différenciation Th2 et à la synthèse d'IgE. Ces macrophages peuvent également libérer des facteurs permettant la libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes (Liu M.C. *et al.*, 1986). Ainsi, les macrophages alvéolaires semblent participer à la réponse Th2. Toutefois, ils sont également capables de produire et de libérer des cytokines anti-Th2. Après une culture de 24 heures, les macrophages alvéolaires isolés de LBA de sujets asthmatiques allergiques et de sujets contrôle produisent spontanément de l'IL-10 et de l'IL-12, avec des productions plus importantes par les macrophages alvéolaires de patients asthmatiques. Après stimulation au LPS, les macrophages alvéolaires produisent davantage d'IL-10 et d'IL-12p40, avec toujours une production plus importante chez les sujets asthmatiques (Magnan A. *et al.*, 1998). En revanche, dans une autre étude, après stimulation des macrophages alvéolaires par le LPS et l'IFN- γ , la production d'IL-12p70 est plus faible chez les sujets asthmatiques allergiques comparativement aux sujets contrôle (Plummeridge M.J. *et al.*, 2000). Au vu de l'ensemble de ces résultats, les macrophages alvéolaires semblent posséder une fonction double dans la réaction allergique asthmatique puisqu'ils sont capables de produire à la fois des molécules pro-Th2 et des cytokines anti-Th2. Chez les sujets atteints d'asthme moyen à sévère, une diminution de la capacité phagocytaire des macrophages alvéolaires a été observée. Celle-ci corrèle avec la diminution d'expression du CD64, molécule impliquée dans la phagocytose de particules opsonisées ou de complexes immuns (Alexis N.E. *et al.*, 2001; Fitzpatrick A.M. *et al.*, 2008).

iii. Les autres modifications phénotypiques des macrophages alvéolaires chez les sujets asthmatiques allergiques

Dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques, le nombre de macrophages alvéolaires RFD7⁺ (anticorps reconnaissant une molécule présente sur les phagocytes matures) est supérieur comparativement aux sujets non asthmatiques non allergiques. L'expression de ce marqueur diffère selon la localisation des macrophages alvéolaires. En effet, ils expriment davantage la molécule reconnue par le RFD7 dans le LBA que dans les expectorations induites chez les sujets asthmatiques allergiques, alors que l'inverse est observé chez les sujets contrôle (St-Laurent J. *et al.*, 2009). Dans les expectorations induites de patients asthmatiques allergiques, une diminution du pourcentage de macrophages alvéolaires exprimant le CD16 est observée et est associée à l'inflammation éosinophilique (Moniuszko M. *et al.*, 2007). Enfin, dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques, le nombre de macrophages alvéolaires produisant de l'IL-17 est augmenté (Song C. *et al.*, 2008).

b. Les macrophages alvéolaires dans des modèles d'asthme expérimental

Dans les modèles d'asthme expérimental, certaines études montrent un rôle bénéfique des macrophages alvéolaires alors que d'autres montrent un effet délétère.

Dans un modèle de sensibilisation et de provocation à l'OVA chez les souris BALB/c, la déplétion des macrophages alvéolaires résidents avec du clodronate avant la provocation allergénique résulte en une amplification de l'HRB, de l'inflammation éosinophilique (LBA et tissus) et des taux d'IL-4 et d'IL-5 (LBA), alors que l'IFN- γ est diminué (LBA) (Tang C. *et al.*, 2001). Ainsi, *in vivo*, les macrophages alvéolaires semblent réguler l'inflammation pulmonaire allergique en promouvant une réponse Th1. De même, chez des rats Brown Norway (souche sensible à l'allergie) sensibilisés et provoqués à l'OVA, la déplétion des macrophages alvéolaires avant la provocation allergénique amplifie légèrement l'HRB. Un transfert adoptif de macrophages alvéolaires de rats sensibilisés à l'OVA mais résistants à l'allergie (Sprague Dawley) à des rats Brown Norway sensibilisés à l'OVA et déplétés en macrophages alvéolaires empêche le développement de l'HRB à la suite de la provocation à l'OVA (Careau E. and Bissonnette E.Y., 2004). Ces résultats suggèrent une altération fonctionnelle des macrophages alvéolaires des rats Brown Norway qui participe à leur sensibilité à l'allergène. Une altération de leur capacité phagocytaire a ainsi été identifiée (Careau E. *et al.*, 2006).

Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris BALB/c, les macrophages alvéolaires sont la source majeure d'IL-17, dont l'expression est augmentée par un ou des médiateurs libérés par les mastocytes. En effet, les surnageants de mastocytes activés par des IgE et l'OVA induisent l'expression d'IL-17 par les macrophages alvéolaires. L'IL-17 produite par les

macrophages alvéolaires est nécessaire à l'inflammation pulmonaire puisque la déplétion en macrophages par du 2-chloroadénosine ou la neutralisation de l'IL-17 (anticorps neutralisant anti-IL-17) avant les provocations allergéniques réduit ou empêche de façon similaire le développement de l'HRB, l'augmentation des cellules inflammatoires dans le tissu pulmonaire et le LBA (éosinophiles, neutrophiles et macrophages) et la présence d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et d'IL-17 dans les LBA. Ces résultats suggèrent donc que les macrophages alvéolaires produisant l'IL-17 sont responsables de l'initiation de l'inflammation pulmonaire allergique (Song C. *et al.*, 2008). L'IL-17 permet également le recrutement et la survie des macrophages (Sergejeva S. *et al.*, 2005), pouvant ainsi amplifier la réponse immune. La totale contradiction avec les résultats obtenus par Tang et ses collaborateurs (Tang C. *et al.*, 2001) pourrait provenir de l'utilisation d'un agent de déplétion différent.

10. Les cellules NKT

Les cellules NKT présentent à la fois des caractéristiques de cellules NK et de cellules T conventionnelles. En fonction de leur répertoire de TCR, elles peuvent être divisées en trois types. Les cellules NKT de type 1, également nommées iNKT, expriment un TCR invariant ($V\alpha 14-J\alpha 18$ chez la souris et $V\alpha 24-J\alpha 18$ chez l'homme). Ce TCR reconnaît uniquement des antigènes glycolipidiques présentés par le CD1d, molécule proche du CMH I. Les cellules NKT de type 2 possèdent un répertoire de TCR diversifié. Ces derniers ne reconnaissent également que les antigènes présentés par le CD1d. Les cellules NKT de type 3 reconnaissent les antigènes présentés par des molécules de CMH I autres que le CD1d et par des molécules de CMH II (Meyer E.H. *et al.*, 2008). De ces trois types de cellules NKT, la contribution des iNKT dans l'HRB et dans l'asthme est la mieux caractérisée. Dans ce paragraphe, nous ne nous intéresserons qu'aux cellules iNKT.

a. Les sous-populations de cellules iNKT

Chez l'homme, la majorité des iNKT sont soit $CD4^+$, soit $CD4^-CD8^-$. Néanmoins, il existe une petite sous-population de cellules iNKT $CD8^+$. Les cellules iNKT $CD4^+$ expriment fortement l'IL-4, l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-2 et le GM-CSF et plus faiblement l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13. Les cellules iNKT $CD4^-CD8^-$ sont fortement cytotoxiques et expriment quasi-uniquement le TNF- α et l'IFN- γ (Gumperz J.E. *et al.*, 2002; Kim C.H. *et al.*, 2002). Chez la souris, la majorité des cellules iNKT sont également $CD4^+$ ou $CD4^-CD8^-$. Les cellules iNKT $CD4^+$ produisent plus d'IL-4 que les cellules iNKT $CD4^-CD8^-$ mais sont moins efficaces dans l'immunité tumorale (Crowe N.Y. *et al.*, 2005). Une sous-population de cellules iNKT n'exprimant pas le NK1.1 a été mise en évidence. Cette sous-population est abondante dans les poumons et produit de faibles quantités d'IL-4 et d'IFN- γ et de grandes quantités d'IL-17. La production d'IL-17 par ces cellules est observée après une stimulation avec le ligand synthétique α -

GalCer ou des ligands naturels (LPS ou glycolipides dérivés *Sphingomonas wittichii* et *Borrelia burgdorferi*). La production d'IL-17 par ces cellules est impliquée dans la neutrophilie pulmonaire. Chez des souris déficientes en $J\alpha 18$ (souris spécifiquement déficientes en cellules iNKT), après instillation d' α -GalCer ou de LPS, le nombre de neutrophiles présents dans le LBA est significativement réduit comparativement à celui de souris wild-type ayant subi le même traitement, suggérant un rôle des cellules iNKT dans le recrutement des neutrophiles. De plus, la neutrophilie pulmonaire est abrogée si un anticorps neutralisant anti-IL-17 est administré avant l'instillation d' α -GalCer (Michel M.L. *et al.*, 2007).

b. L'implication des cellules iNKT dans l'asthme expérimental

Les cellules iNKT sont nécessaires au développement de l'HRB et de l'inflammation pulmonaire allergique. En effet, après sensibilisation et provocations à l'OVA, les souris déficientes en CD1d (souris déficientes en iNKT et NKT de type 2) ou en $J\alpha 18$ ne développent pas d'HRB et présentent un nombre diminué d'éosinophiles dans le LBA et des taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA réduits. Le transfert adoptif de cellules iNKT isolées de souris wild-type à des souris déficientes en $J\alpha 18$ avant les provocations allergéniques restaure pleinement la réaction pulmonaire allergique (Akbari O. *et al.*, 2003; Lisbonne M. *et al.*, 2003). En revanche, le transfert adoptif de cellules iNKT isolées de souris déficientes en IL-4 et en IL-13 aux souris déficientes en $J\alpha 18$ ne restaure pas l'HRB (Akbari O. *et al.*, 2003), montrant l'implication de l'IL-4 et de l'IL-13 produites par les iNKT. L'activation des cellules iNKT conduisant à la production d'IL-4 et d'IL-13 est dépendante du CD1d puisque l'administration d'un anticorps bloquant anti-CD1d chez des souris wild-type durant les phases de sensibilisation et de provocations à l'OVA empêche le développement de l'inflammation pulmonaire allergique (Lisbonne M. *et al.*, 2003). Très récemment, une sous-population de cellules iNKT $CD4^+$ IL-17RB⁺ (récepteur de l'IL-25), représentant environ 25% des cellules iNKT $CD4^+$ spléniques, a été décrite comme responsable de l'induction de l'HRB et de l'inflammation pulmonaire. Cette sous-population est présente dans les poumons de souris naïves et de souris sensibilisées et provoquées à l'OVA et est amplifiée après un traitement à l'IL-25 (cytokine impliquée dans les réponses Th2) (Stock P. *et al.*, 2009; Terashima A. *et al.*, 2008). Chez des souris déficientes en $J\alpha 18$ sensibilisées à l'OVA, le transfert adoptif de cellules iNKT IL-17RB⁺ avant les provocations à l'OVA restaure l'HRB et l'inflammation pulmonaire, contrairement au transfert de cellules iNKT IL-17RB⁻. *In vitro*, après stimulation avec des DC chargées en α -GalCer, les iNKT $CD4^+$ IL-17RB⁺ produisent de plus grandes quantités d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 et de plus faibles quantités d'IFN- γ comparativement aux cellules iNKT $CD4^+$ IL-17RB⁻. En présence d'IL-25, la production de cytokines Th2 par les cellules iNKT $CD4^+$ IL-17RB⁺ est amplifiée (Stock P. *et al.*, 2009). De plus, cette sous-population exprime sept fois plus l'ARNm du CCR4 que les

cellules iNKT CD4⁺ IL-17RB⁻ et produit des chimiokines Th2 (CCL17, CCL22, CCL6) et ECF-L (Eosinophil Chemotactic Factor-L) après activation *in vitro* avec l'IL-25 (Terashima A. *et al.*, 2008). Les modalités d'activation des cellules iNKT lors de la réaction pulmonaire allergique ne sont pas clairement définies. En réponse à l'antigène exogène inhalé, les cellules Th2 spécifiques de cet antigène induisent un milieu inflammatoire dans les poumons qui pourrait conduire à l'activation des cellules iNKT. Ainsi, l'inflammation induirait l'expression de glycolipides endogènes qui activeraient alors les cellules iNKT pulmonaires (Meyer E.H. *et al.*, 2008). Les iNKT sont également capables de reconnaître des lipides retrouvés sur les pollens (Agea E. *et al.*, 2005; Spinozzi F. and Porcelli S.A., 2007).

Bien que ces études montrent un rôle essentiel des cellules iNKT dans le développement de la réaction pulmonaire allergique, d'autres études montrent que sous certaines conditions d'activation les cellules iNKT peuvent inhiber la réaction pulmonaire allergique, et ce via un mécanisme dépendant de l'IFN- γ . Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris BALB/c et C57BL/6, l'administration par voie intraveineuse, intranasale ou intrapéritonéale d' α -GalCer une heure avant ou 24 heures après la première provocation à l'OVA inhibe le développement de l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique. L'IFN- γ est nécessaire à l'effet protecteur induit par le traitement à l' α -GalCer puisque l'administration d'un anticorps anti-IFN- γ l'abroge. L' α -GalCer augmente à la fois la fréquence des cellules iNKT pulmonaires et leur capacité à produire de l'IFN- γ (Hachem P. *et al.*, 2005; Matsuda H. *et al.*, 2005). A l'inverse, l'activation des cellules iNKT par une administration continue d' α -GalCer (pompe Alzet) dès le début de la sensibilisation exacerbe l'éosinophilie du LBA et les taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA, suggérant un rôle différentiel des cellules iNKT au cours de la phase de sensibilisation ou de la phase effectrice (Morishima Y. *et al.*, 2005).

c. L'implication des cellules NKT chez les sujets asthmatiques

Dans le sang périphérique, les cellules iNKT (V α 24⁺) sont présentes en moindre quantité chez les sujets asthmatiques comparativement aux sujets contrôle non allergiques (Ikegami Y. *et al.*, 2004). Cette diminution pourrait être attribuée à la migration de ces cellules vers les poumons, où elles aggraveraient l'asthme via leur production d'IL-4 et d'IL-13. Plusieurs études ont effectivement montré une augmentation de la fréquence des cellules iNKT dans les LBA (Akbari O. *et al.*, 2006; Pham-Thi N. *et al.*, 2006). Au niveau des biopsies bronchiques, les cellules NKT sont également présentes en condition basale chez les sujets asthmatiques allergiques, alors qu'elles ne sont pas retrouvées chez les sujets contrôle. Une provocation allergique entraîne une augmentation de leur fréquence (Reynolds C. *et al.*, 2009). Chez les sujets atteints d'asthme sévère, le pourcentage de cellules NKT (CD56⁺CD3⁺) est augmenté dans les expectorations induites (13.52%) comparativement

aux sujets atteints d'asthme moyen (2.86%) et aux sujets contrôle (2.14%) (Hamzaoui A. *et al.*, 2006), suggérant que le nombre de cellules NKT pourrait varier en fonction de la sévérité de la pathologie. La même observation a été réalisée au niveau des LBA (Matangkasombut P. *et al.*, 2009). Toutefois, bien que la différence soit significative entre les sujets atteints d'asthme sévère et les sujets atteints d'asthme bien contrôlé, une hétérogénéité est présente au sein des groupes et les cellules iNKT ne sont pas toujours détectées dans les LBA de sujets atteints d'asthme moyen (Vijayanand P. *et al.*, 2007). Outre les modifications quantitatives observées, les cellules iNKT pulmonaires de sujets asthmatiques produisent rapidement de l'IL-4 et de l'IL-13 mais pas d'IFN- γ après stimulation par l' α -GalCer (Akbari O. *et al.*, 2006).

11. Les cellules NK

Les cellules NK ayant été amplement décrites dans le chapitre 1, nous ne nous focaliserons dans ce paragraphe que sur les études murines et humaines qui suggèrent leur participation dans l'inflammation pulmonaire allergique.

a. Les arguments en faveur de l'implication des cellules NK dans l'inflammation pulmonaire allergique chez la souris

Deux études réalisées chez les souris C57BL/6 ont évalué l'effet d'une déplétion des cellules NK par l'administration d'un anticorps anti-NK1.1 sur l'inflammation éosinophilique associée à une réponse Th2 vis-à-vis de l'OVA (Korsgren M. *et al.*, 1999) ou de l'ambroisie (Walker C. *et al.*, 1998). La déplétion des cellules NK dès la phase de sensibilisation à l'OVA et tout au long du protocole réduit considérablement les infiltrats péribronchiques et périvasculaires de lymphocytes T et d'éosinophiles, ainsi que l'hyperplasie des cellules caliciformes. La diminution de l'éosinophilie pulmonaire pourrait s'expliquer par une diminution des taux d'IL-5 dans le LBA. Les taux d'IL-12 sont également considérablement réduits, alors que ceux d'IFN- γ semblent augmentés. Les taux sériques d'IgE et d'IgG2a spécifiques de l'OVA sont aussi diminués et les splénocytes de souris ayant reçu l'anti-NK1.1 produisent moins d'IL-4 après restimulation *in vitro* avec l'OVA. Ces résultats suggèrent donc que la déplétion des cellules NK avant l'immunisation réduit la réponse Th2. En revanche, l'administration de l'anti-NK1.1 lors la phase de provocations à l'OVA n'atténue pas la réponse Th2 (Korsgren M. *et al.*, 1999). Dans un modèle d'inflammation péritonéale allergique aux antigènes d'ambroisie, le nombre de cellules NK (NK1.1⁺CD3⁻), NKT (NK1.1⁺CD3⁺), lymphocytes T, éosinophiles et macrophages, ainsi que les taux d'IL-4, d'IL-5 et d'IFN- γ sont augmentés dans le lavage péritonéal. L'augmentation des taux d'IL-5 est attribuée à l'augmentation du nombre de cellules T, NKT et NK produisant de l'IL-5. La déplétion des cellules NK par l'anti-NK1.1 avant la provocation à l'ambroisie ou avant les phases de sensibilisation et de provocation à l'ambroisie réduit fortement l'éosinophilie

et les taux d'IL-5, d'IL-4 et d'IFN- γ dans le lavage péritonéal, alors que le nombre de macrophages est augmenté. Ainsi, comme dans le modèle précédent, les cellules NK semblent participer au développement des infiltrats éosinophiliques via la production d'IL-5. Dans ce modèle, la déplétion par l'anti-NK1.1 déplete également la moitié des cellules NKT (Walker C. *et al.*, 1998). En effet, le NK1.1 n'est pas un marqueur sélectif des cellules NK. Il est retrouvé sur certaines populations de lymphocytes T incluant les cellules NKT. Or, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, les cellules NKT sont impliquées dans le développement de la réaction pulmonaire allergique (Akbari O. *et al.*, 2003; Lisbonne M. *et al.*, 2003; Stock P. *et al.*, 2009) ce qui rend difficile l'interprétation de ces deux études sur le rôle des cellules NK.

Les cellules NK murines expriment l'ARNm du Fc γ RIII mais pas celui du Fc ϵ RI. Elles peuvent être activées par les IgE via le Fc γ RIII (CD16) et ainsi produire de grandes quantités d'IFN- γ et induire l'ADCC et l'expression des ARNm du TNF- α , GM-CSF et CCL3. Ainsi, les cellules NK pourraient contribuer au recrutement des lymphocytes T et des éosinophiles via la production de CCL3 après leur stimulation via les IgE (Arase N. *et al.*, 2003).

b. Les arguments en faveur de l'implication des cellules NK chez les sujets asthmatiques allergiques

i. *Les modifications quantitatives et phénotypiques*

Dans le sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques présentant ou non une exacerbation de leur asthme, les cellules NK sont présentes en plus grand nombre (Lin S.J. *et al.*, 2003; Timonen T. and Stenius-Aarniala B., 1985). Chez les enfants asthmatiques, aucune modification significative du nombre de cellules NK du sang périphérique n'a été observée (Chou C.C. *et al.*, 1999). Cependant, l'expression d'ICAM-1 (CD54) et du CD62L à la surface des cellules NK est diminuée lors d'une exacerbation, suggérant une modification de la population de cellules NK (Lin S.J. *et al.*, 2003). De plus, dans le sang périphérique d'adultes asthmatiques allergiques, les cellules NK2 sont prédominantes, alors que chez les sujets non asthmatiques non allergiques les cellules NK1 prédominent (Wei H. *et al.*, 2005). Enfin, la population CD56^{bright}CD16^{+/-}, connue pour sa forte production d'IFN- γ , est diminuée chez les sujets allergiques : 4,3% des cellules NK totales chez les sujets allergiques contre 7,5% chez les sujets non allergiques (Scordamaglia F. *et al.*, 2008). Dans les expectorations induites, la proportion de cellules NK CD16⁺ est réduite chez les sujets asthmatiques comparativement aux sujets contrôle non allergiques (Louis R. *et al.*, 1997), suggérant une diminution de l'activité cytotoxique.

ii. Les modifications fonctionnelles

Dans le sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques, les cellules NK présentent des capacités cytotoxiques accrues (Di Lorenzo G. *et al.*, 2001; Timonen T. and Stenius-Aarniala B., 1985) qui sont réduites après une provocation allergénique (Jira M. *et al.*, 1988). Toutefois, aucune modification significative des capacités cytotoxiques des cellules NK ainsi que de leur production d'IFN- γ n'est observée entre les enfants asthmatiques et les sujets contrôle (Chou C.C. *et al.*, 1999). Chez les sujets allergiques adultes, le dialogue entre les cellules NK et les DC est moins efficace. Les cellules NK de sujets allergiques produisent moins d'IFN- γ après interaction avec des DC allogéniques et présentent des capacités moindres de maturation de DC et de lyse des iDC allogéniques (Scordamaglia F. *et al.*, 2008).

iii. Les effets des corticostéroïdes et de l'immunothérapie spécifique de l'allergène

In vitro, le propionate de fluticasone (corticostéroïde) diminue la lyse des cellules cibles K562 par les cellules NK de sujets asthmatiques allergiques et de sujets contrôle. Après ce traitement, les cellules NK de sujets asthmatiques allergiques ne présentent plus de cytotoxicité accrue comparativement aux cellules NK de sujets contrôle (Di Lorenzo G. *et al.*, 2001). Chez des sujets allergiques au pollen de graminées, une immunothérapie spécifique diminue l'activité cytotoxique des cellules NK isolées du sang périphérique vis-à-vis des cellules cibles K562 (Sin B. *et al.*, 1996).

C. LES MEDIATEURS SOLUBLES DE LA REACTION INFLAMMATOIRE ALLERGIQUE

Les propriétés des médiateurs préformés et néoformés libérés par mastocytes, éosinophiles et basophiles ayant déjà été décrites précédemment, nous nous focaliserons ici sur les cytokines et les chimiokines produites par un grand nombre de cellules.

1. Les cytokines

En fonction de leur activité fonctionnelle, les cytokines peuvent être subdivisées en 4 groupes : les cytokines pro-Th2, les cytokines associées à l'inflammation, les cytokines associées au remodelage et les cytokines immunorégulatrices.

Les cytokines présentes lors de l'inflammation pulmonaire allergique étant très nombreuses, nous ne décrivons que les principales. La TSLP dont l'expression de l'ARNm est augmentée dans les bronches de sujets asthmatiques et dont l'implication dans la réaction pulmonaire allergique a été montrée ne sera pas décrite. Néanmoins, son rôle dans la polarisation Th2 via son action sur les DC a été cité dans le paragraphe portant sur les DC (Chapitre 2, B-1-b-ii). L'implication de l'IL-17 dans cette

pathologie ayant été décrite dans le paragraphe portant sur les lymphocytes Th17 (Chapitre 2, B-3-b), cette cytokine ne sera pas abordée ci-dessous.

a. Les cytokines pro-Th2

i. L'IL-4

L'IL-4 est la cytokine clé impliquée dans le développement de la réaction pulmonaire allergique puisqu'elle permet en particulier la production d'IgE par les lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th2. Elle est produite par de nombreux types cellulaires (lymphocytes T CD4⁺, cellules NK, granulocytes...) et agit sur de nombreuses cibles cellulaires incluant les lymphocytes B, les lymphocytes Th2, les monocytes, les mastocytes et les cellules de structure.

La mise en évidence du rôle de l'IL-4 dans la réaction pulmonaire allergique

Chez la souris, l'IL-4 est une cytokine déterminante pour le développement des réponses Th2 (Kopf M. *et al.*, 1993). L'administration d'un récepteur soluble de l'IL-4 après la sensibilisation systémique et avant la première provocation allergénique réduit les infiltrats cellulaires périvasculaires et péribronchiques et le nombre de cellules totales présentes dans le LBA. Ces réductions peuvent être attribuées à une diminution du nombre d'éosinophiles présents dans les poumons et le LBA. L'HRB et les taux sériques d'IgE spécifiques de l'allergène ne sont pas modifiés (Henderson W.R., Jr. *et al.*, 2000). En revanche, la neutralisation de l'IL-4 au cours de la sensibilisation systémique empêche le développement de l'HRB mais pas celui de l'éosinophilie pulmonaire. Ces résultats suggèrent donc que l'IL-4 est impliquée dans l'établissement de la cascade de réponses nécessaire au développement de l'HRB (Corry D.B. *et al.*, 1996). Des souris déficientes en IL-4 sensibilisées et provoquées à l'OVA développent une HRB qui est légèrement inférieure à celle observée chez les souris wild-type (Walter D.M. *et al.*, 2001).

L'action de l'IL-4 sur la production d'IgE par le lymphocyte B et sur l'expression des récepteurs aux IgE

L'IL-4 exerce son action via sa fixation sur un récepteur hétérodimérique composé de la chaîne IL-4R α et de la chaîne γ c. Cette cytokine est nécessaire à la croissance et la différenciation des cellules B (Tangye S.G. *et al.*, 2002). Elle augmente l'expression des molécules de CMH II à leur surface, augmentant ainsi leur capacité à présenter l'allergène aux cellules Th2 (Hamid Q. and Tulic M., 2009; Tangye S.G. *et al.*, 2002). L'IL-4 induit également la commutation isotypique de l'IgM vers l'IgE. Elle potentialise aussi la production d'IgE et amplifie les réponses IgE dépendantes par l'augmentation des récepteurs aux IgE à la surface des cellules inflammatoires présentes au niveau des bronches

(Gascan H. *et al.*, 1991; Gascan H. *et al.*, 1991; Vercelli D. *et al.*, 1988). L'IFN- γ , cytokine Th1, supprime la commutation isotypique vers l'IgE des lymphocytes B activés par l'IL-4 (Xu L. and Rothman P., 1994). Elle inhibe également l'expression induite par l'IL-4 des ARNm du récepteur de faible affinité pour les IgE (CD23) dans les cellules B (Denoroy M.C. *et al.*, 1990).

L'action de l'IL-4 sur les lymphocytes T CD4⁺

Comme nous l'avons vu dans la partie portant sur les lymphocytes Th1 et Th2, l'IL-4 intervient dans l'initiation de la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2 (Hsieh C.S. *et al.*, 1992; Swain S.L. *et al.*, 1990). Cette cytokine empêche également l'apoptose des cellules T quiescentes isolées de ganglions lymphatiques, et ce en partie par le maintien du taux de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Vella A. *et al.*, 1997). Parallèlement à ces effets pro-Th2, l'IL-4 exerce une fonction inhibitrice de la réponse Th1 (Hsieh C.S. *et al.*, 1992).

L'action de l'IL-4 sur les monocytes et les DC

In vitro et probablement *in vivo*, l'IL-4 associée au GM-CSF permet la génération de mDC à partir de monocytes (Dauer M. *et al.*, 2003; Vermaelen K. and Pauwels R., 2005). Cette cytokine augmente également la production de chimiokines pro-Th2 telles que CCL17 et CCL22 par les DC (Xiao T. *et al.*, 2003; Yamashita U. and Kuroda E., 2002).

L'action de l'IL-4 sur les mastocytes

Lors d'une culture de mastocytes avec des IgE et du SCF, la présence d'IL-4 augmente la sécrétion d'histamine, ainsi que la génération et la sécrétion de PGD2 et de leucotriènes (Hsieh F.H. *et al.*, 2001; Yamaguchi M. *et al.*, 1999). L'augmentation de la sécrétion de leucotriènes observée en présence d'IL-4 est due à l'induction de l'expression de l'enzyme C4 synthase (Hsieh F.H. *et al.*, 2001). De plus, des mastocytes cultivés uniquement en présence d'IL-4 puis stimulés avec des anti-IgE induisent la sécrétion d'histamine, de PGD2 et de LTC4. L'IL-4 conduit également à une augmentation de l'expression du Fc ϵ RI et potentialise l'augmentation de l'expression du Fc ϵ RI induite par les IgE (Toru H. *et al.*, 1996; Yamaguchi M. *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que, lors de la phase de sensibilisation, l'IL-4 et les IgE agissent en synergie sur le mastocyte pour permettre une sécrétion optimale des médiateurs lors de la phase effectrice de la réaction allergique.

L'action de l'IL-4 sur les cellules de structure

L'IL-4 induit l'expression de CCL11 par les fibroblastes de la muqueuse nasale et pulmonaire (Nonaka M. *et al.*, 2004; Teran L.M. *et al.*, 1999), les cellules épithéliales bronchiques (Stellato C. *et al.*, 1999) et les cellules musculaires lisses (Hirst S.J. *et al.*, 2002). Cette cytokine active les cellules

endothéliales, entraînant l'expression de VCAM-1 à leur surface. Ainsi, les lymphocytes T, les éosinophiles et les basophiles adhèrent plus fermement à l'endothélium via l'interaction entre VCAM-1 et VLA-4 (Nakajima H. *et al.*, 1994; Schleimer R.P. *et al.*, 1992; Thornhill M.H. *et al.*, 1990), ce qui favorisera leur extravasation vers le site allergique. L'IL-4 stimule également la production de mucines par les cellules épithéliales bronchiques, contribuant à la production excessive de mucus observée lors de l'inflammation pulmonaire allergique (Dabbagh K. *et al.*, 1999).

ii. L'IL-13

L'IL-13 présente des activités biologiques et des propriétés structurales similaires à celle de l'IL-4. Cette cytokine est principalement produite par les lymphocytes Th2, les lymphocytes Th0 et T CD8⁺ (de Waal Malefyt R. *et al.*, 1995), mais aussi par d'autres types cellulaires incluant les basophiles (Schroeder J.T., 2009), les mastocytes (Marone G. *et al.*, 2005), les éosinophiles (Rothenberg M.E. and Hogan S.P., 2006), les cellules musculaires lisses (Grunstein M.M. *et al.*, 2002) et les cellules NKT (Akbari O. *et al.*, 2003).

L'IL-13 se fixe sur un récepteur hétérodimérique composé de la chaîne IL-4R α et de la chaîne IL-13R α . La chaîne IL-4R α commune aux récepteurs de l'IL-4 et l'IL-13 explique l'existence d'activités biologiques communes entre ces deux cytokines telles que la régulation de la prolifération et de la commutation isotypique des lymphocytes B (Aversa G. *et al.*, 1993; de Vries J.E., 1998). Contrairement à l'IL-4, l'IL-13 n'induit pas la différenciation des lymphocytes Th2 (Sornasse T. *et al.*, 1996).

L'IL-13 est capable d'induire certaines caractéristiques physiopathologiques de la réaction allergique indépendamment de l'IL-4. Des souris déficientes en IL-13 sensibilisées et provoquées à l'OVA ne développent pas d'HRB et ne surproduisent pas de mucus. Néanmoins, ces souris présentent des taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA similaires aux souris wild-type. Les cellules ganglionnaires de ces souris déficientes en IL-13 sensibilisées et provoquées à l'OVA restimulées *in vitro* par l'OVA produisent des quantités similaires d'IL-4 et d'IL-5 comparativement à celles de souris wild-type (Walter D.M. *et al.*, 2001). Chez des souris sensibilisées à l'OVA en présence ou non d'adjuvant, la neutralisation de l'IL-13 par l'administration d'IL-13R α -Fc soluble au moment des provocations à l'OVA réduit l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (éosinophilie du LBA, l'hyperplasie des cellules caliciformes) (Grunig G. *et al.*, 1998). L'administration de cette même protéine de fusion au moment de la deuxième et dernière provocation à l'OVA empêche le développement de l'HRB et l'hyperplasie des cellules caliciformes, mais n'a aucun effet sur l'éosinophilie du LBA (Wills-Karp M. *et al.*, 1998). Chez des souris transgéniques exprimant constitutivement l'IL-13 dans les poumons, une hypersécrétion de mucus et une augmentation de la résistance des voies aériennes sont observées

en absence d'exposition allergénique (Zhu Z. *et al.*, 1999). L'administration quotidienne par voie intratrachéale d'IL-13 à des souris naïves induit une HRB, une éosinophilie du LBA, une augmentation de la production de mucus et des taux d'IgE sériques (Wills-Karp M. *et al.*, 1998).

Comme l'IL-4, l'IL-13 induit la production de CCL11 par les cellules épithéliales (Li L. *et al.*, 1999) et l'expression de VCAM-1 par les cellules endothéliales (Bochner B.S. *et al.*, 1995), permettant ainsi l'adhérence et l'extravasation des cellules T et des éosinophiles. Outre son rôle indirect dans le recrutement des éosinophiles, l'IL-13 agit directement sur ces cellules en induisant l'expression du CD69 et en prolongeant leur survie (de Vries J.E., 1998). Ainsi, l'IL-13 semble être impliquée dans le développement mais également dans le maintien de la réaction allergique. En effet, l'administration d'IL-13R- α soluble à des souris présentant une réaction pulmonaire allergique établie inhibe l'HRB et diminue l'inflammation pulmonaire allergique (Taube C. *et al.*, 2002). L'IL-13 est également impliquée dans le remodelage bronchique puisque des souris surexprimant l'IL-13 de façon constitutive dans les poumons présentent des dépôts de collagène, une fibrose subépithéliale et une métaplasie des cellules caliciformes (Zhu Z. *et al.*, 1999). L'un des mécanismes par lequel l'IL-13 induit la fibrose est la stimulation et l'activation de la production de TGF- β (Lee C.G. *et al.*, 2001).

iii. L'IL-9

L'IL-9 est une cytokine Th2 dont l'expression est régulée par une variété de médiateurs, et plus particulièrement par l'IL-2 qui stimule sa production. Cette cytokine est produite principalement par les lymphocytes T helper, mais également par d'autres types cellulaires incluant les mastocytes, les éosinophiles et les neutrophiles (Hamid Q. and Tulic M., 2009). *In vitro*, l'IL-9 amplifie la production d'IgE induite par l'IL-4 par les cellules B humaines et murines (Dugas B. *et al.*, 1993). L'IL-9 stimule aussi la production de protéases par les mastocytes et induit l'expression du Fc ϵ RI à leur surface. Ainsi, outre son rôle dans la potentialisation de la production d'IgE, l'IL-9 initie les mastocytes à répondre à une provocation allergénique via l'augmentation de l'expression du Fc ϵ RI et la production de médiateurs pro-inflammatoires (Hamid Q. and Tulic M., 2009). L'IL-9 est également un facteur de croissance pour les lymphocytes T et est capable de stimuler la prolifération des cellules T activées (Houssiau F.A. *et al.*, 1993; Schmitt E. *et al.*, 1989; Uyttenhove C. *et al.*, 1988). Enfin, cette cytokine a également pour cible cellulaire les éosinophiles et les cellules épithéliales. L'IL-9 permet la survie des éosinophiles en empêchant leur apoptose et induit l'expression de la chaîne IL-5R α . En combinaison avec l'IL-3 et l'IL-5, elle amplifie la différenciation des cellules CD34⁺ en éosinophiles (Gounni A.S. *et al.*, 2000). L'IL-9 induit la production de CCL11 par les cellules pulmonaires (Dong Q. *et al.*, 1999), permettant ainsi l'attraction des éosinophiles. Concernant les cellules épithéliales et plus

particulièrement les cellules caliciformes, l'IL-9 induit la production de mucus chez l'homme et chez la souris (Louahed J. *et al.*, 2000; Vermeer P.D. *et al.*, 2003).

L'étude de biopsies bronchiques de patients asthmatiques montre une corrélation entre l'HRB et la surexpression de l'IL-9 et de son récepteur au niveau des cellules épithéliales bronchiques. Cette surexpression précéderait l'afflux d'éosinophiles et le développement de l'asthme (Tsicopoulos A. *et al.*, 2004). *In vivo*, des souris naïves exprimant constitutivement l'IL-9 dans tous les tissus présentent une surproduction de mucus par les cellules caliciformes (Louahed J. *et al.*, 2000), une éosinophilie et les chimiokines CCL3 et CCL11 dans le LBA et une augmentation de l'expression des ARNm de CCL2, CCL7, CCL11 et CCL12 et des protéines CCL2 et CCL11 dans le tissu pulmonaire (Dong Q. *et al.*, 1999). Après sensibilisation et provocations allergéniques, ces souris transgéniques développent des réponses Th2 exacerbées incluant l'HRB, les taux sériques d'IgE et l'éosinophilie tissulaire comparativement à des souris wild-type sensibilisées et provoquées avec le même allergène (McLane M.P. *et al.*, 1998).

iv. L'IL-25

L'IL-25, également connue sous le nom d'IL-17E, est produite par les cellules Th2 (Fort M.M. *et al.*, 2001), les mastocytes (Ikeda K. *et al.*, 2003), les basophiles et les éosinophiles (Wang Y.H. *et al.*, 2007). L'expression du récepteur à l'IL-25 semble quasi-restreinte aux cellules Th2, faisant de ces cellules l'unique cible de l'IL-25. En effet, alors que les transcrits de ce récepteur ont été étudiés dans la quasi-totalité des cellules immunitaires, ceux-ci ont été détectés dans les cellules Th2 mémoire activées ou non, mais également à très moindre mesure dans les basophiles activées (IL-3 ou IL-3/fMLP). L'expression membranaire de ce récepteur est, quant à elle, observée sur les cellules Th2 mémoire activées (anti-CD3/CD28, IL-15/IL-7 ou activées en présence de DC pulsées avec la TSLP) (Wang Y.H. *et al.*, 2007) mais également sur une sous-population de cellules iNKT (Stock P. *et al.*, 2009; Terashima A. *et al.*, 2008).

Une expression élevée des ARNm de l'IL-25 et l'IL-25R est observée dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques et de sujets atteints de dermatite atopique (Wang Y.H. *et al.*, 2007). Dans un modèle de souris sensibilisées à l'OVA, l'expression de l'ARNm de l'IL-25 est également augmentée dans le tissu pulmonaire après les provocations à l'OVA (Tamachi T. *et al.*, 2006). Cette cytokine contribue à la sécrétion d'IgE via sa capacité à stimuler la production d'IL-4 et d'IL-13 et stimule la production d'IL-5, initiant ainsi une inflammation éosinophilique (Fort M.M. *et al.*, 2001). L'expression constitutive de l'IL-25 dans les poumons amplifie l'inflammation pulmonaire allergique induite par une sensibilisation et des provocations à l'OVA. A l'inverse, la neutralisation de l'IL-25 par l'administration par voie intrapéritonéale d'un récepteur IL-25R soluble avant chaque provocation à

l'OVA diminue l'inflammation pulmonaire allergique (Tamachi T. *et al.*, 2006). Dans une autre étude, la neutralisation de l'IL-25 par l'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps anti-IL-25 avant chaque provocation à l'OVA empêche le développement de l'HRB mais pas l'inflammation pulmonaire allergique. En revanche, la neutralisation de l'IL-25 pendant la phase de sensibilisation et avant chaque provocation à l'OVA empêche le développement de l'HRB et de l'inflammation pulmonaire allergique (Ballantyne S.J. *et al.*, 2007).

v. *L'IL-19*

L'IL-19, appartenant à la famille de l'IL-10, semble impliquée dans la pathologie allergique. En effet, l'IL-19 favorise le développement des lymphocytes Th2 (Gallagher G. *et al.*, 2004). De plus, dans les sérums de patients asthmatiques, cette cytokine est surexprimée et son taux est corrélé aux taux sériques d'IL-4 et d'IL-13. Dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire, l'IL-19 est également augmentée dans le sérum. Enfin, la surexpression d'IL-19 chez des souris naïves induit une augmentation des taux sériques d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IgE. *In vitro*, l'IL-19 induit la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13 par des cellules T CD4⁺ activées par l'anti-CD3/CD28 (Liao S.C. *et al.*, 2004).

b. Les cytokines associées à l'inflammation

i. *Les cytokines pro-inflammatoires*

Le TNF- α , l'IL-6 et des membres de la famille de l'IL-1 participent à la réaction pulmonaire allergique.

- Le TNF- α

Le TNF- α est produit par différents types cellulaires incluant les mastocytes (Gordon J.R. and Galli S.J., 1990), les cellules Th2 (Galli S.J. *et al.*, 2008; Soumelis V. *et al.*, 2002), les macrophages alvéolaires (Gosset P. *et al.*, 1999; Hamid Q. *et al.*, 2003), les cellules NK (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006; Peritt D. *et al.*, 1998), les cellules iNKT (Gumperz J.E. *et al.*, 2002) et les neutrophiles (Cassatella M.A., 1995). Les taux de TNF- α sont augmentés chez les sujets atteints d'asthme sévère comparativement aux sujets contrôle. Les sujets atteints d'asthme moyen présentent des taux de TNF- α similaires à ceux observés chez les sujets contrôle (Howarth P.H. *et al.*, 2005). 18 heures après provocation allergénique, les taux de TNF- α sont augmentés dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques (Virchow J.C., Jr. *et al.*, 1995). Au niveau des biopsies bronchiques, le nombre de cellules TNF- α ⁺ (essentiellement des mastocytes) est plus élevé chez les sujets atteints d'asthme sévère comparativement aux sujets atteints d'asthme moyen (Howarth P.H. *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent donc que les taux de TNF- α corréleront avec la sévérité de l'asthme. Dans un modèle murin

d'inflammation pulmonaire induite par des extraits de poussières de maison contenant des endotoxines et des allergènes de cafard, les taux de TNF- α sont augmentés dans le LBA. L'administration d'un anticorps neutralisant anti-TNF- α avant chaque provocation allergénique diminue l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (cellules inflammatoires du LBA (éosinophiles, neutrophiles, lymphocytes et macrophages) et taux de CCL11 dans les poumons). En revanche, les taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans le LBA sont amplifiés (Kim J. *et al.*, 2006).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe sur les macrophages alvéolaires (Chapitre 2, B-9-a-i), après une stimulation IgE dépendante, les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques allergiques produisent davantage de TNF- α comparativement à ceux de sujets contrôle (Gosset P. *et al.*, 1992). Les mastocytes sont également une source importante de TNF- α préformé (Gordon J.R. and Galli S.J., 1990). Après une activation IgE dépendante (ou indépendante), le mastocyte libère le TNF- α conduisant à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules épithéliales et endothéliales (VCAM-1 à la surface de l'endothélium par exemple) (Klein L.M. *et al.*, 1989; Randolph D.A. *et al.*, 1999), permettant ainsi le recrutement de cellules inflammatoires. Le TNF- α produit par les mastocytes contribue aussi à l'induction de l'HRB (Kim Y.S. *et al.*, 2007; Nakae S. *et al.*, 2007) (pour plus de détails, cf Chapitre 2, B-5-c-iv) et à la production de mucus (Galli S.J. *et al.*, 2008). Lors de la phase retardée de la réaction pulmonaire allergique, le TNF- α produit par les cellules Th2 et les mastocytes contribue à la bronchoconstriction et à l'activation des neutrophiles recrutés via la sécrétion de CXCL8 notamment par les cellules de structure (cellules musculaires lisses et cellules épithéliales). Le TNF- α intervient également dans le remodelage bronchique, et en particulier dans la prolifération des cellules musculaires lisses (Tableau 3) (Okayama Y. *et al.*, 2007).

Le TNF- α induit la production de CCL28 par les cellules épithéliales bronchiques (O'Gorman M.T. *et al.*, 2005). Cette chimiokine se fixe au CCR3, ce qui pourrait contribuer au recrutement de divers types cellulaires impliqués dans la réaction pulmonaire allergique tels que les éosinophiles, les lymphocytes Th2, les mastocytes et les basophiles. Le TNF- α associé à l'IL-1 β induit la production de chimiokines par différents types cellulaires. Ceci sera décrit ultérieurement. Il joue également un rôle autocrine sur les mastocytes (lignée HMC-1) puisqu'il est capable d'induire l'expression des ARNm d'IL-13 et de CCL2 et la production de ces deux protéines (Lee S.A. *et al.*, 2004). Il permet aussi la libération de NGF par les fibroblastes (Olgart C. and Frossard N., 2001) et les cellules épithéliales bronchiques (Fox A.J. *et al.*, 2001). Le NGF est impliqué dans l'HRB (Frossard N. *et al.*, 2005) et est augmenté dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques après une provocation allergénique (Virchow J.C. *et al.*, 1998).

- L'IL-6

Cette cytokine est produite par les macrophages, les monocytes, les lymphocytes T et B, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales, les cellules musculaires lisses et les éosinophiles (Hamid Q. and Tulic M., 2009). Chez les sujets asthmatiques allergiques, les taux d'IL-6 sont augmentés dans le LBA et le sérum après provocation allergénique (Virchow J.C., Jr. *et al.*, 1995; Yokoyama A. *et al.*, 1995). De plus, *in vitro*, les cellules épithéliales bronchiques de sujets asthmatiques produisent davantage d'IL-6 (Marini M. *et al.*, 1992). Enfin, après une stimulation IgE dépendante, les macrophages alvéolaires de sujets asthmatiques allergiques produisent davantage d'IL-6 comparativement à ceux de sujets contrôle (Gosset P. *et al.*, 1992). L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle de l'IL-6 dans la pathogénèse de l'asthme.

Cependant les études chez les souris montrent des résultats conflictuels. Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, les souris déficientes en IL-6 présentent une augmentation de l'éosinophilie, de la production de cytokines et de chimiokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, CCL11) et du TGF- β dans le LBA (Wang J. *et al.*, 2000), suggérant un rôle régulateur de l'IL-6 dans la pathogénèse de l'asthme. Cependant, dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique induite par trois expositions aux extraits d'*Aspergillus fumigatus*, les souris déficientes en IL-6 présentent une éosinophilie similaire aux souris wild-type, mais une production de mucus diminuée corrélant avec la diminution de l'expression des ARNm de l'IL-13 dans les poumons. Ces souris présentent également des taux d'ARNm d'IL-5 et d'IL-17 diminués et une production augmentée de CCL11 dans le LBA (Neveu W.A. *et al.*, 2009). L'administration par voie intranasale d'un anticorps anti-IL-6 récepteur avant chaque provocation à l'OVA diminue l'éosinophilie et les taux de cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) dans le LBA, l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ dans les poumons et l'HRB et augmente les taux d'IFN- γ et d'IL-10 dans le LBA et la production d'IL-10 par les Treg naturels isolées des poumons (Doganci A. *et al.*, 2005). Ces deux dernières études suggèrent donc que l'IL-6 est impliquée dans la pathogénèse asthmatique.

L'IL-6 semble également participer au remodelage bronchique. L'IL-6 est un puissant facteur mitogène des cellulaires musculaires lisses (Hamid Q. and Tulic M., 2009). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chronique (expositions à l'OVA trois fois par semaine pendant huit semaines), des souris déficientes en IL-6 présentent une infiltration pulmonaire plus prononcée d'éosinophiles, de neutrophiles et de lymphocytes, une expression augmentée des ARNm de l'IL-13 et de CCL2 mais une diminution de la fibrose subépithéliale (Qiu Z. *et al.*, 2004).

- La famille de l'IL-1

La famille de l'IL-1 contient 11 membres classés en trois catégories en fonction de leur propriété pro-inflammatoire, anti-inflammatoire ou récepteur antagoniste. Les cytokines pro-inflammatoires sont l'IL-1 α (IL-1F1), l'IL-1 β (IL-1F2), l'IL-18 (IL-1F4), FIL-1 ϵ (IL-1F6), l'IL-1H2 (IL-1F8), l'IL-1 ϵ (IL-1F9) et l'IL-33 (IL-1F11). FIL1 δ (IL-1F5) et IL-1H4 (IL-1 ζ , IL-1F7) sont des cytokines anti-inflammatoires et l'IL-1Ra (IL-1F3) et probablement l'IL-1Hy2 (IL-1F10) sont des récepteurs antagonistes (Dinarello C.A., 2009).

Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons à l'IL-1 β et l'IL-33 toutes deux impliquées dans la réaction pulmonaire allergique, ainsi qu'à l'IL-18 dont l'implication dans cette pathologie semble plus complexe.

L'IL-1 β

Cette cytokine est produite par différents types cellulaires incluant les cellules épithéliales bronchiques (Yang Y. *et al.*, 2004), les mastocytes (Metcalf D.D., 2008), les macrophages alvéolaires (Gosset P. *et al.*, 1999), les neutrophiles (Cassatella M.A., 1995) et les monocytes (Dinarello C.A., 2009). L'IL-1 β est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif. Après activation cellulaire, la caspase 1 clive ce précurseur conduisant à une molécule d'IL-1 β active pouvant être sécrétée (Dinarello C.A., 2009). En condition basale, l'IL-1 β est détectée dans le LBA de sujets asthmatiques, mais pas chez les sujets contrôle (Borish L. *et al.*, 1992). 18 heures après une provocation allergénique, les taux d'IL-1 sont augmentés dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques (Virchow J.C., Jr. *et al.*, 1995). Au niveau de l'épithélium bronchique, une augmentation de l'expression de l'IL-1 β (mais aussi de l'IL-1Ra) est observée chez les sujets asthmatiques comparativement au sujets contrôle (Sousa A.R. *et al.*, 1996). *In vitro*, chez les sujets non asthmatiques, l'IL-1 β accélère la migration des cellules épithéliales bronchiques différenciées à la suite d'une lésion de l'épithélium, suggérant un rôle de cette cytokine dans la réparation tissulaire. Ce processus n'est pas observé avec les cellules épithéliales provenant de sujets asthmatiques (White S.R. *et al.*, 2008). L'utilisation de modèles animaux d'asthme expérimental a permis de mettre en évidence l'implication de l'IL-1 β , et plus particulièrement de la signalisation via l'IL-1R dans cette pathologie. L'expression constitutive d'IL-1 β chez les souris adultes induit l'augmentation de la production de mucus associée à l'hyperplasie des cellules caliciformes et une fibrose de la paroi bronchique (Lappalainen U. *et al.*, 2005). Dans un modèle d'asthme expérimental induit par le diisocyanate de toluène, la déficience en IL-1R abroge l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique. L'administration dès la sensibilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-1 β diminue partiellement l'HRB, alors que lorsqu'il est coadministré avec un anticorps anti-IL-1 α l'HRB est totalement abrogée.

L'administration d'un anti-IL-1 β ou d'un anti-IL-1 α ou de la combinaison anti-IL-1 α /IL-1 β abroge de la même façon l'inflammation pulmonaire allergique (Johnson V.J. *et al.*, 2005). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, l'administration d'un adénovirus contenant l'IL-1Ra avant les provocations allergéniques diminue l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique (éosinophilie et neutrophilie du LBA, inflammation péribronchique et IL-5 et CCL11 dans le LBA) et augmente le taux d'IFN- γ dans le LBA (Wang C.C. *et al.*, 2006). Par conséquent, la signalisation via le récepteur à l'IL-1 est cruciale pour le développement de la réaction allergique.

L'IL-1 β induit l'expression et la synthèse de COX-2 et de la phospholipase A2, impliqués dans la production de PAF et de PGE2. Cette cytokine augmente l'expression de molécules d'adhérence telle que VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Dinarello C.A., 2009) et des récepteurs au TNF- α TNF RI et TNF RII à la surface des cellules épithéliales bronchiques et des cellules musculaires lisses bronchiques (Cardell L.O. *et al.*, 2008). L'IL-1 β et le TNF- α amplifient la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques (une des caractéristiques de l'asthme) induites par la combinaison FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)/IL-4/IL-13 (Bosse Y. *et al.*, 2008). L'IL-1 β permet la libération de NGF par les fibroblastes (Olgart C. and Frossard N., 2001), les cellules musculaires lisses bronchiques (Freund V. *et al.*, 2002) et les cellules épithéliales bronchiques (Fox A.J. *et al.*, 2001; Pons F. *et al.*, 2001). Elle induit également la libération de CXCL8 par les cellules musculaires lisses (Dragon S. *et al.*, 2007) et de CCL28 par les cellules épithéliales bronchiques (O'Gorman M.T. *et al.*, 2005). La fixation de l'IL-1 β sur le récepteur IL-1R présent à la surface des mastocytes induit l'expression des ARNm de l'IL-13 et de CCL2 qui est potentialisée par le TNF- α . A la suite d'une activation IgE/anti-IgE en présence d'IL-1 β , les mastocytes dérivés de sang de cordons produisent de l'IL-13. Cette production est absente lors d'une activation IgE/anti-IgE ou IL-1 β seule. Leur activation par l'IL-1 β seule ou en combinaison avec les IgE/anti-IgE conduit également à la production de CCL2 (Lee S.A. *et al.*, 2004).

L'IL-33

Similairement à l'IL-1 β , l'IL-33 est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif. Après activation cellulaire, la caspase 1 clive ce précurseur conduisant à une molécule d'IL-33 active pouvant être sécrétée (Dinarello C.A., 2009). Chez l'homme, l'expression de l'ARNm de l'IL-33 est quasi-exclusivement observée dans les cellules de structure incluant les cellules épithéliales bronchiques non activées, les cellules musculaires lisses bronchiques activées ou non et les fibroblastes dermiques activés. Chez la souris, son expression est retrouvée dans divers organes incluant les poumons, la rate et les tissus lymphoïdes. Les DC activées, les macrophages activés et les cellules épithéliales expriment l'ARNm de l'IL-33 (Schmitz J. *et al.*, 2005).

L'IL-33 a pour récepteur le T1/ST2 qui est exprimé à la surface des mastocytes (Schmitz J. *et al.*, 2005), des lymphocytes Th2 (Schmitz J. *et al.*, 2005), des éosinophiles (Cherry W.B. *et al.*, 2008; Suzukawa M. *et al.*, 2008) et des basophiles (Suzukawa M. *et al.*, 2008). Cette cytokine induit la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β), de cytokines Th2 (IL-5, IL-13), de cytokines anti-inflammatoires (IL-10), de GM-CSF et des chimiokines CCL1 et CXCL8 par les mastocytes matures (Allakhverdi Z. *et al.*, 2007; Ho L.H. *et al.*, 2007; Iikura M. *et al.*, 2007; Moulin D. *et al.*, 2007). La TSLP amplifie la production de cytokines Th2. L'IL-33 induit également la production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13), de GM-CSF et des chimiokines CXCL8, CCL2, CCL17 et CCL22 par les précurseurs de mastocytes CD34⁺, alors qu'aucune production de TNF et d'IL-10 n'est observée. La production de tous ces médiateurs est amplifiée par l'ajout de TSLP (Allakhverdi Z. *et al.*, 2007). Outre son rôle dans la production de médiateurs, l'IL-33 promeut la survie et l'adhérence des mastocytes à la fibronectine (Iikura M. *et al.*, 2007). Cette cytokine est chimioattractante pour les lymphocytes Th2 (Komai-Koma M. *et al.*, 2007) et induit leur production de cytokines Th2 (IL-5 et IL-13) (Schmitz J. *et al.*, 2005). *In vitro*, en présence d'IL-33, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs humains ou murins activés (anti-CD3) produisent davantage d'IL-5 et d'IL-13 (Kurowska-Stolarska M. *et al.*, 2008). Les éosinophiles humains activés par l'IL-33 produisent des superoxydes, libèrent de l'EDN (controversée) et du CXCL8, ont une prolongation de leur survie, adhèrent sur des plaques coatées (BSA, fibronectine, ICAM-1 ou VCAM-1) et présentent une augmentation de l'expression de l'intégrine CD11b (Cherry W.B. *et al.*, 2008; Suzukawa M. *et al.*, 2008). Les basophiles humains sont également une cible pour l'IL-33. Bien que l'expression du récepteur T1/ST2 à leur surface soit très faible, l'IL-33 conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-6), de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13), de GM-CSF et de CXCL8, à leur adhérence sur des plaques coatées (BSA, fibronectine, ICAM-1 ou VCAM-1), augmente l'expression membranaire du CD11b et leur migration vis-à-vis de CCL11 (Smithgall M.D. *et al.*, 2008; Suzukawa M. *et al.*, 2008). Un prétraitement des basophiles par l'IL-33 amplifie la libération d'histamine induite par une stimulation anti-IgE (Suzukawa M. *et al.*, 2008). En présence d'IL-33, les cellules iNKT activées par l' α -GalCer produisent davantage d'IL-4 (Smithgall M.D. *et al.*, 2008). Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'IL-33 agit sur des cellules impliquées dans la réaction pulmonaire allergique, suggérant l'implication de cette cytokine dans la pathogénèse de l'asthme.

Chez les sujets asthmatiques allergiques, la protéine ST2 est détectée dans le sérum et sa concentration est augmentée lors d'une exacerbation (Oshikawa K. *et al.*, 2001). L'expression sérique de ST2 est également retrouvée dans un modèle murin de sensibilisation et de provocation à l'OVA (Oshikawa K. *et al.*, 2002). De plus, des administrations d'un plasmide codant pour une protéine ST2 soluble débutant avant la sensibilisation à l'OVA ou l'utilisation de souris déficientes en ST2

diminuent l'éosinophilie et les taux de cytokines Th2 du LBA, suggérant l'importance de la voie T1/ST2-IL-33 dans la pathogénèse de l'asthme (Kurowska-Stolarska M. *et al.*, 2008; Oshikawa K. *et al.*, 2002). L'administration d'IL-33 à des souris naïves induit une HRB, une hyperplasie des cellules caliciformes et la production de cytokines Th2 dans les poumons (IL-4, IL-5, IL-13) (Kondo Y. *et al.*, 2008). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, l'administration d'IL-33 au moment de la sensibilisation amplifie l'inflammation pulmonaire allergique et induit des cellules T produisant de l'IL-5 (Kurowska-Stolarska M. *et al.*, 2008). A l'inverse, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-IL-33 avant la sensibilisation et avant chaque provocation à l'OVA diminue fortement l'inflammation pulmonaire allergique (Liu X. *et al.*, 2009). Dans un modèle de réaction pulmonaire allergique à l'OVA chez la souris BALB/c, la phase de résolution commence avec une diminution des taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA, de l'éosinophilie pulmonaire et des taux de cytokines et chimiokines Th2 dans le LBA, observée 7 jours après la dernière provocation à l'OVA. Cependant, l'HRB, la production de mucus, le nombre de cellules T CD4⁺T1/ST2⁺ pulmonaires et le taux d'IL-4 dans le LBA persistent parallèlement à une augmentation des niveaux d'IL-33 dans les poumons. L'administration d'un anticorps neutralisant anti-T1/ST2 lors de la phase de résolution conduit à la diminution des paramètres persistants. Chez les souris C57BL/6, l'ensemble des paramètres analysés de la réaction pulmonaire allergique est diminué 7 jours après la dernière provocation à l'OVA. A l'inverse des souris BALB/c, l'IL-33 est augmentée 24 heures après la dernière provocation à l'OVA mais est diminuée pendant la phase de résolution (Kearley J. *et al.*, 2009). L'IL-33 est donc impliquée dans le développement de la réaction pulmonaire allergique mais aussi dans la persistance de certains paramètres de la réaction pulmonaire allergique comme l'HRB et la production de mucus.

Bien que l'ensemble des résultats précédemment décrits montre un rôle de l'IL-33 dans la réponse Th2, cette cytokine est également capable d'induire la production d'IFN- γ par les cellules iNKT stimulées par l' α -GalCer et par les lymphocytes Th2 polarisés *in vitro*. Elle agit de concert avec l'IL-12 pour mener à la production d'IFN- γ par les cellules NK et les cellules iNKT (Smithgall M.D. *et al.*, 2008).

L'IL-18

L'IL-18 est synthétisée sous forme d'un précurseur inactif. Celui-ci est clivé sous l'action ou indépendamment de la caspase 1 formant ainsi une molécule d'IL-18 active (Gu Y. *et al.*, 1997; Sugawara S. *et al.*, 2001; Tsutsui H. *et al.*, 1999). Cette cytokine est produite par de nombreux types cellulaires après une stimulation adéquate tels que les macrophages, les DC, les kératinocytes, les cellules épithéliales intestinales et bronchiques (Nakanishi K. *et al.*, 2001). En fonction de

l'environnement cytokinique, l'IL-18 est capable d'induire soit une réponse Th1, soit une réponse Th2.

Les effets pro-Th1 de l'IL-18 en combinaison avec l'IL-12

L'IL-18 agit en synergie avec l'IL-12 pour induire la production d'IFN- γ par les cellules T en absence de stimulation via le TCR. Néanmoins, l'engagement du TCR est indispensable à l'induction de cellules Th1. En effet, seuls les lymphocytes T CD4⁺ stimulés par la combinaison IL-12/IL-18 en présence d'anti-CD3 se différencient en cellules Th1 (Ahn H.J. *et al.*, 1997; Tominaga K. *et al.*, 2000; Yang J. *et al.*, 1999). De plus, *in vitro*, la combinaison IL-12/IL-18 induit la production d'IFN- γ par les cellules B activées par l'anti-CD40, ce qui inhibe la production d'IgE et d'IgG1 induite par l'IL-4 et amplifie la production d'IgG2a (Yoshimoto T. *et al.*, 1997). L'IL-18 agit également de concert avec l'IL-12 pour induire la production d'IFN- γ par les cellules NK (Cooper M.A. *et al.*, 2001).

Les effets pro-Th2 de l'IL-18

Après 4 jours de culture en présence d'IL-2 et d'IL-18 et en absence de stimulation du TCR, les cellules T CD4⁺ naïves expriment le CD40 et produisent de fortes quantités d'IL-13 et de faibles quantités d'IL-4. Néanmoins, les cellules T CD4⁺ naïves cultivées dans les mêmes conditions mais en présence d'un anticorps anti-IL-4 se différencient en cellules Th1 et non Th2, suggérant que l'induction des cellules Th2 par l'IL-18 est dépendante de l'IL-4 (Nakanishi K. *et al.*, 2001). Outre ses effets sur les cellules T, l'IL-18 agit sur les mastocytes et les basophiles. En réponse à une stimulation par l'IL-3 et l'IL-18, les mastocytes et les basophiles produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et de l'histamine (Yoshimoto T. *et al.*, 1999), suggérant un rôle de l'IL-18 dans l'induction de l'inflammation allergique. Un rétrocontrôle positif semble exister entre l'histamine et l'IL-18. En effet, l'histamine stimule la production d'IL-18 par les PBMC et l'IL-18 ainsi produite induirait la libération des cytokines Th2 et d'histamine par les mastocytes et les basophiles (Kohka H. *et al.*, 2000; Nakanishi K. *et al.*, 2001; Yoshimoto T. *et al.*, 1999). L'IL-18 est également capable d'induire la production d'IL-4 par les cellules NKT stimulées par l' α -GalCer (Leite-De-Moraes M.C. *et al.*, 2001). En combinaison avec l'IL-15, l'IL-18 induit la production d'IL-13 par les cellules NK (Cooper M.A. *et al.*, 2001).

L'IL-18 et la réaction pulmonaire allergique

Après sensibilisation et provocations à l'OVA, des souris C57BL/6 déficientes en IL-18 présentent une éosinophilie tissulaire et du LBA accrue comparativement à des souris wild-type (Kodama T. *et al.*, 2000), suggérant un rôle protecteur de l'IL-18 dans la réaction pulmonaire allergique. Néanmoins, son rôle est plus complexe qu'il n'y paraît, puisque chez des souris wild-type les effets protecteurs ou

délétères de l'IL-18 semblent dépendants du moment de son administration et de la dose administrée.

Dans des modèles murins de sensibilisation et de provocations à l'OVA, l'administration d'un adénovirus non répliquatif transfecté avec l'IL-18 ou la co-administration d'IL-18 et d'IL-12 avant les provocations à l'OVA abroge l'HRB, diminue l'inflammation pulmonaire allergique et augmente la production d'IFN- γ par les cellules ganglionnaires restimulées *in vitro* avec l'OVA (Hofstra C.L. *et al.*, 1998; Walter D.M. *et al.*, 2001). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'ambroisie, la co-administration d'IL-18 et d'ambroisie au moment des provocations allergéniques diminue l'éosinophilie du LBA, les taux sériques d'IgE et d'IgG1 spécifiques de l'ambroisie et augmente les taux d'ARNm d'IFN- γ dans les poumons. En revanche, la co-administration d'IL-18 et d'ambroisie lors de la phase de sensibilisation amplifie l'inflammation pulmonaire allergique tout en augmentant les taux d'ARNm d'IFN- γ dans les poumons. La co-administration d'IL-18 et de l'ambroisie au moment de la sensibilisation et des provocations allergéniques diminue l'inflammation pulmonaire via la production d'IFN- γ , mais amplifie également la production de cytokines Th2 et d'Ig associées à la réponse Th2 (IgG1 et IgE) (Wild J.S. *et al.*, 2000). Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'IL-18 semble posséder une fonction double dans l'asthme allergique puisqu'elle est délétère lors de la phase de sensibilisation mais protectrice lors des provocations allergéniques.

L'effet protecteur de l'IL-18 au moment des provocations allergéniques semble également dépendant de la dose administrée. En effet, la co-administration d'une faible dose d'IL-18 (10 ng) avec les allergènes de cafard n'a aucun effet sur l'éosinophilie et la production d'IFN- γ , alors qu'une co-administration avec 200 ng d'IL-18 amplifie l'éosinophilie pulmonaire et les taux d'IFN- γ présents dans le LBA. L'augmentation du nombre d'éosinophiles est liée à l'induction de la sécrétion de CCL11 par les cellules épithéliales et les macrophages activés par l'IL-18 (Campbell E. *et al.*, 2000). De même, dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA, l'administration de 10 à 20 μ g d'IL-18 avant les provocations ne modifie pas l'HRB mais amplifie l'éosinophilie et les taux d'IFN- γ dans le LBA. L'accumulation des éosinophiles est liée à la production de TNF- α dans les poumons (Kumano K. *et al.*, 1999).

ii. Les cytokines principalement associées à l'éosinophilie

L'IL-5

L'IL-5 est produite par divers types cellulaires incluant les lymphocytes T helper, les lymphocytes T cytotoxiques, les mastocytes et les éosinophiles (Hamid Q. and Tulic M., 2009). L'IL-5 est la plus importante des cytokines associées aux éosinophiles. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe

portant sur les éosinophiles, cette cytokine agit de concert avec l'IL-3 et le GM-CSF pour la production d'éosinophiles dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ (Denburg J.A. *et al.*, 1994; Lopez A.F. *et al.*, 1986; Shalit M. *et al.*, 1995). Elle constitue le facteur le plus spécifique de la lignée des éosinophiles puisqu'elle est responsable de leur différenciation terminale, leur croissance, leur survie (en empêchant l'apoptose) et leurs fonctions effectrices (Coffman R.L. *et al.*, 1989; Lee J.J. *et al.*, 1997; Sanderson C.J., 1992). En combinaison avec des chimiokines et des molécules d'adhérence, l'IL-5 permet le recrutement des éosinophiles matures de la moelle osseuse vers les tissus inflammés. Outre son rôle chimioattractant, elle augmente l'expression des récepteurs aux intégrines à la surface des éosinophiles, promouvant ainsi leur adhérence sur les cellules endothéliales exprimant VCAM-1 et leur accumulation tissulaire (Hamid Q. and Tulic M., 2009).

Après sensibilisation et provocations à l'OVA, les souris déficientes en IL-5 ne développent pas d'éosinophilie, d'HRB ni de dommages tissulaires (Foster P.S. *et al.*, 1996). A l'inverse, la surexpression de l'IL-5 au niveau de l'épithélium pulmonaire de souris transgéniques résulte en une accumulation péribronchique d'éosinophiles, une hyperplasie des cellules caliciformes, une hypertrophie épithéliale et des dépôts de collagène. De plus, en absence de provocations allergéniques, ces souris développent une HRB. Ainsi, l'expression spécifique d'IL-5 dans les poumons de souris induit des caractéristiques similaires à celles observées dans des modèles d'asthme expérimental (Lee J.J. *et al.*, 1997).

Chez des patients asthmatiques, les taux d'IL-5 dans les LBA sont élevés (Feltis B.N. *et al.*, 2004) et l'inhalation d'IL-5 augmente l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB, suggérant un rôle important de l'IL-5 et des éosinophiles dans la pathologie asthmatique allergique (Shi H.Z. *et al.*, 1998). Le blocage de l'IL-5 par l'administration d'un anticorps neutralisant anti-IL-5 (par voie intraveineuse) diminue l'éosinophilie dans le sang et les expectorations, mais n'a aucun effet sur les réponses retardées et l'HRB (Leckie M.J. *et al.*, 2000). Toutefois, cet anticorps à la dose injectée ne réduit les taux d'éosinophiles de la moelle osseuse et du tissu pulmonaire que de 45-48% (Flood-Page P.T. *et al.*, 2003). Le traitement de sujets atteints d'asthme allergique moyen avec le même anticorps neutralisant anti-IL-5 réduit le remodelage bronchique (dépôts de composants de la matrice extracellulaire (ténacine, lumicane et procollagène III) dans la membrane basale sous-épithéliale) (Flood-Page P. *et al.*, 2003), suggérant une contribution des éosinophiles dans ce processus. *In vitro*, après activation par l'IL-5, l'expression membranaire de l'IL-5R α est diminuée sur les éosinophiles, les rendant ainsi incapables de dégranuler lors d'une stimulation ultérieure à l'IL-5. *In vivo*, cette perte d'expression membranaire pourrait être associée à la libération d'IL-5R α soluble (Liu L.Y. *et al.*, 2002). Après provocation allergénique pulmonaire, les éosinophiles recrutés dans les poumons

montrent effectivement une perte d'expression membranaire de l'IL-15R α et une perte de réactivité à l'IL-5. De plus, dans le LBA, l'expression d'IL-5R α soluble est augmentée en absence d'augmentation de l'ARNm de l'IL-5R α soluble (Liu L.Y. *et al.*, 2002).

Outre ses effets sur les éosinophiles, l'IL-5 agit sur la maturation des lymphocytes T cytotoxiques et sur la différenciation des basophiles (Borish L.C. and Steinke J.W., 2003).

L'IL-3 et le GM-CSF

L'IL-3 est un facteur de croissance impliqué dans la formation de divers types cellulaires incluant les DC, les granulocytes, les macrophages, les érythrocytes, les mastocytes et les cellules lymphoïdes. Le GM-CSF, autre facteur de croissance, agit de concert avec d'autres facteurs pour permettre la production d'érythrocytes et de plaquettes. Il supporte également la maturation des DC, des neutrophiles et des macrophages (Borish L.C. and Steinke J.W., 2003).

Ces deux cytokines contribuent à l'activité des éosinophiles dans l'inflammation allergique via leur capacité à prolonger leur survie et à générer des éosinophiles activés (Owen W.F., Jr. *et al.*, 1987; Rothenberg M.E. *et al.*, 1988). A la suite d'une provocation allergénique endobronchiale, l'expression du GM-CSF est augmentée dans l'épithélium bronchique et dans les éosinophiles. Le GM-CSF semble également impliqué dans l'éosinophilie chronique et le remodelage bronchique (Hamid Q. and Tulic M., 2009).

c. Les cytokines associées au remodelage bronchique

Dans ce paragraphe, nous nous focaliserons sur les cytokines impliquées dans le remodelage bronchique. Toutefois, d'autres molécules telles que des métalloprotéases (ADAM33 et MMP-9) et TIMP-1 (inhibiteur de MMP-9) semblent y participer. Bien que toutes ces molécules citées soient augmentées chez les sujets asthmatiques (LBA, expectorations ou biopsies bronchiques), leur rôle bénéfique ou délétère est controversé.

i. Le TGF- β

Le TGF- β est une cytokine profibrotique dont les principales sources cellulaires sont les fibroblastes, les éosinophiles et les cellules épithéliales. Elle est également produite par les macrophages, les neutrophiles, les monocytes, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes. Alors que le TGF- β est augmenté dans le LBA de sujets asthmatiques en condition basale, celui-ci est davantage augmenté après une provocation allergénique. Cette cytokine influence également le turnover des protéines de la matrice extracellulaire. Bien que TGF- β inhibe la prolifération et la production de cytokines par les

monocytes, les lymphocytes et les cellules épithéliales, il induit la prolifération et la libération de cytokines proinflammatoires et profibrotiques par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Il est aussi un facteur chimioattractant pour les mastocytes, les fibroblastes et les monocytes (Hamid Q. and Tulic M., 2009; Kehrl J.H. *et al.*, 1986; Wahl S.M. *et al.*, 1987).

Les éosinophiles sont considérés comme l'une des plus abondantes sources de TGF- β dans les bronches de sujets asthmatiques (Hamid Q. and Tulic M., 2009). Comparés aux sujets contrôle, les sujets atteints d'asthme moyen ou sévère présentent des taux élevés de TGF- β dans les tissus pulmonaires. De plus, les taux de TGF- β sont corrélés avec l'épaisseur de la membrane basale et la sévérité de la pathologie (Minshall E.M. *et al.*, 1997). A l'intérieur de la lamina réticulaire, approximativement 65% des cellules TGF- β^+ sont des éosinophiles activés. Cette production locale de TGF- β par les éosinophiles pourrait être responsable de la fibrose subépithéliale observée chez les sujets asthmatiques. Néanmoins, le TGF- β peut également inhiber la survie et la fonction des éosinophiles et pourrait être impliqué dans les processus de réparation de cellules épithéliales bronchiques (Hamid Q. and Tulic M., 2009).

ii. Le PDGF

Le PDGF est principalement produit par les éosinophiles, mais également par les plaquettes, les macrophages, les cellules épithéliales et endothéliales bronchiques, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. L'expression du PDGF est induite par un stress oxydatif et mécanique et par l'exposition à de nombreuses cytokines incluant l'IL-1 et le TGF- β . Ce facteur mitogène stimule la prolifération des cellules de structure des tissus incluant les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Il est également impliqué dans les altérations de la fonction pulmonaire observées dans plusieurs pathologies pulmonaires chroniques. Les fibroblastes de sujets asthmatiques montrent une réactivité accrue au PDGF, aboutissant ainsi à leur prolifération et leur sécrétion de collagène. Ce facteur agit probablement de concert avec d'autres cytokines, et plus particulièrement le TGF- β , pour la modification structurelle de la paroi des voies respiratoires chez les sujets asthmatiques (Hamid Q. and Tulic M., 2009).

iii. L'IL-11

L'IL-11 est produite par les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses en réponse à divers stimuli incluant le TGF- β , l'histamine, l'IL-1 et la MBP (Elias J.A. *et al.*, 1997; Elias J.A. *et al.*, 1994; Elias J.A. *et al.*, 1994; Rochester C.L. *et al.*, 1996; Zheng T. *et al.*, 1994). Chez des souris, la surexpression constitutive d'IL-11 dans les poumons résulte en une fibrose tissulaire et des dépôts de collagène de type I et III, mais également en une augmentation du nombre de cellules de structure

(fibroblastes, myofibroblastes et cellules musculaires lisses) et une présence d'infiltrats cellulaires péribronchiques, d'une obstruction bronchique et d'une HRB (Tang W. *et al.*, 1996).

An niveau de biopsies bronchiques, l'expression de l'ARNm et de la protéine IL-11 est observée dans les couches épithéliales et sous-épithéliales des sujets asthmatiques et des sujets contrôle. Dans l'asthme sévère, l'expression de l'IL-11 est inversement corrélée au VEMS et les cellules exprimant l'ARNm de l'IL-11 sont les cellules épithéliales et les éosinophiles MBP⁺ (Minshall E. *et al.*, 2000). Ainsi, chez l'homme, le niveau d'expression de l'IL-11 est positivement corrélé avec la sévérité de l'asthme. En revanche, dans un modèle murin de sensibilisation et de provocations à l'OVA, l'expression d'IL-11 est bénéfique puisque des souris surexprimant constitutivement l'IL-11 dans les poumons présentent une réponse Th2 atténuée (éosinophilie pulmonaire, infiltrats péribronchiques et taux de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) dans le LBA mais pas de modification de l'hyperplasie des cellules caliciformes) comparativement aux souris wild-type. L'atténuation de cette réponse Th2 est au moins en partie liée à la diminution des cellules Th2 (CD4⁺IL-4⁺) dans les poumons mais n'est pas associée à l'induction d'une réponse Th1 puisque les taux d'IFN- γ dans le LBA et le nombre de cellules Th1 dans les poumons ne sont pas augmentés chez les souris transgéniques comparativement aux souris wild type. L'IL-11 diminue également l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales (Wang J. *et al.*, 2000), limitant ainsi la migration des cellules T et des éosinophiles.

iv. Le VEGF

Au niveau pulmonaire, le VEGF est produit par les cellules épithéliales alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiques, les cellules musculaires lisses et les macrophages alvéolaires (Tuder R.M. and Yun J.H., 2008). Chez les sujets asthmatiques, le VEGF est élevé dans les expectorations induites et les biopsies bronchiques (Asai K. *et al.*, 2002; Hoshino M. *et al.*, 2001). Des souris surexprimant le VEGF dans les poumons présentent un phénotype ressemblant à l'asthme, et ce en absence de sensibilisation et de provocations à l'OVA. Outre le remodelage vasculaire, une HRB, une hyperproduction de mucus, une éosinophilie dans le LBA, une hyperplasie des myocytes, une augmentation des dépôts de collagène et une production de TGF- β sont observés. Après sensibilisation et provocations à l'OVA, la réponse pulmonaire allergique est exacerbée chez les souris surexprimant le VEGF comparativement à des souris wild-type (Lee C.G. *et al.*, 2004). Ainsi, le VEGF semble jouer un rôle actif non seulement dans le remodelage vasculaire mais également dans le remodelage extravasculaire et l'inflammation.

d. Les cytokines immunorégulatrices

En réponse à un allergène, les individus allergiques développent une réponse Th2 alors que les sujets non allergiques développent soit une réponse Th1, soit une réponse tolérogène. Ainsi, les cytokines impliquées dans les réponses tolérogènes (IL-10) ou Th1 (IL-12 et IFN- γ) pourraient être considérées comme immunorégulatrices des réponses Th2.

i. L'IL-10

L'IL-10 est produite par de nombreux types cellulaires incluant les lymphocytes Th1 et Th2, les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes B, les mastocytes, les macrophages alvéolaires et les cellules Tr1 (Borish L.C. and Steinke J.W., 2003; Del Prete G. *et al.*, 1993; Hamid Q. and Tulic M., 2009). Chez les sujets asthmatiques, la concentration d'IL-10 dans le LBA est fortement diminuée comparativement aux sujets contrôle (Borish L. *et al.*, 1996). Cette diminution drastique pourrait expliquer l'apparition de certaines caractéristiques de la réponse Th2. Par exemple, l'IL-10 induit la commutation isotypique des cellules B vers les IgG, alors que l'IL-4 induit la synthèse d'IgE (Gascan H. *et al.*, 1991; Gascan H. *et al.*, 1991; Malisan F. *et al.*, 1996). Ainsi, la présence simultanée d'IL-4 et d'IL-10 pourrait diminuer la synthèse d'IgE. En effet, en présence d'extraits allergéniques (allergènes de chiens, HDM et pollen), les cellules B stimulées par la combinaison anti-CD40 et IL-4 sont incapables de produire des IgE. Cette réponse fait intervenir la production d'IL-10 qui semble restreinte aux cellules B mémoire puisque elles-seules produisent de l'IL-10 à la suite d'une stimulation avec des extraits allergéniques. Ainsi, les cellules B mémoire activées par l'allergène modulent la production d'IgE via leur sécrétion d'IL-10 (Milovanovic M. *et al.*, 2009). Néanmoins, une étude plus ancienne a montré que l'IL-10 augmente la production d'IgE par des cellules B d'amygdale stimulées avec la combinaison IL-4/anti-CD40 (Caven T.H. *et al.*, 2005). L'IL-10 inhibe également la production d'IFN- γ et d'IL-2 par les lymphocytes Th1 et la production d'IL-4 et d'IL-5 par les lymphocytes Th2 (Del Prete G. *et al.*, 1993).

ii. L'IFN- γ

L'IFN- γ est principalement produit par les lymphocytes Th1, les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK (Borish L.C. and Steinke J.W., 2003). D'autres types cellulaires incluant les cellules NKT et les éosinophiles sont également des sources d'IFN- γ . Comme nous l'avons vu précédemment, cette cytokine est impliquée dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ activés en lymphocytes Th1.

De nombreuses études utilisant des modèles animaux ont montré un rôle régulateur de l'IFN- γ sur la réaction pulmonaire allergique. Ainsi, des souris déficientes en IFN- γ sensibilisées à l'OVA présentent 24 heures après la dernière provocation à l'OVA une augmentation de l'éosinophilie du LBA. A plus long terme (8 semaines après la dernière provocation à l'OVA) une persistance de l'HRB et de l'augmentation du nombre de cellules T CD4⁺ et d'éosinophiles dans le LBA est observée (Yoshida M. *et al.*, 2002). L'administration d'IFN- γ par voie intrapéritonéale à des souris BALB/c sensibilisées à l'OVA au moment des provocations allergéniques diminue l'infiltration des cellules T CD4⁺ et des éosinophiles dans la sous-muqueuse de la trachée, alors que sa neutralisation avant les provocations à l'OVA l'amplifie (Iwamoto I. *et al.*, 1993). La voie d'administration de l'IFN- γ influence la réponse obtenue. Dans un modèle où les souris BALB/c sont uniquement soumises à des aérosols d'OVA, l'administration d'IFN- γ par voie intrapéritonéale quotidiennement avant et pendant les aérosols d'OVA diminue de moitié les taux d'IgE sériques totaux mais ne modifie pas les taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA. En revanche, la nébulisation quotidienne d'IFN- γ avant et pendant les aérosols d'OVA ne modifie pas les taux sériques d'IgE totales mais diminue fortement les taux sériques d'IgE spécifiques et augmente fortement ceux d'IgG2a spécifiques. De plus, la fonction pulmonaire est améliorée et l'hypersensibilité cutanée immédiate est diminuée (Lack G. *et al.*, 1994). De même, la nébulisation d'IFN- γ sur une réaction pulmonaire allergique déjà établie diminue les taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA, augmente les taux sériques d'IgG2a spécifiques et inhibe l'HRB (Lack G. *et al.*, 1996).

Bien que l'ensemble des résultats précédemment cités montre un rôle protecteur de l'IFN- γ dans la réaction pulmonaire allergique, cette cytokine semble également participer à son développement. Après sensibilisation et provocations à l'OVA, des souris déficientes en IFN- γ présentent après 24 heures une éosinophilie réduite dans le LBA et des taux sériques d'IgE spécifiques de l'OVA réduits comparativement aux souris wild-type (Hofstra C.L. *et al.*, 1998). De plus, l'IFN- γ produit par les éosinophiles induit l'HRB et l'inflammation bronchique, et ce même en absence de cellules T (Kanda A. *et al.*, 2009).

iii. L'IL-12

L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique formée par l'association de la chaîne légère IL-12p35 et de la chaîne lourde IL-12p40 (Trinchieri G. *et al.*, 2003). Au sein d'une cellule, la coexpression de ces deux chaînes est indispensable pour la génération de l'IL-12p70, forme bioactive de la cytokine (Gubler U. *et al.*, 1991). Cette cytokine est produite par diverses cellules incluant les DC, les cellules B, les lymphocytes Th1, les macrophages, les monocytes, les mastocytes et les neutrophiles (Hamid Q. and Tulic M., 2009).

Dans des modèles murins d'inflammation pulmonaire allergique, l'administration d'IL-12 atténue la réaction pulmonaire allergique. Dans un modèle de sensibilisation à Der p 1 chez les souris C57BL/6, l'injection simultanée de l'allergène et de l'IL-12 par voie intrapéritonéale inhibe la production d'IgE et d'IgG1 spécifiques de l'antigène, alors que celle des IgG2a est augmentée. L'éosinophilie du LBA est également inhibée. Après restimulation *in vitro* des cellules spléniques de ces souris avec l'antigène, celles-ci produisent nettement moins d'IL-5 mais beaucoup plus d'IFN- γ comparativement aux souris n'ayant pas reçu d'IL-12 (Lee Y.L. *et al.*, 1999). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration de l'IL-12 durant la phase d'immunisation empêche l'éosinophilie pulmonaire, la production d'IgE spécifiques de l'OVA et l'HRB. L'administration de l'IL-12 au moment des provocations allergéniques abroge également l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire mais n'abolit pas la production d'IgE spécifiques de l'OVA (Kips J.C. *et al.*, 1996). Dans un autre modèle, l'IFN- γ a été montré participer à l'effet de l'IL-12 (Gavett S.H. *et al.*, 1995).

Chez l'homme, des injections d'IL-12 à des sujets asthmatiques allergiques ne diminuent que transitoirement le nombre d'éosinophiles circulants. Après provocation allergénique, le nombre d'éosinophiles est diminué dans les expectorations des patients traités avec l'IL-12. En revanche, ce traitement n'a aucun effet sur l'HRB non spécifique de l'antigène (histamine) et sur la réactivité bronchique vis-à-vis de l'allergène inhalé. Outre son effet mineur sur l'asthme allergique, ce traitement a entraîné des effets secondaires sévères chez 4 patients sur 35 (Bryan S.A. *et al.*, 2000).

2. Les chimiokines

a. Les récepteurs et leurs ligands impliqués dans la réaction inflammatoire allergique

Comme nous l'avons vu précédemment, les chimiokines sont capables de se fixer à plusieurs récepteurs entraînant des redondances fonctionnelles. Ici, nous nous focaliserons sur l'expression des principaux récepteurs de chimiokines et de chimiokines impliquées dans l'inflammation pulmonaire allergique. De plus, les récepteurs de chimiokines et les chimiokines étant exprimés ou produits par une multitude de cellules, seuls plusieurs exemples seront cités. Toutefois, l'ensemble est répertorié dans les annexes 1 et 2.

i. Le CCR3 et ses ligands CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL24 et CCL26

Le CCR3 est exprimé sur la plupart des cellules impliquées dans la réaction pulmonaire allergique. En effet, son expression est retrouvée sur les lymphocytes Th2 (Sallusto F. *et al.*, 1997), les éosinophiles (Ponath P.D. *et al.*, 1996), les basophiles (Ugucioni M. *et al.*, 1997), les mastocytes (Prussin C. and Metcalfe D.D., 2006), mais également sur les cellules musculaires lisses ou sur les cellules épithéliales

alvéolaires bronchiques. Les cellules musculaires lisses de sujets asthmatiques expriment davantage ce récepteur (Joubert P. *et al.*, 2005). L'expression du CCR3 est augmentée par l'IL-4 et inhibée par l'IFN- γ (Sallusto F. *et al.*, 1998). Le CCR3 est primordial pour le développement de l'inflammation pulmonaire allergique puisqu'il permet le recrutement de la plupart des cellules effectrices. Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration d'un anticorps monoclonal anti-CCR3 durant les phases de sensibilisation et de provocations réduit l'éosinophilie pulmonaire, l'hyperplasie des cellules caliciformes et la surproduction de mucus (Shen H.H. *et al.*, 2006).

CCL5 est produite par différentes cellules de structure incluant les cellules épithéliales (Devalia J.L. *et al.*, 1999; Message S.D. and Johnston S.L., 2004; Terada N. *et al.*, 1996), les cellules endothéliales (Terada N. *et al.*, 1996) et les fibroblastes (Teran L.M. *et al.*, 1999). Chez les sujets asthmatiques allergiques, la production de CCL5 par les cellules épithéliales bronchiques est plus importante que celle observée chez les sujets non asthmatiques non allergiques (Devalia J.L. *et al.*, 1999). De plus, les cellules épithéliales infectées par des virus respiratoires (virus fréquemment associés aux exacerbations de l'asthme) produisent également du CCL5 (Message S.D. and Johnston S.L., 2004). *In vitro*, CCL5 est produite par les cellules épithéliales après stimulation avec du TNF- α et de l'IL-1 (cytokines présentes à fortes concentrations dans les bronches de sujets asthmatiques) (Smit J.J. and Lukacs N.W., 2006). Les cellules endothéliales et épithéliales isolées de la muqueuse nasale produisent du CCL5 en présence de la combinaison TNF- α /IFN- γ . Cette production est plus importante chez les sujets atteints de rhinite allergique comparativement aux sujets non allergiques (Terada N. *et al.*, 1996). *In vitro*, après stimulation au TNF- α , les fibroblastes pulmonaires produisent du CCL5 et cette production est amplifiée par l'ajout d'IFN- γ (Teran L.M. *et al.*, 1999). Cette chimiokine est aussi produite par d'autres types cellulaires incluant les cellules Th1 (Zhang S. *et al.*, 2000) et se fixe également sur le CCR1 et le CCR5. Outre son effet chemoattractant sur les éosinophiles, CCL5 induit la libération d'EDN (Fujisawa T. *et al.*, 2000). Dans les LBA de sujets asthmatiques stables, CCL5 mais aussi CCL2 et CCL3 sont présents à des taux similaires de ceux observés dans les LBA de sujets contrôle. Néanmoins, 4 heures après une provocation endobronchique, ces trois chimiokines sont nettement augmentées et retournent à un niveau de base au bout de 24 heures (Holgate S.T. *et al.*, 1997). Les taux de CCL5 sont également augmentés dans les LBA d'enfants asthmatiques comparativement à des enfants contrôle (Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003).

CCL7 est produite notamment par les mastocytes (Metcalf D.D., 2008) et l'ARNm est exprimé par les cellules musculaires lisses bronchiques activées (IL-1 β /TNF- α /IFN- γ) (Pype J.L. *et al.*, 1999). Outre son

pouvoir chimioattractant sur les cellules exprimant les récepteurs de CCL7 (CCR1, CCR2 et CCR3), le CCL7 est capable d'induire la libération d'EDN par les éosinophiles via l'interaction avec le CCR3 (Fujisawa T. *et al.*, 2000) et la libération d'histamine et de LTC₄ par les basophiles activés par l'IL-3 via l'interaction avec le CCR1 ou CCR2 mais pas le CCR3 (Uguccioni M. *et al.*, 1997). Dans les LBA d'enfants asthmatiques, les taux de CCL7 sont augmentés comparativement à ceux observés dans les LBA d'enfants non asthmatiques (Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003) et tendent à corrélérer avec le nombre d'éosinophiles présents dans les LBA (Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003).

CCL8 et CCL13 se fixent également aux CCR1, CCR2 et CCR3. CCL8 est produite notamment par les cellules musculaires lisses bronchiques activées (IL-1 β /TNF- α /IFN- γ). CCL13 est exprimée par les cellules épithéliales bronchiques et les cellules inflammatoires et l'expression de son ARNm est augmentée chez les sujets asthmatiques comparativement aux sujets non asthmatiques (Taha R.A. *et al.*, 1999). Après stimulation avec de l'IL-4, les cellules musculaires lisses bronchiques produisent CCL13. Cette production est amplifiée en présence de TNF- α (Odaka M. *et al.*, 2007). Dans les LBA d'enfants asthmatiques, les taux de CCL13 sont augmentés et corrélés avec le nombre d'éosinophiles présents dans les LBA (Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003). Les taux plasmatiques de CCL13 sont également augmentés chez les sujets atteints d'asthme chronique stable comparativement aux sujets contrôle. De plus, ces taux plasmatiques sont davantage augmentés chez les patients souffrant d'une exacerbation asthmatique aigüe comparativement à ceux observés dans le plasma de sujets atteints d'asthme chronique stable (Kalayci O. *et al.*, 2004).

CCL11 est produite par différents types cellulaires incluant les éosinophiles (Rothenberg M.E. and Hogan S.P., 2006), les mastocytes (Metcalf D.D., 2008) et les cellules structurales. En réponse à l'IL-4 ou l'IL-13, les cellules épithéliales bronchiques (Stellato C. *et al.*, 1999), les fibroblastes pulmonaires (Teran L.M. *et al.*, 1999) et les cellules musculaires lisses (Hirst S.J. *et al.*, 2002) produisent du CCL11. Outre son effet chimioattractant sur les éosinophiles et les mastocytes, cette chimiokine induit la libération d'EDN par les éosinophiles (Fujisawa T. *et al.*, 2000) et amplifie la production d'IL-13 dépendante du Fc ϵ RI par les mastocytes (Price K.S. *et al.*, 2003). Les taux de CCL11 sont augmentés dans les LBA d'enfants asthmatiques comparativement aux enfants contrôle (Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003). De plus, dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques ou non allergiques, l'expression de CCL11 est plus élevée comparativement à celle observée chez les sujets non asthmatiques allergiques ou chez les sujets non asthmatiques non allergiques. Cette expression est corrélée négativement avec l'HRB induite par l'histamine (Ying S. *et al.*, 1999). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration d'anticorps neutralisant anti-CCL11 avant chaque provocation réduit l'éosinophilie du LBA et l'HRB. L'administration d'anticorps neutralisant anti-CCL2 a le même effet, alors que des anticorps

neutralisant anti-CCL3 n'ont aucun effet (Gonzalo J.A. *et al.*, 1998). Après sensibilisation et provocations à l'OVA de souris invalidées pour le gène de CCL11, l'éosinophilie pulmonaire est diminuée ou non modifiée selon les études (Rothenberg M.E. *et al.*, 1997; Yang Y. *et al.*, 1998). La neutralisation de CCL11 semble donc avoir des effets limités sur l'inflammation pulmonaire allergique et l'HRB. Ceci n'est pas si surprenant puisque d'autres chimiokines possédant des caractéristiques fonctionnelles communes avec CCL11 sont toujours présentes. Ainsi, après une stimulation *in vitro* appropriée, les cellules épithéliales alvéolaires bronchiques et les cellules épithéliales bronchiques produisent CCL24 et CCL26 (Heiman A.S. *et al.*, 2005; Komiyama A. *et al.*, 2003) et les cellules musculaires lisses bronchiques produisent CCL26 (Odaka M. *et al.*, 2007). Plusieurs travaux ont montré une augmentation d'expression de CCL24 et CCL26 dans le LBA, la muqueuse bronchique ou les expectorations induites des sujets asthmatiques (Komiyama A. *et al.*, 2003; Rojas-Ramos E. *et al.*, 2003; Scheicher M.E. *et al.*, 2007). Après provocation allergénique chez des sujets atteints d'asthme stable, l'expression de CCL24 et CCL26 est augmentée dans les cellules de la sous-muqueuse, alors que l'expression de CCL11 n'est pas modifiée. De plus, le niveau d'expression de CCL24 est corrélé positivement avec le nombre d'éosinophiles. A l'état basal, ces trois chimiokines sont exprimées par les cellules épithéliales mais également par les cellules infiltrées dans la sous-muqueuse (Ravensberg A.J. *et al.*, 2005). Dans des modèles murins, CCL24 agit de concert avec l'IL-5 pour le développement de l'éosinophilie pulmonaire, la production d'IL-13 et l'HRB (Yang M. *et al.*, 2003) et agit également de concert avec l'IL-13 pour recruter des éosinophiles (Pope S.M. *et al.*, 2005).

ii. Le CCR4 et ses ligands CCL17 et CCL22

Le CCR4 est exprimé par divers types cellulaires incluant les lymphocytes Th2 et Th1 (Bonecchi R. *et al.*, 1998; D'Ambrosio D. *et al.*, 1998; Sallusto F. *et al.*, 1998), les mastocytes présents dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques (Amin K. *et al.*, 2005), les lymphocytes Treg (Iellem A. *et al.*, 2001), les lymphocytes Tr1 (Sebastiani S. *et al.*, 2001) ou encore les cellules NK activées (Inngjerdigen M. *et al.*, 2000). Ce récepteur est également faiblement exprimé sur les éosinophiles circulants mais fortement exprimé sur les éosinophiles présents dans le LBA de patients allergiques à la suite d'une provocation allergénique (Liu L.Y. *et al.*, 2003). Des études réalisées chez des souris déficientes en CCR4 ou chez des souris où le CCR4 est neutralisé conduisent à des résultats conflictuels sur le rôle de ce récepteur dans la pathogénèse de l'asthme. Par exemple, dans un modèle chronique de sensibilisation et de provocations à des spores d'*Aspergillus fumigatus* chez les souris C57BL/6, l'HRB et l'éosinophilie péribronchique et du LBA sont atténuées chez les souris déficientes en CCR4, sans modification du remodelage bronchique (Schuh J.M. *et al.*, 2002). Le CCR4 est nécessaire pour un recrutement efficace des lymphocytes Th2 spécifiques de l'antigène dans les

poumons. En effet, les cellules Th2 spécifiques de l'OVA issues de souris déficientes en CCR4 injectées à des souris naïves avant la première provocation à l'OVA ne sont pas recrutées dans les poumons, alors que celles issues de souris wild-type le sont (Mikhak Z. *et al.*, 2009). En revanche, dans un modèle de sensibilisation et de provocation à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'HRB et l'inflammation pulmonaire allergique chez les souris déficientes en CCR4 sont similaires à celles observées chez les souris wild-type (Chvatchko Y. *et al.*, 2000). Dans un modèle de sensibilisation et de provocation à l'OVA chez le cochon d'Inde, la neutralisation du CCR4 avant la provocation à l'OVA ne modifie pas non plus l'inflammation pulmonaire allergique (Conroy D.M. *et al.*, 2003).

CCL17 est exprimée par les cellules épithéliales nasales avec une expression plus élevée chez les sujets souffrant d'une rhinite allergique comparativement aux sujets non allergiques (Terada N. *et al.*, 2001). Cette chimiokine est également produite par les DC et sa production est amplifiée par la combinaison IL-4/TNF- α (Xiao T. *et al.*, 2003). Après stimulation avec l'IL-25, les cellules iNKT CD4⁺ IL-17RB⁺ sont capables de produire du CCL17 et du CCL22 (Terashima A. *et al.*, 2008). CCL22 est principalement produite par les DC et les macrophages (Yamashita U. and Kuroda E., 2002). CCL22 peut également être produite par les cellules NK (Andrew D.P. *et al.*, 1998). Les lymphocytes T naïfs activés (anti-CD3/CD28) produisent CCL17 et CCL22. Ces deux chimiokines sont davantage produites par les lymphocytes T naïfs activés isolés du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques comparativement aux sujets contrôle. Les cellules Th2 produisent plus fortement CCL17 et CCL22 que les cellules Th1, mais plus faiblement que les lymphocytes T naïfs activés (Hirata H. *et al.*, 2003). Chez les sujets asthmatiques, les concentrations de CCL22 dans le LBA sont plus importantes que celles observées chez les sujets contrôle et corrélerent avec l'HRB (Lezcano-Meza D. *et al.*, 2003). Une augmentation de l'expression de CCL17 et CCL22 est également observée dans les cellules épithéliales bronchiques des patients asthmatiques (Lezcano-Meza D. *et al.*, 2003; Sekiya T. *et al.*, 2000). Après provocation allergénique, chez les sujets atteints d'asthme allergique, les taux de CCL17 et CCL22 dans le LBA et leur expression dans les cellules épithéliales sont augmentés (Bochner B.S. *et al.*, 2003; Panina-Bordignon P. *et al.*, 2001; Pilette C. *et al.*, 2004). De même, dans des modèles murins d'asthme expérimental, l'expression protéique de ces deux chimiokines est augmentée dans les tissus pulmonaires (Gonzalo J.A. *et al.*, 1999; Kawasaki S. *et al.*, 2001). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps anti-CCL17 durant la phase de sensibilisation et avant chaque provocation à l'OVA diminue la réaction inflammatoire allergique (Kawasaki S. *et al.*, 2001). Dans un autre modèle de sensibilisation et de provocation à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration par voie intraveineuse d'un anticorps neutralisant anti-CCL22 avant chaque provocation à l'OVA

abroge l'HRB et induit une forte diminution de l'éosinophilie péribronchique et périvasculaire (Gonzalo J.A. *et al.*, 1999).

iii. Le CCR8 et son ligand CCL1

CCR8 est exprimé par divers types cellulaires incluant les lymphocytes Th2 (D'Ambrosio D. *et al.*, 1998), les cellules endothéliales (Bernardini G. *et al.*, 2000), les cellules musculaires lisses vasculaires (Haque N.S. *et al.*, 2004), les DC (Qu C. *et al.*, 2004), les cellules NK activées (Inngjerdigen M. *et al.*, 2000) et les Treg (Iellem A. *et al.*, 2001). Dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques, le nombre de cellules exprimant l'ARNm de CCR8 est augmenté comparativement aux sujets contrôle. Ces dernières sont essentiellement localisées dans la couche subépithéliale et certaines à l'intérieur de l'épithélium bronchique. La majorité des cellules CCR8⁺ sont des lymphocytes T CD4⁺ (Gonzalo J.A. *et al.*, 2007). Après provocation allergénique, une augmentation de cellules Th2 (CD3⁺IL-4⁺) exprimant le CCR8 et/ou le CCR4 est observée, alors qu'aucun recrutement de cellules Th1 (CD3⁺IFN- γ ⁺) n'est observé (Panina-Bordignon P. *et al.*, 2001). Ainsi, la provocation allergénique semble induire l'expression du ligand de CCR8. Des études utilisant des souris déficientes en CCR8 ont montré que la déficience en CCR8 n'altérait pas ou diminuait fortement la réaction pulmonaire allergique (Chensue S.W. *et al.*, 2001; Chung C.D. *et al.*, 2003; Gonzalo J.A. *et al.*, 2007; Goya I. *et al.*, 2003). L'administration par voie intrapéritonéale d'un anticorps neutralisant anti-CCR8 avant chaque provocation à l'OVA n'atténue pas la réponse Th2 (Chung C.D. *et al.*, 2003), alors que des cellules Th2 CCR8^{-/-} spécifiques de l'OVA injectées à des souris naïves avant la première provocation à l'OVA sont davantage recrutées dans les poumons que celles issues de souris wild-type (Mikhak Z. *et al.*, 2009). L'ensemble de ces résultats montre donc que le CCR8 n'est pas indispensable au recrutement des lymphocytes Th2 et au développement de la réaction pulmonaire allergique.

CCL1, seul ligand connu pour CCR8, est produite par diverses cellules incluant les lymphocytes T activés (Iellem A. *et al.*, 2000), les cellules endothéliales stimulées par l'apoptotéine A (Haque N.S. *et al.*, 2000), les mastocytes stimulés par les IgE (Gilchrest H. *et al.*, 2003) et les cellules épithéliales bronchiques activées par l'IL-4, l'IL-13 ou l'IFN- γ (Montes-Vizuet R. *et al.*, 2006). Dans les biopsies bronchiques de sujets asthmatiques allergiques, le nombre de cellules exprimant l'ARNm de CCL1 est augmenté au niveau de l'épithélium bronchique, de la couche subépithéliale et de la zone des muscles lisses comparativement aux sujets contrôle (Gonzalo J.A. *et al.*, 2007; Montes-Vizuet R. *et al.*, 2006). Les cellules CCL1⁺ sont principalement des mastocytes, et secondairement des basophiles (Gonzalo J.A. *et al.*, 2007). Dans les LBA de sujets asthmatiques allergiques, l'expression de CCL1 est plus élevée que celle observée chez les sujets contrôle et est positivement corrélée avec le nombre de cellules épithéliales présentes dans le LBA et le nombre de lymphocytes (Montes-Vizuet R. *et al.*,

2006). Les taux de CCL1 détectés dans les LBA présentent une grande variabilité (Pilette C. *et al.*, 2004). Dans des modèles murins d'asthme expérimental, similairement aux études sur les souris déficientes en CCR8, l'effet de la neutralisation de CCL1 est conflictuel (Bishop B. and Lloyd C.M., 2003; Chung C.D. *et al.*, 2003; Gonzalo J.A. *et al.*, 2007).

Au vu de l'ensemble de ces résultats, l'implication de l'axe CCL1/CCR8 dans la réaction pulmonaire allergique semble très controversée. Toutefois, comme nous l'avons vu dans le paragraphe portant sur les mastocytes (Chapitre 2, B-5-c-iv), des études ont montré l'importance du CCL1 produit par les mastocytes dans la réaction pulmonaire allergique.

iv. Le CXCR3 et ses ligands CXCL9, CXCL10 et CXCL11

Le CXCR3 est exprimé par divers types cellulaires incluant les lymphocytes T (principalement par les cellules Th1) (Park M.K. *et al.*, 2002), les éosinophiles (Medoff B.D. *et al.*, 2002), les mastocytes (Juremalm M. and Nilsson G., 2005) et les cellules NK (Gregoire C. *et al.*, 2007). Chez les patients asthmatiques, la proportion des cellules CXCR3⁺CD45RO⁺ parmi les lymphocytes T CD4⁺ circulants est augmentée parallèlement à la sévérité de l'asthme (Kurashima K. *et al.*, 2006). Un polymorphisme dans le gène codant pour CXCR3 a été associé à l'asthme, et plus particulièrement chez les hommes allergiques (Cheong H.S. *et al.*, 2005).

En ce qui concerne les ligands de CXCR3, l'expression de CXCL10 est augmentée après provocation allergénique chez les sujets asthmatiques allergiques (Bochner B.S. *et al.*, 2003; Pilette C. *et al.*, 2004). Après sensibilisation et provocations à l'OVA de souris wild-type, CXCL10 mais également CXCL9 et CXCL11 sont augmentées. Après sensibilisation et provocations à l'OVA de souris surexprimant le CXCL10 dans les cellules épithéliales, l'HRB, le nombre de macrophages et d'éosinophiles dans le LBA et les taux de cytokines Th2 (IL-4 et IL-5) sont amplifiés comparativement aux souris wild-type (Medoff B.D. *et al.*, 2002). De même, dans un modèle de sensibilisation et de provocation aux allergènes de cafard, l'administration de CXCL10 au moment de la provocation amplifie l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire (Thomas M.S. *et al.*, 2002). A l'inverse, chez des souris déficientes en CXCL10, la réaction pulmonaire allergique est réduite. Ainsi, CXCL10, chimiokine associée à la réponse Th1, contribue à l'inflammation pulmonaire allergique et à l'HRB (Medoff B.D. *et al.*, 2002). En revanche, dans un modèle de sensibilisation et de provocation aux allergènes de cafard, la neutralisation systémique de CXCL10 après que la réponse Th2 soit établie amplifie l'HRB et l'éosinophilie pulmonaire et diminue les taux d'IFN- γ présents dans les poumons et les ganglions drainants (Thomas M.S. *et al.*, 2002). Il semblerait donc que l'effet bénéfique ou délétère de CXCL10 soit dépendant de la phase de la réaction pulmonaire allergique mais également de la localisation de

CXCL10 : alors que le CXCL10 systémique est bénéfique pour le contrôle de la réponse allergique, le CXCL10 pulmonaire semble quant à lui amplifier cette réponse.

CXCL9, autre ligand de CXCR3 principalement exprimée par les cellules épithéliales bronchiques lors de la réaction pulmonaire allergique, est un inhibiteur de la réaction allergique. En effet, dans un modèle de sensibilisation et de provocation aux allergènes de cafard chez les souris BALB/c, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-CXCL9 par voie intratrachéale au moment de la provocation amplifie l'HRB, l'éosinophilie pulmonaire et les taux d'IL-4 dans le LBA et diminue les taux d'IL-12 et le nombre de cellules T CD4⁺CXCR3⁺ du LBA. A l'inverse, une administration par voie intratrachéale de CXCL9 au moment de la provocation diminue l'HRB, l'éosinophilie péribronchique et les taux de cytokines Th2 dans le LBA (IL-4 et IL-5) et augmente les taux d'IL-12 dans le LBA. Alors que CXCL10 induit la migration *in vitro* des éosinophiles, CXCL9 ne l'induit pas. De plus, une préincubation des éosinophiles avec CXCL9 inhibe la migration des éosinophiles induite par CCL11 (Thomas M.S. *et al.*, 2004).

v. Le CXCR4 et son ligand CXCL12

Le CXCR4 est exprimé constitutivement par les cellules T et sur de nombreux autres types cellulaires incluant les cellules B, les cellules NK, les cellules souches CD34⁺, les monocytes et les mastocytes (Juremalm M. and Nilsson G., 2005; Lloyd C.M. and Rankin S.M., 2003). Chez les sujets asthmatiques allergiques, l'expression de CXCR4 est observée sur les éosinophiles du LBA et du sang périphérique après provocation allergénique. Son expression avant la provocation allergénique ou chez des sujets contrôle n'a pas été étudiée (Liu L.Y. *et al.*, 2003). Pour certains auteurs, le CXCR4 n'est pas exprimé à la surface des éosinophiles (Lloyd C.M. and Rankin S.M., 2003). CXCL12 et son récepteur CXCR4 sont également impliqués dans la réaction pulmonaire allergique. Dans un modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA chez les souris C57BL/6, l'administration par voie intraveineuse d'anticorps neutralisant anti-CXCR4 ou anti-CXCL12 avant chaque provocation à l'OVA diminue le nombre de lymphocytes et d'éosinophiles dans le LBA, les infiltrats tissulaires et l'HRB (Gonzalo J.A. *et al.*, 2000). Dans un modèle de sensibilisation et de provocations aux allergènes de cafard chez les souris CBA/J, l'administration continue d'un antagoniste du CXCR4 durant la phase de sensibilisation diminue l'HRB, les infiltrats péribronchiques contenant les éosinophiles, les taux pulmonaires de cytokines et chimiokines Th2 (IL-4, IL-5, CCL17 et CCL22), alors que les cytokines Th1 (IFN- γ et IL-12) sont augmentées (Lukacs N.W. *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent un rôle de CXCR4 et de son ligand dans le développement de l'asthme allergique.

b. Une chimiokine particulière dans la pathologie pulmonaire : CCL18

CCL18 est exprimée dans de nombreuses pathologies incluant les pathologies pulmonaires, cancéreuses et cutanées et également l'arthrite. Néanmoins, son rôle exact n'est pas identifié.

i. *Du gène à la protéine*

Découverte entre 1997 et 1998 par plusieurs équipes, CCL18 est connue sous différents noms dont les principaux sont PARC (Pulmonary and Activation-Regulated Chemokines) (Hieshima K. *et al.*, 1997), DC-CK1 (Dendritic Cell ChemoKine 1) (Adema G.J. *et al.*, 1997), AMAC-1 (Alternative Macrophage Activation-associated CC chemokine-1) (Kodelja V. *et al.*, 1998) et MIP-4 (Macrophage Inflammatory Protein-4). Cette chimiokine est issue d'une duplication de deux gènes de CCL3 avec une délétion et une utilisation sélective de certains exons (Tasaki Y. *et al.*, 1999). Cette duplication étant apparue après la diversification des rongeurs et des primates, CCL18 n'est pas exprimée chez la souris.

La transcription et la traduction du gène aboutit à une protéine immature composée de 89 acides aminés. La protéine mature est obtenue après clivage du peptide signal (20 acides aminés) en position NH₂-terminale et est donc composée de 69 acides aminés. Chez l'homme, la protéine CCL18 est retrouvée au niveau sérique sous sa forme complète de 69 acides aminés mais également sous une forme tronquée de 68 acides aminés. Dans ce cas, l'alanine en position C-terminale est perdue (Struyf S. *et al.*, 2003). La stimulation de cellules mononucléées par du SEA aboutit à la sécrétion de deux autres formes tronquées en position NH₂-terminale (Schutyser E. *et al.*, 2001).

CCL18 est constitutivement et fortement exprimée au niveau du poumon. Elle est exprimée plus faiblement au niveau des ganglions et du thymus et de façon marginale au niveau de l'intestin grêle et de la moelle osseuse. La production de CCL18 est augmentée par les cytokines de profil Th2 (IL-4, IL-13) et l'IL-10, alors qu'elle est diminuée par l'IFN- γ .

ii. *Les sources cellulaires de CCL18*

Les cellules dendritiques

Les DC dérivées de monocytes (MD-DC) (différenciation en présence de GM-CSF/IL-4 ou GM-CSF/IL-13) expriment l'ARNm de CCL18 (Adema G.J. *et al.*, 1997; Sallusto F. *et al.*, 1999), ainsi que la protéine (Vulcano M. *et al.*, 2003). En revanche, les DC isolées du sang périphérique non activées n'expriment pas l'ARNm de CCL18 (Vissers J.L. *et al.*, 2001). Une stimulation avec le CD40L, l'IFN- γ , la PGE₂ ou les pathogènes *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC), *C.albicans* et le virus de l'influenza diminue la production de CCL18 par les MD-DC. A l'inverse, l'IL-10 et la vitamine D3 augmente la

production de CCL18 par les MD-DC (Vulcano M. *et al.*, 2003). La stimulation avec le LPS et le TNF- α donne des résultats contradictoires selon les études. L'utilisation de concentrations différentes pour stimuler les MD-DC pourrait expliquer les différences observées. Ainsi, de fortes concentrations de LPS (2 $\mu\text{g/ml}$) augmentent la production de CCL18, alors que de faibles concentrations (100 ng/ml) la diminuent. Une concentration de TNF- α de 10 ng/ml potentialise la production de CCL18, alors qu'une concentration de 20 ng/ml n'a pas d'effet (Vissers J.L. *et al.*, 2001; Vulcano M. *et al.*, 2003).

Les mDC et les pDC n'expriment pas constitutivement l'ARNm et la protéine CCL18 (Vissers J.L. *et al.*, 2001; Vulcano M. *et al.*, 2003). Néanmoins, l'induction de la maturation des mDC par le MCM (Monocyte-Conditioned Medium) conduit à l'expression de l'ARNm de CCL18, alors que l'activation des pDC par l'IL-3/CD40L n'y aboutit pas (Vissers J.L. *et al.*, 2001). De plus, ces deux types cellulaires ne produisent pas de CCL18 en réponse au LPS, au *Staphylococcus aureus* Cowan 1, au virus de l'influenza, au CpG, au CD40L ou à la vitamine D3. L'IL-10 induit, quant à elle, la production de CCL18 par les mDC mais pas par les pDC (Vulcano M. *et al.*, 2003). Cependant, comme nous le détaillerons ci-après, les pDC de sujets asthmatiques allergiques stimulées par un allergène relevant produisent CCL18 (de Nadai P. *et al.*, 2006).

Les monocytes et les macrophages

Les monocytes non activés n'expriment pas l'ARNm de CCL18 (Adema G.J. *et al.*, 1997; Sallusto F. *et al.*, 1999; Vissers J.L. *et al.*, 2001). Néanmoins, après 16 heures d'incubation en RPMI contenant 10% de SVF, ils produisent du CCL18 (Schraufstatter I. *et al.*, 2004). Après 3 jours et demi de culture avec de l'IL-4 ou de l'IL-4/GM-CSF, les monocytes expriment l'ARNm de CCL18. En revanche, l'IFN- γ ne l'induit pas (Adema G.J. *et al.*, 1997). Le LPS induit l'expression de l'ARNm et de la protéine CCL18 dans les 30 heures après stimulation (Sallusto F. *et al.*, 1999; Schraufstatter I. *et al.*, 2004). Au bout de 4 jours, l'ARNm de CCL18 est de nouveau indétectable (Adema G.J. *et al.*, 1997).

En fonction du mode d'activation, les macrophages peuvent être divisés en deux types : les macrophages M1 et les macrophages M2. L'activation des macrophages par l'IFN- γ , le TNF- α , le GM-CSF ou le LPS conduit à la génération de macrophages M1. Les macrophages M2 peuvent être générés par de nombreux stimuli incluant l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, le M-CSF, les complexes immuns et les ligands de TLR (Mantovani A. *et al.*, 2004). Une stimulation avec l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, le LPS ou le pathogène inactivé *Mycobacterium tuberculosis* induit l'expression de CCL18 (ARNm ou protéine selon les stimuli utilisés) par les macrophages M2 différenciés *in vitro* (Ferrara G. *et al.*, 2008; Kodelja V. *et al.*, 1998). En revanche, cette expression est inhibée par l'IFN- γ (Kodelja V. *et al.*, 1998). Après stimulation avec du *S.spirogenes* vivant, les macrophages M1 différenciés *in vitro* expriment l'ARNm

de CCL18. Cette expression apparaît après 2 heures de stimulation et ne cesse de croître jusqu'à 24 heures (Sallusto F. *et al.*, 1999).

In vivo, l'expression de l'ARNm de CCL18 est retrouvée dans les macrophages alvéolaires de sujets contrôles et de sujets asthmatiques (Kodelja V. *et al.*, 1998). Chez les sujets fumeurs, la production de CCL18 par les macrophages alvéolaires présents dans le LBA est réduite comparativement aux sujets non fumeurs (Kollert F. *et al.*, 2009). Après infection à *Mycobacterium tuberculosis*, la production de CCL18 est augmentée (Ferrara G. *et al.*, 2008).

Les autres types cellulaires

Les éosinophiles fraîchement isolés produisent CCL18, mais en moindre quantité que les monocytes (Schraufstatter I. *et al.*, 2004). Après stimulation avec la bactérie pathogène *Salmonella enterica* de sérotype *Typhimurium*, les cellules épithéliales de la lignée Caco2 sécrètent CCL18. Cette sécrétion est dépendante de l'invasivité de la bactérie puisqu'en présence de souches non invasives, la production de CCL18 est moindre (Rimoldi M. *et al.*, 2005). Enfin, après stimulation avec la combinaison IL-10/Vitamine D3, les neutrophiles du sang périphérique sécrètent CCL18. En revanche, la vitamine D3 seule ou l'IL-10 seule n'induit pas cette production (Auer J. *et al.*, 2007).

iii. L'activité biologique de CCL18 et son rôle dans les pathologies allergiques

Le(s) récepteur(s) de CCL18 et les cellules attirées ou activées par CCL18

Jusqu'à présent, parmi l'ensemble des récepteurs aux chimiokines connus, aucun récepteur pour le CCL18 n'a été clairement identifié. Néanmoins, il a été montré que CCL18 n'entre pas en compétition avec CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 sur les lymphocytes T, suggérant que CCL18 ne se fixe pas à leurs récepteurs (Hieshima K. *et al.*, 1997). De plus, CCL18 n'induit pas de flux calcique via le CCR1, CCR2, CCR3 et CCR5 mais entre en compétition avec le CCL11 pour la fixation sur le CCR3 à la surface de cellules transfectées ou d'éosinophiles. Ainsi, CCL18 agit comme un antagoniste de CCL11 en empêchant le flux calcique intracellulaire et la migration des éosinophiles induits par CCL11. Cet effet antagoniste n'est pas observé avec les chimiokines fixant CCR1, CCR5, CCR6, CCR7, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR3 et CX₃CR1 (Nibbs R.J. *et al.*, 2000).

CCL18 est capable d'attirer de nombreux types cellulaires incluant les lymphocytes T, les lymphocytes B, les MD-DC immatures et les basophiles. Parmi les lymphocytes T, l'attraction des lymphocytes T helper CD4⁺ et plus particulièrement des lymphocytes Th2, des lymphocytes T naïfs CD45RA⁺, des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et des lymphocytes mémoire CD45RO⁺CLA⁺ a été mise en évidence (Adema G.J. *et al.*, 1997; de Nadai P. *et al.*, 2006; Gunther C. *et al.*, 2005). Concernant les

lymphocytes B, CCL18 attire les lymphocytes B CD38⁻ du manteau des amygdales, mais pas les lymphocytes B du centre germinatif (Lindhout E. *et al.*, 2001). La migration vis-à-vis de CCL18 est dépendante d'un récepteur couplé à la protéine G puisque la toxine pertussique inhibe la migration des lymphocytes T naïfs CD45RA⁺ et des lymphocytes B (Adema G.J. *et al.*, 1997; Lindhout E. *et al.*, 2001). En revanche, les granulocytes, les monocytes et les MD-DC matures ne sont pas attirés par CCL18 (Hieshima K. *et al.*, 1997; Vulcano M. *et al.*, 2003). Outre son effet chimioattractant, CCL18 inhibe la prolifération de progéniteurs myéloïdes (Broxmeyer H.E. *et al.*, 1999) et induit la production de collagène par les fibroblastes pulmonaires (Atamas S.P. *et al.*, 2003) et la libération d'histamine par les basophiles (de Nadai P. *et al.*, 2006). Bien que CCL18 n'ait pas d'homologue murin, elle induit tout de même *in vitro* la migration des splénocytes murins, des lymphocytes B murins et des lymphocytes T murins avec une migration préférentielle des T naïfs (CD62L⁺) (Bruna-Romero O. *et al.*, 2003). Cette migration est également efficace *in vivo* puisque l'injection de CCL18 dans la cavité péritonéale augmente le recrutement des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ murins, alors que les monocytes et les granulocytes ne sont pas recrutés (Guan P. *et al.*, 1999).

L'implication de CCL18 dans la pathologie pulmonaire allergique

Chez les sujets asthmatiques allergiques, les taux de CCL18 dans les expectorations induites sont augmentés comparativement aux sujets contrôle non asthmatiques allergiques ou non asthmatiques non allergiques (Kim H.B. *et al.*, 2009). Chez les sujets asthmatiques allergiques non traités, les taux de CCL18 dans le LBA sont augmentés comparativement aux sujets asthmatiques allergiques traités aux stéroïdes inhalés ou aux sujets non allergiques. De même, une augmentation des taux sériques de CCL18 est observée chez les sujets asthmatiques allergiques non traités comparativement aux sujets non asthmatiques. Après 48 heures de stimulation par Der p 1 (500 ng/ml), les PBMC de sujets atteints d'asthme allergique produisent davantage de CCL18 que les PBMC de sujets non allergiques. Cette réponse est amplifiée après 72 heures de stimulation. D'un point de vue mécanistique, chez le sujet asthmatique allergique, la présentation de Der p 1 par les CPA aux cellules T induirait la production de cytokines Th2. Ces dernières conduiraient alors à la production de CCL18 par les monocytes. De plus, *in vitro*, les pDC purifiées du sang circulant de sujets allergiques produisent CCL18 en réponse à une stimulation *in vitro* avec Der p 1, alors qu'aucune production n'est observée par les pDC de sujets non allergiques. Ainsi, la production de CCL18 par ces deux types cellulaires pourrait être à l'origine de l'augmentation des taux de CCL18 chez les sujets asthmatiques allergiques (de Nadai P. *et al.*, 2006). De plus, comme nous l'avons signalé précédemment, CCL18 attire les lymphocytes Th2 (mais pas les lymphocytes Th1) et les basophiles et induit la libération d'histamine, suggérant un rôle important de CCL18 dans la réaction pulmonaire allergique.

Néanmoins, CCL18 pourrait également avoir un rôle anti-inflammatoire. En effet, cette chimiokine possède une activité antagoniste vis-à-vis de CCL11 (Nibbs R.J. *et al.*, 2000), chimiokine impliquée dans le recrutement des éosinophiles dans le tissu pulmonaire. De plus, *in vitro*, CCL18 est capable d'attirer différentes sous-populations régulatrices (clones Tr1 et les Treg CD4⁺CD25⁺) (Thèse C.Chenivesse, Tuteur Dr A.Tsicopoulos, 2008).

BUT DU TRAVAIL DE THESE

Comme nous l'avons discuté dans l'introduction, le rôle des cellules NK dans la pathologie allergique est encore inconnu. Néanmoins, certaines études ont montré des modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK isolées du sang périphérique de patients allergiques. Ainsi, dans le sang périphérique de patients asthmatiques, les cellules NK présentent des capacités cytotoxiques accrues, ainsi qu'une prédominance de cellules NK2 (productrices d'IL-5 et d'IL-13) comparativement à la prédominance de cellules NK1 (productrices d'IFN- γ) chez les sujets non allergiques (Timonen T. and Stenius-Aarniala B., 1985; Wei H. *et al.*, 2005). De plus, le dialogue entre les cellules NK et les cellules dendritiques est moins efficace chez le sujet asthmatique, menant ainsi à une capacité réduite de production d'IFN- γ par les cellules NK (Scordamaglia F. *et al.*, 2008). Dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique, la déplétion en cellules NK par l'anti-NK1.1 avant l'immunisation diminuait la réponse Th2 (Korsgren M. *et al.*, 1999). Cependant, l'interprétation de ce résultat est rendue difficile puisque le NK1.1 est retrouvé sur d'autres populations cellulaires incluant les cellules NKT.

Le but général du travail de thèse était donc d'étudier le rôle des cellules NK dans l'asthme allergique. Globalement, ces travaux peuvent être divisés en deux parties.

Première partie

L'étude de Korsgren et de ses collaborateurs pouvant suggérer une implication des cellules NK dans un modèle murin d'asthme expérimental (Korsgren M. *et al.*, 1999), nous avons tout d'abord décidé d'étudier les variations quantitatives et qualitatives des cellules NK dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique induit par l'OVA chez les souris BALB/cByJ. L'effet de la déplétion des cellules NK au moment des provocations allergéniques par l'administration d'un autre anticorps déplaçant les cellules NK, l'anti-AsialoGM1, a été également analysé.

L'étude des variations quantitatives et qualitatives des cellules NK dans un autre modèle d'inflammation pulmonaire allergique induit par l'OVA chez les C57BL/6 a aussi été réalisée. L'effet de la déplétion des cellules NK au moment des provocations allergéniques sera également évalué dans ce modèle à l'aide des souris transgéniques NKDTR, souris pouvant être déplétées spécifiquement en cellules NK par l'administration de toxine diphtérique.

Deuxième partie

Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe portant sur la chimiokine CCL18, cette dernière est préférentiellement exprimée dans les poumons. Or, en condition basale, les cellules NK murines ou humaines représentent approximativement 10% des lymphocytes pulmonaires (Gregoire C. *et al.*, 2007; Robinson B.W. *et al.*, 1984). Nous nous sommes donc demandé si les cellules NK étaient capables de répondre à CCL18 et donc si cette chimiokine pouvait contribuer à la migration des cellules NK vers les poumons. De plus, CCL18 étant impliquée dans l'asthme allergique, nous avons voulu déterminer s'il existait des différences de migration entre les cellules NK de sujets allergiques et les cellules NK de sujets non allergiques. Enfin, outre leur effet chimiotactique, certaines chimiokines incluant CCL18 sont capables d'activer les fonctions effectrices de leurs cellules «cibles». Nous avons donc cherché à déterminer si CCL18 était capable d'activer les fonctions des cellules NK.

Globalement, cette partie s'est donc focalisée sur l'effet de la chimiokine CCL18 sur les cellules NK humaines isolées du sang périphérique de sujets allergiques et non allergiques.

**DEUXIEME PARTIE: TRAVAUX DE RECHERCHE, DISCUSSION ET
PERSPECTIVES**

PREMIERE PARTIE

ETUDE DES VARIATIONS QUANTITATIVES ET QUALITATIVES DES CELLULES NK ET EFFET DE LEUR DEPLETION DANS UN MODELE D'ASTHME EXPERIMENTAL

1. Les cellules NK s'accumulent dans les ganglions médiastinaux et régulent l'éosinophilie pulmonaire dans un modèle murin d'asthme

ARTICLE EN REVISION : C. Plé, M. Barrier, L. Amniai, P. Marquillies, J. Bertout, A. Tscopoulos, T. Walzer, P. Lassalle and C. Duez. *Natural Killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma*

Résumé

Plusieurs données suggèrent un rôle clé du système immunitaire inné dans le développement de l'asthme. Bien que le rôle des cellules NK dans cette pathologie ne soit pas réellement établi, certaines études ont mis en évidence des modifications phénotypiques et fonctionnelles de cette population cellulaire isolée du sang périphérique de sujets allergiques. Leur répartition et leur état d'activation dans les sites inflammatoire (poumon) et régulateur (ganglions médiastinaux) de la réaction allergique est inconnu. Nous avons donc décidé d'analyser les variations quantitatives et qualitatives des cellules NK dans les poumons et les ganglions médiastinaux dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique induit par l'OVA chez les souris BALB/c. Outre les modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK observées chez les sujets allergiques, Korsgren et ses collaborateurs ont montré dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique que la déplétion des cellules NK par administration d'anti-NK1.1 avant l'immunisation atténuait la réponse Th2. Ces résultats étaient intéressants mais difficile à interpréter puisque le NK1.1 est exprimé par d'autres cellules impliquées dans l'inflammation pulmonaire allergique incluant notamment les cellules NKT. Nous avons donc décidé d'évaluer l'effet de la déplétion en cellules NK par administration d'anticorps anti-ASGM1, anticorps ne déplaçant pas les cellules NKT, avant les provocations allergéniques dans notre modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique.

Nous avons montré que la sensibilisation et les provocations allergéniques à l'OVA augmentaient le nombre de cellules NK, et plus particulièrement de cellules NK immatures dans les ganglions médiastinaux. Outre cette variation quantitative, l'expression du CD86 à la surface des cellules NK était augmentée, traduisant ainsi leur activation. Dans les poumons, aucune modification du nombre total de cellules NK n'a été observée chez les souris sensibilisées et provoquées à l'OVA. Néanmoins,

une diminution significative du nombre de cellules NK les plus matures a été observée. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du nombre de cellules NK dans les ganglions médiastinaux n'était pas due à un recrutement de cellules NK pulmonaires. D'un point de vue phénotypique, comme dans les ganglions médiastinaux, les cellules NK pulmonaires étaient activées. Afin de déterminer l'origine de l'augmentation des cellules NK dans les ganglions médiastinaux, une comparaison du nombre de cellules NK, de précurseurs de cellules NK et de cellules NK ayant proliféré (analysé par l'incorporation du BrdU) a été effectuée. Alors que le nombre de cellules NK était augmenté dans les ganglions médiastinaux des souris sensibilisées et provoquées à l'OVA, aucune modification du nombre de cellules NK n'a été observée dans la moelle osseuse et le sang suggérant que les cellules NK ne provenaient pas de la moelle osseuse. Après sensibilisation et provocations à l'OVA, les précurseurs de cellules NK tendaient à l'augmentation dans la moelle osseuse alors qu'aucune modification significative n'était observée dans le sang et les ganglions médiastinaux. Ceci suggère que l'augmentation du nombre de cellules NK dans les ganglions médiastinaux n'était pas liée à une augmentation de la différenciation de précurseurs de cellules NK en cellules NK. Le pourcentage de cellules NK ayant proliféré (BrdU⁺) était augmenté dans les ganglions médiastinaux et tendait à l'augmentation dans le sang, alors qu'aucune modification n'était observée dans la moelle osseuse suggérant que les cellules NK ayant proliféré pourraient provenir des ganglions médiastinaux et/ou du sang. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'augmentation du nombre de cellules NK dans les ganglions médiastinaux pourrait être le résultat d'une prolifération *in situ* et/ou d'un recrutement à partir du sang de cellules NK ayant proliféré.

L'ensemble des résultats décrits ci-dessus suggère que les cellules NK pourraient participer à la réaction pulmonaire allergique. Comme les résultats utilisant l'anti-NK1.1 pour dépléter les cellules NK sont difficilement interprétables étant donné l'effet de cet anticorps sur les cellules NKT, l'effet de la déplétion des cellules NK dans la réaction pulmonaire allergique a été analysé en utilisant l'anti-ASGM1. L'injection d'un anticorps anti-ASGM1 au moment des provocations allergéniques a entraîné une déplétion des cellules NK de 72,6%. Cette dernière a conduit à une diminution de l'éosinophilie au niveau du lavage bronchoalvéolaire sans modifier l'hyperréactivité bronchique ni les taux sériques d'IgE, IgG1 et IgG2a spécifiques de l'OVA.

Conclusion

Notre étude montre que la sensibilisation pulmonaire allergique induit une modification du compartiment des cellules NK au niveau des sites régulateur et inflammatoire et suggère que les cellules NK pourraient participer à la régulation de la réponse asthmatique.

Natural Killer cells accumulate in lung-draining lymph nodes and regulate airway eosinophilia in a murine model of asthma

Coline Ple^{1*}, Mathieu Barrier^{1*}, Latiffa Amniai¹, Philippe Marquillies¹, Julie Bertout², Anne Tsicopoulos¹, Thierry Walzer³, Philippe Lassalle¹ and Catherine Duez^{1§}

Increasing evidences suggest a key role for the innate immune system in asthma development. Although the role of Natural Killer (NK) cells in allergic asthma is poorly known, modifications of the blood NK cell populations have been found in asthmatic and/or allergic patients. Their repartition and activation status in the inflammatory (lungs) and the regulatory (draining lymph nodes) sites of the allergic reaction are unknown. The aim of our study was to monitor NK cell migration pattern and activation status and to investigate the consequences of NK cell depletion during allergic airway reaction in a mouse model. Ovalbumin sensitization and challenges of BALB/cByJ mice had no effect on the total number of lung NK cells but significantly decreased the number of most mature NK cells, and increased the level of the activation marker CD86. In the lung-draining mediastinal lymph nodes, ovalbumin sensitization and challenges led to increased number of NK cells, and more precisely immature NK cells, and increased expression of CD86. Ovalbumin sensitized mice also exhibited increased percentage of proliferating NK cells in lung-draining mediastinal lymph nodes. Anti-ASGM1 antibody treatment depleted most NK cells and decreased bronchoalveolar lavage eosinophilia but did not modify airway responsiveness. Altogether, our study shows that pulmonary allergic sensitization induces modification in the NK cell compartment at the inflammatory and regulatory sites and suggests that NK cells may participate to the regulation of the asthmatic response, and more particularly to the allergic airway eosinophilia.

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease which prevalence and severity are increasing throughout the western world. Physiopathology of asthma includes airway obstruction, hyperreactivity and inflammation. Mucosal eosinophilic inflammation is one of the distinctive features of asthma and the particular T helper type 2 (Th2) phenotype of allergic patients favours it. In general, the clinical severity of asthma correlates well with the degree of inflammation [1]. Numerous studies suggest a key role for the innate immune system in asthma development [2]. Nonetheless, whereas the role of the adaptive immune response has been well characterized, the role of the innate immune system in the pathogenesis of asthma is less clear. In particular,

the role of NK cells in asthma is unknown although several studies suggest their potential involvement [3-5].

NK cells are key weapons of the innate immune system and were primarily described for their anti-microbial and anti-tumoral activities [6]. Their development mainly occurs in bone marrow (BM) and alternatively in lymph nodes and thymus [7-9]. NK cells are widely distributed throughout the body both in humans and mice, with a more important frequency in non lymphoid organs compared to lymphoid organs [10]. At steady state, NK cells represent about 10% of lung lymphocytes both in human and mouse [10, 11]. In mice, NK cell frequency was found to be the highest in lungs compared to other organs [10]. At steady state, NK cells are also present at a very low frequency (less than 1%) in the human and mouse lymph nodes [10, 12-14]. After immunization or infection, mouse NK cells are enriched in the paracortex of draining lymph nodes, where they can influence subsequent adaptive immune response [12, 14, 15]. Defects in NK cell functions were shown in peripheral blood NK cells from asthmatic allergic

¹ INSERM, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U774, 59019 Lille, France ; Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France ; Université de Lille 2, 59800 Lille, France ² INSERM U629, 59019 Lille, France ; Institut Pasteur de Lille, Lille, France ³ Current address : INSERM U851, 69365 Lyon, France ; Université de Lyon 1, 69365 Lyon, France

* Contributed equally to this work

patients, with increased cytotoxicity and predominance of NK2 cells (producing IL-5 and IL-13) over NK1 cells (producing IFN- γ), compared to healthy non-allergic donors [4, 5]. More recently, the crosstalk between NK cells and dendritic cells was shown to be less efficient with NK cells isolated from allergic patients compared to non allergic patients. This defect led to reduced capacity of NK cells to produce IFN- γ in response to dendritic cell stimulation [3]. In a mouse model of allergic airway inflammation, NK cell depletion obtained after anti-NK1.1 antibody administration before immunization inhibited lung eosinophilia, CD3⁺ T cell infiltrate and ovalbumin (OVA)-induced levels of IL-4, IL-5 and IL-12 in bronchoalveolar lavage (BAL) of C57BL/6 mice [16]. However NK1.1 is not solely expressed by NK cells, but also found on some T cells, especially most NKT cells thus making difficult the interpretation of this study. Indeed NKT cells were found to play a role in the development of experimental asthma [17, 18].

The aim of our study was first to monitor the number and the phenotype of NK cells in the lungs as site of inflammation and the lung-draining mediastinal lymph nodes (MLN) as site of regulation during allergic airway inflammation. We secondly assessed the consequences of NK cell depletion in another mouse model of allergic asthma using a different NK cell depleting antibody, without effect on NKT cell subset [19]. In a model of OVA sensitization in BALB/cByJ mice, we showed that in parallel to airway inflammation and airway hyperresponsiveness (AHR), OVA sensitization increased NK cell activation in the lungs, and affected NK cell number, subset distribution, activation status and proliferation in MLN. Moreover, NK cell depletion decreased lung eosinophilia, without modifying AHR. Therefore, our results suggest that NK cells may participate to the regulation of the asthmatic response.

Material and Methods

Sensitization and airway challenges

7 weeks old female BALB/c ByJ were obtained from Iffa Credo (L'Arbresle, France) and were maintained on OVA-free diet. All procedures were approved by regional ethical committee. Mice were sensitized by intraperitoneal (i.p) injection of 20 μ g OVA (Grade V; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) emulsified in 100 μ l of aluminium hydroxide (Reheis, NY, USA) on days 0 and 10, and challenged with OVA (2% in Phosphate Buffer Saline (PBS)) by aerosol on days 20, 21 and 22 (afterwards called OVA mice) (figure 1). The aerosol administrations

were performed for 20 minutes using an ultrasonic nebulizer (Ultramed, Medicalia, Italy). Control group (afterwards called PBS mice) received i.p injection of PBS emulsified in 100 μ l of aluminium hydroxide and was challenged by PBS aerosols.

Tissue single cell suspension

Before (T0) or at various time after the last PBS or OVA challenge (24h, 48h, 72h or 7days), lungs, MLN, blood, bone marrow (BM) and spleen were harvested (Figure 1a) and cells were isolated as followed.

Lungs were perfused with PBS containing 0.5 mM EDTA, removed and cut into pieces. After incubation in 3 ml of complete RPMI (Lonza, Basel, Switzerland) (RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 IU/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 1% Ticarpen, 2mM L-glutamine) containing type IV collagenase (0.5 mg/ml; Serlabo, Paris, France) and DNase I (2 UI/ml; Roche Diagnostics, Meylan, France) for 60 minutes at 37°C, the digested lungs were shorn with a sterile 20-gauge needle and the red blood cells were lysed using a buffer containing 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ and 0.5 mM EDTA diluted in sterile water for 15 minutes on ice. Pellets were resuspended in Percoll® 33% (Amersham GE Healthcare, UK) at room temperature and centrifuged during 20 minutes at 2300g. Cells were resuspended in PBS, filtered through 100 μ m porous nylon mesh (Saati France, Saily Saillisel, France) and counted.

MLN and spleens were homogenized in a Tenbroeck tissue grinder. Blood peripheral cells were obtained after 2 successive lyses of red blood cells. BM cells were isolated from femurs. For all organs, cells were filtered through 100 μ m porous nylon mesh, resuspended in PBS and counted.

Surface stainings for flow cytometry analysis

Cells isolated from lungs and MLN were resuspended at a concentration of 1×10^7 cells/ml in PBS containing 2% fetal calf serum. 10^6 cells were incubated with rat anti-mouse CD16/CD32 (2.5 μ g/ml, BD Pharmingen, San Diego, USA) for 10 minutes on ice. Surface stainings (30 minutes on ice) were performed using fluorescein, phycoerythrin, cychrome or allophycocyanin conjugated monoclonal antibodies (mAbs) against CD3, CD49b, CD27, CD11b, CD69 and CD86 (eBiosciences, Montrouge, France) and the matched IgG isotypes according to the manufacturer's instructions. Stained cells were immediately analyzed by flow cytometry (FACScalibur®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). NK cells were identified as CD49b⁺CD3⁻ cells.

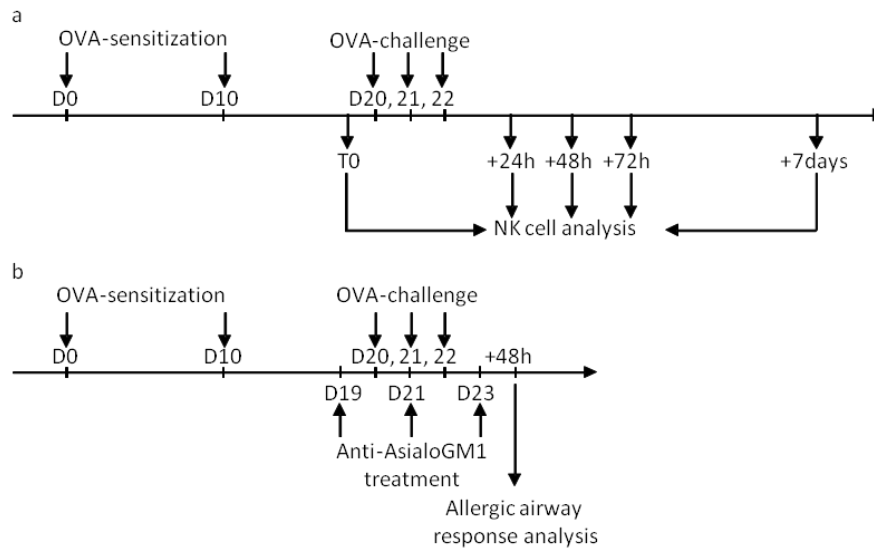


Figure 1: Protocols of mouse sensitization, anti-asialo-GM1 treatment and NK cell analysis. Female BALB/cByJ mice were sensitized to OVA by two intraperitoneal injections of OVA-alum, followed by 3 OVA aerosols. Control mice were administered with PBS instead of OVA. (a) NK cell numbers were measured before (T0) or at various times after the last OVA challenge (24h, 48h, 72h or 7days). Phenotype and proliferation analyses were performed at 48h. (b) Anti-asialo-GM1 antibody was injected intravenously one day before the first OVA challenge and then every other day until analysis. Analysis was performed 48 hours after the last OVA aerosol.

Measurement of BrdU incorporation

Mice were given one i.p injection of 1.5 mg BrdU (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) on day 23. 12 hours after the injection, BM, MLN and blood were harvested and cells isolated as previously described. Cells were resuspended at a concentration of 1×10^7 cells/ml in PBS containing 2% of serum from fetal calf, horse, rat and mouse, 10 $\mu\text{g/ml}$ rat anti-mouse CD16/CD32 and 0.09% sodium azide. Surface stainings (30 minutes on ice) of 10^6 cells were performed using APC-H7, Peridin-Chlorophyll-protein complex, PacificBlue, phycoerythrin, phycoerythrin-cyochrome7 or Alexa Fluor 647 conjugated mAbs against CD19, CD5, Gr-1, CD122, CD49b and NKp46 (Becton Dickinson for anti-CD19 and anti-CD5 mAbs, and eBiosciences for the other mAbs). After fixation and permeabilization, cells were treated with DNase and stained with FITC anti-BrdU mAb, according to manufacturer instructions. BrdU incorporation for NK cells was measured by flow cytometry (FACSARIA, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). NK cell precursors (NKp) were defined as Lineage (Lin)⁻ (CD5⁻CD19⁻Gr1⁻) CD122⁺CD49b⁺NKp46⁻ and NK cells were defined as Lin⁻CD122⁺CD49b⁺NKp46⁺.

In vivo NK cell depletion

NK cell depletion was performed by intravenous injections of rabbit anti-asialo ganglio-N-tetraosylceramide (ASGM1) antibodies (400 $\mu\text{g/mouse}$; Wako, Neuss, Deutschland). The first injection was performed one day before the first

OVA challenge and every other day until analysis (Figure 1b). Preliminary experiments showed that this protocol resulted in the best depletion of NK cells, whilst no depletion of F4/80⁺, IA^{d+}/CD11c⁺, CD19⁺ and CD3⁺ cells was observed in lungs. Similar depletion was measured in lungs, MLN and spleen and averaged 72.6% at the time of the analysis. Non depleted groups received rabbit immunoglobulins (Ig) as control antibodies (400 $\mu\text{g/mouse}$; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) by intravenous injections using the same protocol.

Lung resistance measurement

Lung resistance was assessed using Flexivent[®] (Scireq[®], Montreal, Canada). Mice were anesthetized (5 ml/kg body weight of 10% medetomidine (Pfizer) and 10% ketamine (Merial)), paralyzed (5 ml/kg pancuronium bromide 1% (Organon)) and immediately intubated with an 18-gauge catheter, followed by mechanical ventilation. Respiratory frequency was set at 150 breaths/min with a tidal volume of 0.2 ml, and a positive-end expiratory pressure of 2 ml H₂O was applied. Mice were exposed to nebulized PBS followed by increasing concentrations of nebulized metacholine (3-25mg/ml in PBS) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) using an ultrasonic nebulizer (Aeroneb, Aerogen, Galway, Ireland). For each dose, 10 cycles of nebulization and measurements were performed. Nebulization was done during the first cycle and consisted of 20 puffs per 10 s, with each puff of aerosol delivery lasting 10 ms. For

each cycle, measurements were obtained for 15s followed by ventilation for 5s. Baseline resistance was restored before administration of the subsequent doses of methacholine. For each dose, the maximum resistance value measured was taken.

BAL cellular composition

Forty eight hours after the last OVA challenge and immediately after the measurement of lung resistance, lungs were lavaged via the tracheal cannula with 1ml of PBS. Total leucocyte numbers were counted, cytocentrifuged (Shandon cytopsin 4; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) and stained with May Grünwald Giemsa (Diff-Quik®, Dade Behring, Newark, USA). Cells were identified as macrophages, eosinophils, neutrophils and lymphocytes by standard hematological procedures and at least 200 cells were counted under x400 magnification.

Measurement of OVA-specific serum Ig

The OVA-specific serum IgG1 and IgG2a were measured by ELISA as previously described [20]. Briefly, 96-well plates (Corning Incorporated, NY, USA) were coated with OVA (100 µg/ml). After addition of serum samples, OVA-specific IgG1 and IgG2a were detected using Horse Radish Peroxidase-labeled goat anti-IgG1 and anti-IgG2a (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA). For OVA-specific IgE titration, 96-well plates (Corning Incorporated) were coating with purified rat anti-mouse IgE (2 µg/ml, clone R35-72; BD Pharmingen). After addition of serum samples, OVA-specific IgE were detecting by addition of biotinylated OVA followed by incubation with streptavidine-horse radish peroxidase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The OVA-specific Ig titers of the samples were related to pooled standards that were generated in the laboratory and expressed as ELISA units per ml (EU/ml).

Statistical analysis

Values of all measurements were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were done using GraphPad Prism 4 software. Nonparametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests were used to calculate significance levels for most measurements. For some measurements, values were compared using the two way Anova. When statistical significance was observed, differences were subsequently analyzed by using the Bonferroni test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Increase of CD11b^{low} NK cells in the MLN after OVA sensitization and challenges

We first investigated the kinetics of NK cell numbers in the different compartments where the allergic reaction occurs: BAL, lungs and lung-draining MLN, at different time points during the treatment with OVA. No NK cells were detected in BAL of OVA or PBS mice at any time (data not shown). OVA sensitization and airway challenges did not modify the number of NK cells in lungs (Figure 2a), whilst decreasing the NK cell percentage significantly at 7 days (Figure 2b) compared to the PBS group. In contrast to the lungs, the number of NK cells in the MLN significantly increased 48 hours after the last OVA challenge ($26.5 \pm 3.9 \times 10^3$ compared to $4.4 \pm 1.0 \times 10^3$ in the PBS mice) (Figure 2c). This increase was specific to MLN, related to numbers but not percentages and was not observed in the mesenteric lymph nodes (Figure 2d and data not shown).

Murine NK cells can be divided into 4 subsets according to the level of CD27 and CD11b expression. Highly immature CD27^{low}CD11b^{low}, immature CD27^{high}CD11b^{low}, mature CD27^{high}CD11b^{high} and most mature CD27^{low}CD11b^{high} NK cells develop sequentially. This developmental program appears to be associated with a progressive acquisition of NK cell effector functions [21, 22]. We characterized NK cell subsets in lungs and MLN 48h after the last OVA challenge, time corresponding to the increase of total NK cell number in MLN.

In the lungs, CD27^{low}CD11b^{high} NK cells were found to be the main subset in PBS and OVA mice. OVA sensitization and challenges significantly decreased their number ($6.3 \pm 0.9 \times 10^5$ compared to $8.0 \pm 0.5 \times 10^5$ in PBS mice), but did not modify their percentage (Figures 3a and b). The percentage of CD86-expressing lung NK cells ($25.1 \pm 1.8\%$ compared to $18.8 \pm 1.0\%$ in PBS mice), and CD86 expression (2.3 ± 0.3 compared to $1.5 \pm 0.1 \Delta\text{MFI}$ in PBS mice) from OVA mice were significantly increased (Figures 3c), and a trend towards an increased expression of the early activation marker CD69 was observed (Figure 3d). These results suggest that OVA sensitization and challenges led to NK cell activation in the lungs.

In the MLN, OVA sensitization and challenges led to a significant increased number of the two subsets of immature NK cells (CD27^{low}CD11b^{low}: $8.0 \pm 0.6 \times 10^3$ and $13.4 \pm 2.1 \times 10^3$, CD27^{high}CD11b^{low}: $7.4 \pm 2.0 \times 10^3$ and $17.4 \pm 6.7 \times 10^3$ in PBS and OVA

mice, respectively). No significant modification of mature NK cell number was observed (Figure 3e). These results were concordant with a significant increase in the percentage of immature CD27^{high}CD11b^{low} NK cells (43.2±3.1% compared to 31.3±2.3% in PBS mice), and a decrease in the percentage of mature CD27^{high}CD11b^{high} NK cells (14.3±1.0% compared to 21.1±2.1% in PBS mice) (Figure 3f). OVA sensitization and challenges did not modify the percentages of CD86- and CD69-

expressing NK cells, nor the expression of CD69, but significantly increased the level of CD86 expression (Δ MFI = 6.4±0.4 compared to 4.3±0.8 in PBS mice), sign of recent activation (Figures 3g-h).

Altogether, these data show that the number of immature NK cells increased in the MLN during the allergic reaction and that some NK cells showed signs of recent activation.

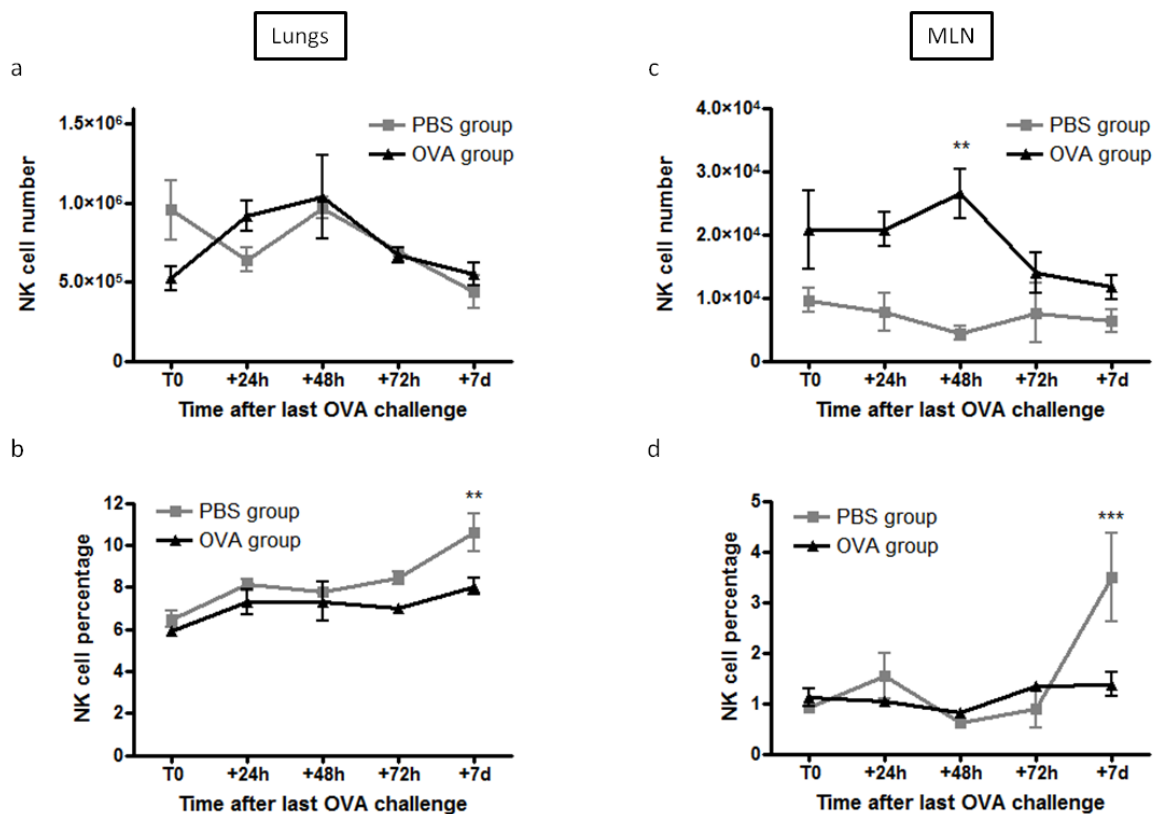


Figure 2: Effect of OVA-sensitization and OVA challenges on NK cell numbers and percentages in lungs and MLN. Before (T0) or at various times after the last OVA challenge (24h, 48h, 72h or 7days), cell suspension was obtained from lungs (a, b) and MLN (c, d) and stained using anti-CD49b (anti-DX5) and anti-CD3 antibodies. (a, c) Kinetics of NK cell numbers ± SEM. (b, d) Kinetics of NK cell percentages ± SEM.

Increased percentage of proliferating NK cells in MLN upon OVA-induced airway inflammation

Most NK cells are believed to develop in the BM from NKp but they may also develop in lymph nodes [7]. Hence, the increase of NK cells observed in MLN upon airway inflammation may be due to *in situ* development and proliferation. Alternatively, they may be recruited from the circulation. To address these different possibilities, we compared the numbers of NK cells (Figure 4a) and NKp (Figure 4b) and the percentage of proliferating NK cells (analyzed by BrdU incorporation) (Figure 4c) in the BM, blood and MLN upon OVA-induced airway inflammation. Although NK cell number was increased in the MLN of OVA mice compared to PBS mice, no modification in BM and blood was

observed (Figure 4a), suggesting that NK cells did not come from BM through blood. Although NKp number tended to increase in BM, no significant modifications were seen in blood and MLN (Figure 4b), suggesting that increased NK cell number in the MLN was not caused by increased NK cell differentiation from NKp. Finally, the percentage of BrdU⁺ NK cells significantly increased in the MLN upon airway inflammation (2.6±0.4% compared to 0.7±0.3% in PBS mice). Whilst no modification was observed in BM, the percentage of BrdU⁺ NK cells tended to increase in blood (15.5±2.2% compared to 10.9±1.7% in PBS mice) (Figure 4c), suggesting that proliferating NK cells may originate from MLN and/or blood.

Altogether, these results suggest that increased number of NK cells in MLN after allergic

sensitization may result from NK cell proliferation or the recruitment of blood proliferating NK cells.

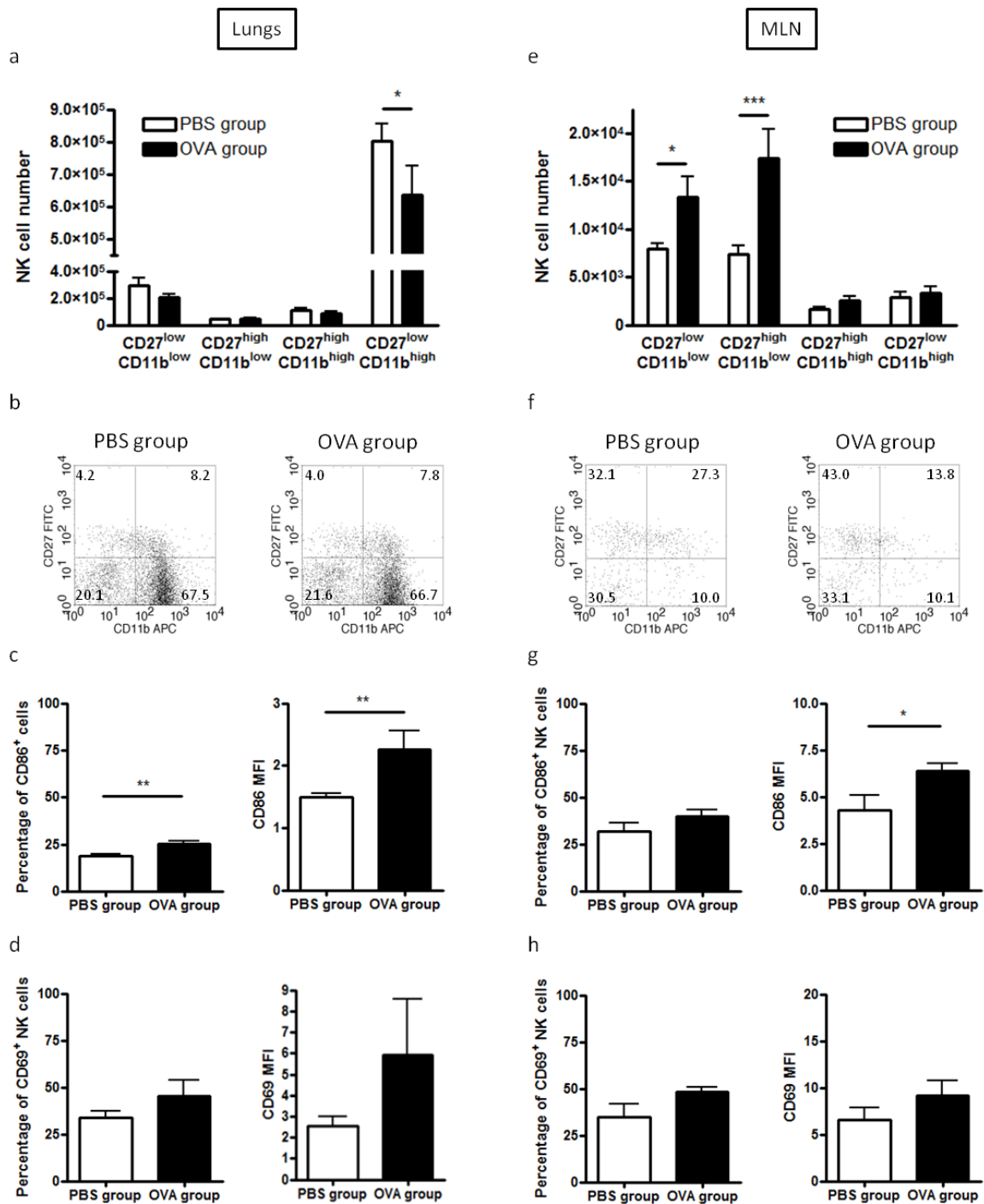


Figure 3: Effect of OVA-sensitization and OVA challenges on NK cell subsets and activation in lungs and MLN.

Cell suspension was obtained from lungs (a-d) and MLN (e-h) and stained using anti-CD49b and anti-CD3 antibodies. (a, b, e, f) Distribution of NK cell subsets according to the expression levels of CD27 and CD11b in the CD49b⁺CD3⁻ gate at 48 hours (n=6 per group). Results are shown as the mean cell number according to the subset \pm SEM (a, e) and as representative dot plots with the percentage of each subset in quadrant (b, f). (c, d, g, h) Mean percentage and Δ MFI (Mean Fluorescence Intensity for mAb of interest - Mean Fluorescence Intensity for control mAb) \pm SEM of CD86 and CD69 expression (c and g, d and h, respectively) on CD3⁻CD49b⁺ NK cells (n=6 per group). *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001.

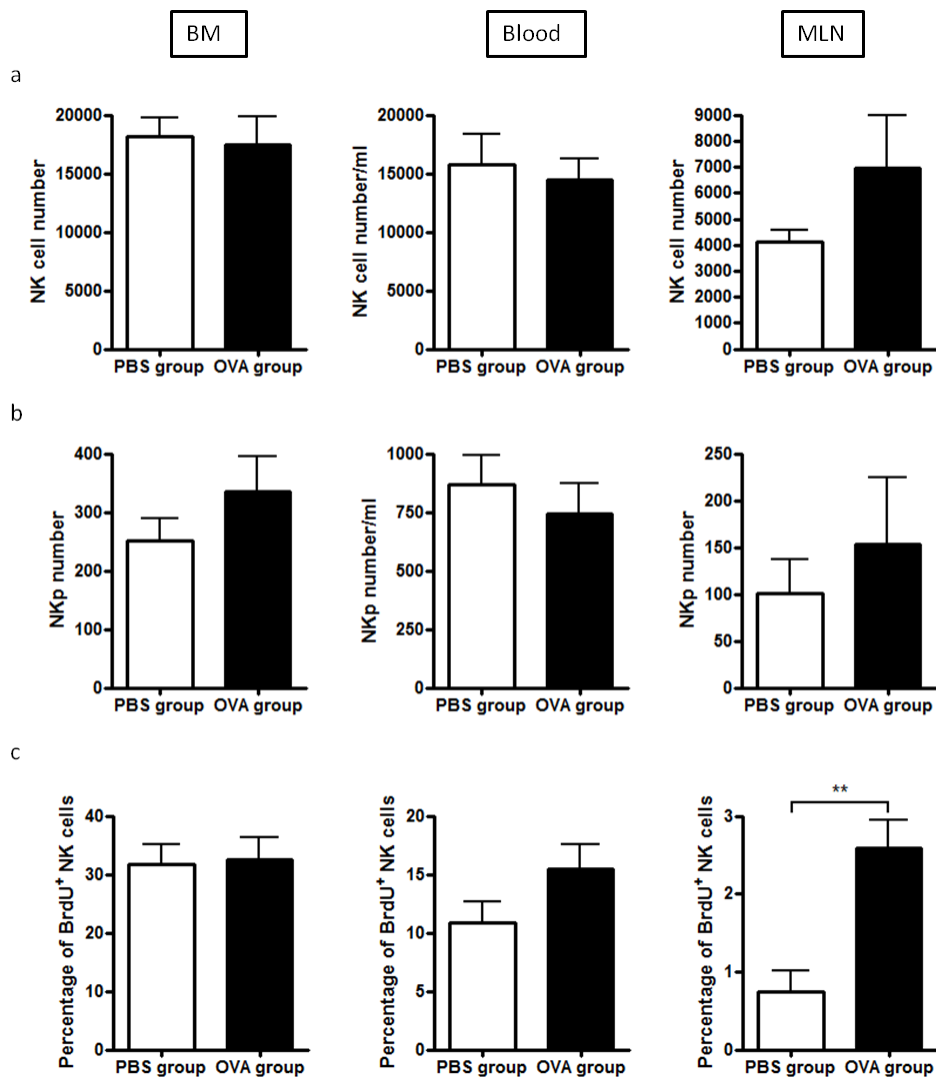


Figure 4: Effect of OVA sensitization and challenges on NK cell, NKp and proliferating NK cell number or percentage in BM, blood and MLN. Flow cytometry measurements were performed on cells isolated from PBS (n=6) and OVA mice (n=7) at 48h. NK cells were defined as Lineage (Lin)⁻ (CD5⁻CD19⁻Gr1⁻) CD122⁺CD49b⁺NKp46⁺ (a, c), and NKp as Lin⁻CD122⁺CD49b⁻NKp46⁻ (b). Twelve hours after intraperitoneal administration, BrdU incorporation was measured in BM, blood and MLN NK cells by flow cytometry. Results are expressed as cell numbers (a, b) or percentage of BrdU⁺ NK cells (c) ±SEM. **: p<0.01.

Depletion of NK cells decreased BAL eosinophilia induced by OVA challenges

The above described modifications of NK cell subsets, migration and activation in the context of an allergic reaction suggest that NK may play a role in the allergic reaction. However the previous published paper on NK cell depletion using NK1-1⁺ antibody remains inconclusive because of its concomitant effect on some T cell subsets including NKT cells, therefore we sought to evaluate the role of NK cells in the pulmonary allergic reaction using an anti-ASGM1 antibody which deplete NK cells without depleting NKT cells [19]. OVA sensitization led to a significant increase in airway responsiveness and BAL eosinophilia and

an increase of serum OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a (Figure 5). Baseline lung resistances were similar amongst all groups. Anti-ASGM1-treated OVA mice developed AHR similarly to control antibody treated OVA mice (Figure 5a). However, NK cell depletion significantly decreased BAL eosinophilia ($0.8 \pm 0.3 \times 10^4$ in anti-ASGM1-treated OVA mice compared to $7.1 \pm 2.6 \times 10^4$ in control Ig-treated OVA mice) without modifying macrophage and lymphocyte numbers (Figure 5b). No modification in the levels of serum OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a was found (Figure 5c). Thus, these data suggest that NK cells may regulate the airway inflammation induced by priming and challenges with OVA.

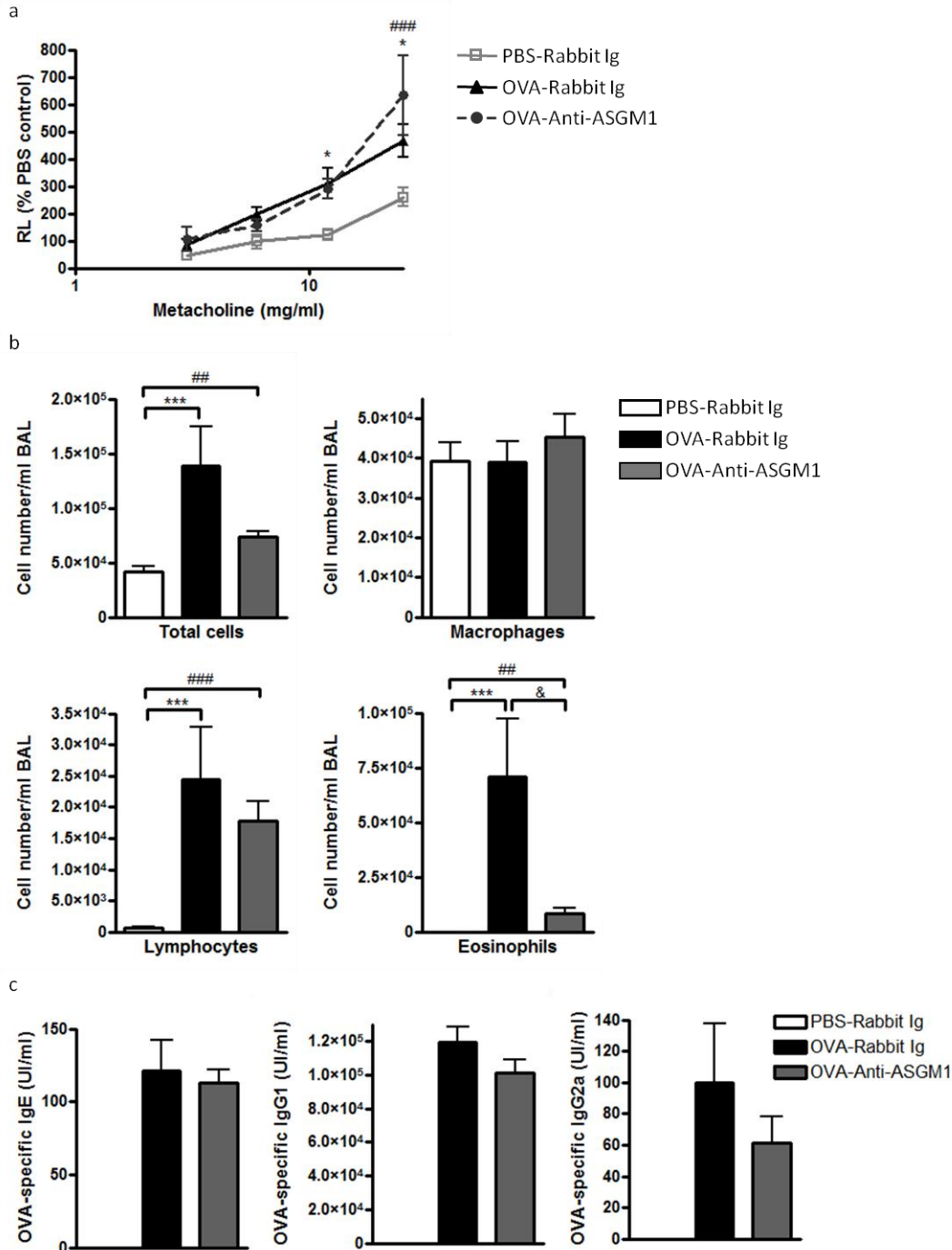


Figure 5: Anti-ASGM1 treatment does not modify AHR nor IgE, IgG1 and IgG2a but decreases BAL eosinophilia. OVA or PBS mice were treated with anti-ASGM1 or Rabbit Ig as described in Figure 1. (a) Lung resistance (R_L) was measured after nebulization of increasing doses of metacholine for Ig-treated PBS mice (open square; $n=11$), Ig-treated OVA mice (filled triangle; $n=11$) and Anti-ASGM1-treated OVA mice (filled circle; $n=9$). Results are expressed as mean \pm SEM of percentage of maximum R_L increase above PBS-induced R_L . (b) Total cell, macrophage, lymphocyte and eosinophil numbers in BAL were microscopically identified and counted after May Grünwald staining in Ig-treated PBS mice ($n=13$), Ig-treated OVA mice ($n=15$) and Anti-ASGM1-treated OVA mice ($n=12$). Results are expressed as mean \pm SEM of cell number/ml. (c) OVA-specific IgE, IgG1 and IgG2a were measured by ELISA in Ig-treated PBS mice ($n=11-13$), Ig-treated OVA mice ($n=11-15$) and Anti-ASGM1-treated OVA mice ($n=9-13$). Results are expressed as mean \pm SEM EU/ml. *: $p<0.05$ and ***: $p<0.001$ between Ig-treated PBS mice and Ig-treated OVA mice; &: $p<0.05$ between Ig-treated OVA mice and Anti-ASGM1-treated OVA mice; ###: $p<0.01$ and ####: $p<0.001$ between Ig-treated PBS mice and Anti-ASGM1-treated OVA mice.

Discussion

There is growing interest in the links between innate and adaptive immunity in allergic asthma. In this context the information about the role of NK cells, a major component of innate immunity, are very scarce in the pathophysiology of allergic asthma. Hitherto, no study has evaluated the kinetics and migratory behaviour of NK cells in allergic asthma. In our study, we observed that OVA sensitization and challenges increased the number of immature $CD27^{low}CD11b^{low}$ and $CD27^{high}CD11b^{low}$ NK cells in the MLN. Increased number of murine NK cells in draining lymph nodes has been previously shown after immunization or infection [12, 14, 15] but with a different distribution of NK cell subsets. In particular, immunization with lipopolysaccharide-pulsed dendritic cells led to an increase in all NK cell subsets in the draining lymph nodes at 48 hours, with a preferential increase in mature $CD27^{high}CD11b^{high}$ NK cells. After 6 days, immature $CD27^{high}CD11b^{low}$ NK cells were predominant again [15]. The differences between the two studies may be explained in particular by the nature of the stimulus, infectious versus allergic, suggesting that NK cell subsets may be differentially activated by dendritic cells according to the initial stimulus.

NK cell number increase in the MLN may result from recruitment from the inflammatory site (lungs) or from BM through the blood. However, we found that in lungs, only the number of the most mature $CD27^{low}CD11b^{high}$ NK cells decreased, whereas in MLN the increased NK cell number was associated with increased immature NK cell number. Moreover, no increase in NK cell number was observed in BM and blood. These results suggest that NK cells in MLN do not originate from lungs or BM. No significant increase in NKp number in MLN was observed suggesting that increased number of immature NK cells in MLN do not differentiate from NKp in MLN. In contrast, proliferating NK cells were shown to significantly increase in MLN whilst they tend to increase in blood, supporting the hypothesis that OVA sensitization and challenges may induce NK cell proliferation in MLN. The recruitment of proliferating NK cells towards MLN cannot be excluded either.

The role of NK cells in the MLN during airway sensitization shall be further characterized. However, we can presently hypothesize that they may either interact with dendritic cells, as previously showed in other models [12, 14, 23], or directly with T cells [24]. We found that MLN NK cells from OVA mice expressed higher levels of

CD86, molecule involved in the cross-talk between activated NK cells and $CD4^{+}$ T cells [24]. Moreover, MLN of OVA mice exhibited increased number of immature NK cells, previously shown to express several transcripts associated with T cell activation [21].

To address the role of NK cells in asthma, we performed depletion studies with a NK cell-depleting, non NKT cell-depleting antibody. We showed that NK cells were involved in the regulation of lung eosinophilia in OVA-induced airway allergic reaction. Similar results regarding lung eosinophilia were found in C57BL/6 mice treated with anti-NK1.1 antibody [16] altogether suggesting that NK cells do play a major role in this effect. However, AHR was not affected. One explanation is that development of AHR may be dissociated from airway eosinophilia as previously shown in BALB/c mice [25, 26] or linked to the incomplete depletion of NK cells. After IgE activation through Fc γ RIII, NK cells has been shown able to express TNF- α and CCL3 mRNA, two mediators involved allergic asthma [27]. Thus, CCL3 production by NK cells may contribute to eosinophil recruitment in lungs in our model of allergic asthma.

In summary, our results suggest that NK cells may participate to airway eosinophilia in a mouse model of asthma, and regulate the immune response in the mediastinal lymph nodes. A better understanding of NK cell role in mice will provide new insights in the control of human allergic reaction.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM. C. Ple was supported by a grant from Ministère de l'Éducation et de la Recherche. M. Barrier was supported by Région Nord-pas-de Calais. C. Duez was supported by UCB Institute of Allergy and Société Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.

Author statement

CP and MB equally performed the experiments and analyzed the data. LA and PM performed some experiments (tissue harvesting and cell preparations). JB provided expertise for flow cytometry analysis and participated to the data analysis. AT, TW and PL contributed to the design of the study and reviewed the article. CD designed and coordinated the study, performed some experiments and wrote the article with CP.

References

1. Passalacqua G, Ciprandi G. Allergy and the lung. *Clin Exp Immunol* 2008;153 Suppl 1:12-6.
2. Simpson JL, Brooks C, Douwes J. Innate immunity in asthma. *Paediatr Respir Rev* 2008;9(4):263-70.
3. Scordamaglia F, Balsamo M, Scordamaglia A, et al. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121(2):479-85.
4. Timonen T, Stenius-Aarniala B. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol* 1985;59(1):85-90.
5. Wei H, Zhang J, Xiao W, Feng J, Sun R, Tian Z. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(4):841-7.
6. Chiesa S, Tomasello E, Vivier E, Vely F. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol* 2005;42(4):477-84.
7. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 2005;22(3):295-304.
8. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376.
9. Vosshenrich CA, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villeger SI, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 2006;7(11):1217-24.
10. Gregoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 2007;220:169-82.
11. Robinson BW, Pinkston P, Crystal RG. Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent. *J Clin Invest* 1984;74(3):942-50.
12. Bajenoff M, Breart B, Huang AY, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006;203(3):619-31.
13. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 2003;101(8):3052-7.
14. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5(12):1260-5.
15. Watt SV, Andrews DM, Takeda K, Smyth MJ, Hayakawa Y. IFN-gamma-dependent recruitment of mature CD27(high) NK cells to lymph nodes primed by dendritic cells. *J Immunol* 2008;181(8):5323-30.
16. Korsgren M, Persson CG, Sundler F, et al. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 1999;189(3):553-62.
17. Akbari O, Stock P, Meyer E, et al. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2003;9(5):582-8.
18. Lisbonne M, Diem S, de Castro Keller A, et al. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 2003;171(4):1637-41.
19. Hashimoto W, Tanaka F, Robbins PD, et al. Natural killer, but not natural killer T, cells play a necessary role in the promotion of an innate antitumor response induced by IL-18. *Int J Cancer* 2003;103(4):508-13.
20. Biet F, Duez C, Kremer L, et al. Recombinant Mycobacterium bovis BCG producing IL-18 reduces IL-5 production and bronchoalveolar eosinophilia induced by an allergic reaction. *Allergy* 2005;60(8):1065-72.
21. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 2009;113(22):5488-96.
22. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 2006;176(3):1517-24.
23. Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002;195(3):343-51.
24. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 2004;173(6):3716-24.
25. Hogan SP, Matthaei KI, Young JM, Koskinen A, Young IG, Foster PS. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol* 1998;161(3):1501-9.
26. Wilder JA, Collie DD, Wilson BS, Bice DE, Lyons CR, Lipscomb MF. Dissociation of airway hyperresponsiveness from immunoglobulin E and airway eosinophilia in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20(6):1326-34.
27. Arase N, Arase H, Hirano S, Yokosuka T, Sakurai D, Saito T. IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII. *J Immunol* 2003;170(6):3054-8.

2. Perspectives dans le modèle BALB/c

Nous avons montré que, dans un modèle murin d'asthme expérimental chez les souris BALB/cByJ, les cellules NK s'accumulent dans les ganglions médiastinaux et semblent réguler l'éosinophilie pulmonaire. Des travaux supplémentaires permettront une meilleure compréhension des mécanismes d'action des cellules NK.

Ainsi, dans l'article, nous avons montré que les cellules NK des poumons et des ganglions médiastinaux étaient activées (augmentation du pourcentage et/ou de l'expression du CD86). Les cellules NK étant divisées en quatre sous-populations en fonction de l'expression du CD27 et du CD11b (Chiossone L. *et al.*, 2009; Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006), une analyse de l'expression du CD86 au sein de chaque sous-population permettrait de déterminer la ou les sous-populations activées dans notre modèle d'asthme expérimental. Bien qu'aucune modification quantitative des cellules NK n'ait été observée dans les poumons après sensibilisation et provocations à l'OVA, une redistribution tissulaire des cellules NK pourrait avoir lieu. Un marquage des cellules NK (NKp46⁺) chez des souris sensibilisées et provoquées à l'OVA et chez des souris contrôle sera effectué sur des coupes histologiques de poumons.

Nous avons déjà montré que la déplétion des cellules NK au moment des provocations à l'OVA conduit à la diminution de l'éosinophilie du LBA mais n'affecte ni le développement de l'HRB, ni les taux sériques d'Ig spécifiques de l'OVA. Afin de déterminer si la diminution de l'éosinophilie du LBA est liée à un défaut de recrutement des éosinophiles dans les poumons ou à un défaut de migration vers la lumière bronchique, la quantité d'éosinophiles présents dans le tissu pulmonaire sera analysée à l'aide d'une coloration éosine/hématoxyline. Une coloration des coupes histologiques de poumons à l'acide périodique de Schiff (réactif colorant le mucus en rose) permettra d'évaluer l'effet de la déplétion des cellules NK sur la production de mucus, autre caractéristique de la réaction pulmonaire allergique.

Les résultats déjà obtenus suggérant l'implication des cellules NK dans la réaction pulmonaire allergique, nous essayerons d'en déterminer les mécanismes. Les cellules NK pourraient tout d'abord jouer un rôle dans la polarisation lymphocytaire. En effet, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, les interactions entre les cellules NK et les cellules dendritiques au niveau des zones T ont été montrées jouer un rôle crucial dans la polarisation de la réponse immune adaptative, et plus particulièrement dans la mise en place d'une réponse Th1 via la production d'IFN- γ par les cellules NK (Bajenoff M. *et al.*, 2006; Martin-Fontecha A. *et al.*, 2004; Morandi B. *et al.*, 2006). Nous évaluerons donc l'effet de la déplétion des cellules NK sur la polarisation de la réponse immune. Après restimulation *in vitro* avec de l'OVA ou avec la combinaison anti-CD3/CD28 des cellules de ganglions

médiastinaux issues de souris sensibilisées et provoquées à l'OVA déplétées ou non en cellules NK, les cytokines Th2 (IL-5 et IL-4) et Th1 (IFN- γ) seront dosées dans les surnageants de culture. L'analyse de marqueurs de maturation à la surface des cellules dendritiques pulmonaires et ganglionnaires tels que le CD86 et le CD40 chez les souris sensibilisées et provoquées à l'OVA déplétées ou non en cellules NK permettra d'évaluer l'effet des cellules NK sur cette population cellulaire. Les cellules NK pourraient également contribuer à l'inflammation pulmonaire par leur sécrétion de cytokines et chimiokines. L'expression des ARNm et/ou le dosage de cytokines et de chimiokines présentes lors de la réaction pulmonaire allergique pouvant être produites ou non par les cellules NK sera analysé dans les extraits pulmonaires issus de souris sensibilisées et provoquées à l'OVA déplétées ou non en cellules NK. Ces molécules incluront l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IFN- γ , CCL3, CCL5 et CCL11.

3. Analyse des modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK dans un modèle d'asthme expérimental chez les souris C57BL/6

Au vu des résultats précédemment décrits, les cellules NK semblent impliquées dans la réaction pulmonaire allergique, et plus particulièrement dans la régulation de l'éosinophilie pulmonaire. Néanmoins, la déplétion des cellules NK n'étant pas totale (72,6%), l'implication de ces cellules dans ce modèle d'asthme expérimental peut être sous-évaluée.

Nous avons donc choisi de réitérer ces expériences sur des souris NKDTR (Collaboration Pr E Vivier et Dr T Walzer) exprimant le récepteur de la toxine diphtérique dans le promoteur du gène NKp46. Ainsi, l'injection de toxine diphtérique permet une déplétion spécifique et plus efficace (>90%) des cellules NK. Ces souris étant de fond génétique C57BL/6, il a été nécessaire de mettre au point un nouveau modèle de sensibilisation et de provocations à l'OVA. Dans ce modèle, nous avons analysé les variations quantitatives et qualitatives des cellules NK présentes dans les poumons et les ganglions médiastinaux.

Matériels et méthodes

Sensibilisation et provocations allergéniques

Des femelles C57BL/6 âgées de 7 semaines obtenues chez Iffa Credo (L'Arbresle, France) ont été maintenues sous un régime sans OVA. Toutes les procédures ont été approuvées par le comité d'éthique régional. A J0 et J10, les souris ont été sensibilisées par l'injection par voie intrapéritonéale (i.p) de 20 μ g d'OVA (Grade V; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) émulsifiés dans 100 μ l d'hydroxyde d'aluminium (Rehydragel ; Reheis, NY, USA). A J20, J21, J22, J27, J28 et J29, les souris ont été anesthésiées (5 ml/kg d'une solution de métédomidine (Pfizer) 12% et kétamine (Merial) 10%) puis ont reçu par voie intranasale 100 μ g d'OVA dilués dans du PBS. Ces souris seront par la suite

appelées souris OVA. Les souris contrôle, appelées par la suite souris PBS, ont reçu des injections i.p de PBS émulsifié dans 100 µl d'hydroxyde d'aluminium et ont reçu du PBS par voie intranasale.

Mesure de la résistance pulmonaire

La résistance pulmonaire a été mesurée à l'aide du Flexivent® (Scireq®, Montreal, Canada) comme précédemment décrit (page 172). Les souris ont été exposées à du PBS suivi de doses croissantes de métacholine (3-50 mg/ml dilué dans du PBS) (Sigma-Aldrich) à l'aide d'un nébuliseur ultrasonique (Aeroneb, Aerogen, Galway, Ireland).

Composition cellulaire du lavage bronchoalvéolaire

48, 72 et 96 heures après la dernière provocation à l'OVA et immédiatement après la mesure de la résistance pulmonaire, la composition cellulaire a été analysée comme précédemment décrit (page 173).

Préparation des suspensions cellulaires des poumons et des ganglions médiastinaux

Les organes ont été prélevés avant les premières provocations allergéniques (T0) ou à différents temps après la dernière provocation allergénique.

Les poumons ont été perfusés avec du PBS contenant 0,5 mM d'EDTA, prélevés et dilacérés. Après une heure d'incubation à 37°C dans une solution de RPMI complet (Lonza, Basel, Suisse) (RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 100 IU/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine, 1% de Ticarpen, 2mM L-glutamine) contenant de la collagénase de type IV (0,5 mg/ml; Serlabo, Paris, France) et de la DNase I (2 UI/ml; Roche Diagnostics, Meylan, France), les poumons digérés ont été passés au travers d'une seringue 20G 1½ (Terumo, Guyancourt, France) et les globules rouges ont été lysés à l'aide d'une solution contenant 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ et 0,5 mM EDTA diluée dans de l'eau stérile pendant 15 minutes sur glace. Les culots cellulaires ont été repris dans du Percoll 33% (Amersham GE Healthcare, UK) puis centrifugés à température ambiante à 2300g pendant 20 minutes. Les cellules ont été resuspendues dans du PBS, filtrées sur du nylon (100 µm) (Saati France, Saily Saillisel, France) puis comptées.

Les ganglions médiastinaux (MLN) ont été homogénéisés à l'aide d'un Potter, filtrés sur nylon (100 µm) puis les cellules ont été comptées.

Analyse en cytométrie en flux

Les cellules isolées des poumons et des MLN ont été reprises à une concentration de 1x10⁷ cellules/ml dans du PBS contenant 2% de SVF. 10⁶ cellules ont été incubées avec un anti-CD16/CD32

murin (2.5 µg/ml ; eBiosciences, Montrouge, France) pendant 10 minutes sur glace. Après lavages, les marquages membranaires et intracellulaires (30 minutes sur glace) ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le NKp46, le CD27, le CD11a, le CD11b, le CD69, le CD107a, le CD117, le CD127, le Granzyme B, l'IL-4 et l'IFN-γ ou les isotypes contrôle couplés aux fluorochromes FITC, PE ou AF647 (eBiosciences, Montrouge, France) suivant les recommandations du fournisseur. Après lavages, les cellules marquées ont été immédiatement analysées par cytométrie en flux (FACScalibur®, Becton Dickinson).

Analyses statistiques

Toutes les valeurs ont été exprimées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (sem). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant GraphPad Prism 4 software. Les comparaisons ont été effectuées par le test non paramétrique Mann Whitney. Pour certaines mesures, les valeurs ont été comparées en utilisant le two way anova. Lorsque des différences significatives étaient observées, un test de Bonferroni était alors effectué. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0,05$.

Résultats

Cinétique de la réaction pulmonaire allergique chez les souris C57BL/6

La résistance pulmonaire et la composition du lavage bronchoalvéolaire ont été analysées 48, 72 et 96 heures après la dernière provocation à l'OVA.

Les souris OVA présentaient une augmentation significative de la résistance pulmonaire 48, 72 et 96 heures après la dernière provocation à l'OVA (respectivement: $344,7 \pm 65,7$ pour la dose de 25 mg/ml de métacholine, $771,8 \pm 302,7$ et $821,9 \pm 181,0$ pour la dose de 50 mg/ml de métacholine) comparativement aux souris PBS (respectivement: $191,9 \pm 49,4$ pour la dose de 25 mg/ml de métacholine, $233,0 \pm 40,4$ et $282,7 \pm 54,9$ pour la dose de 50 mg/ml de métacholine). L'augmentation la plus significative était observée à 96 heures (Figure 1).

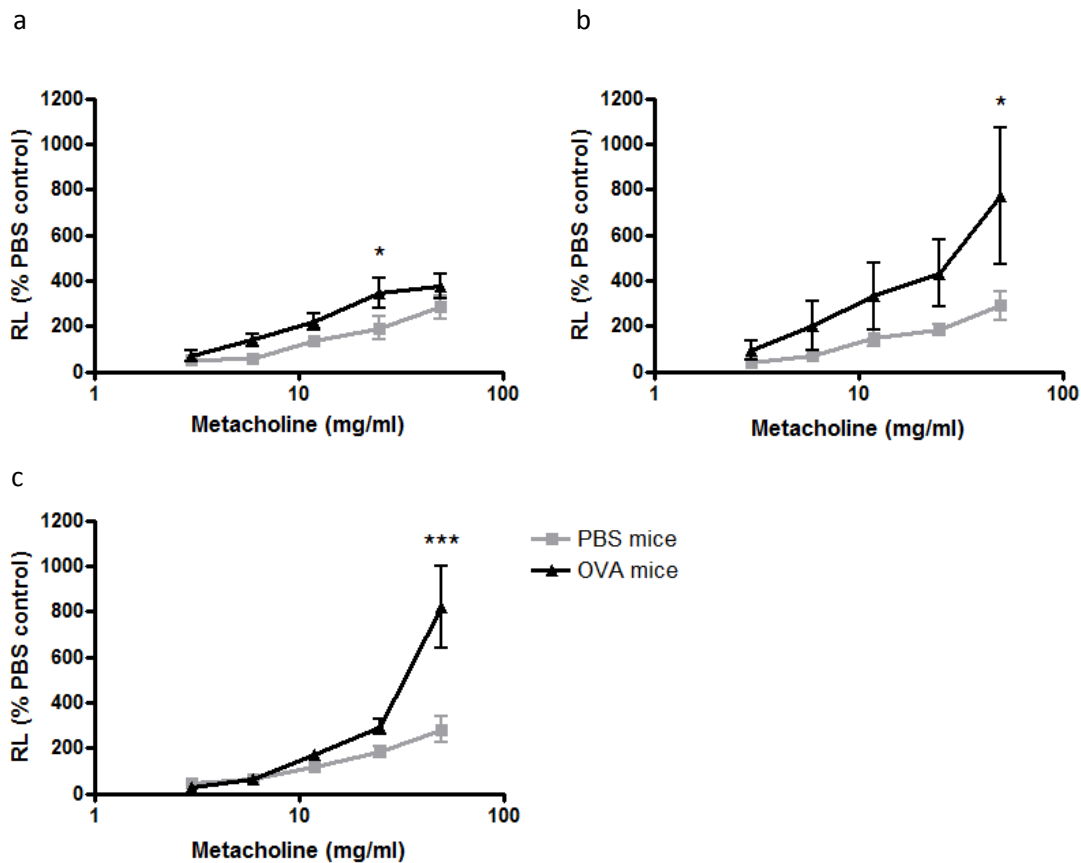


Figure 1: Mesure de la résistance pulmonaire lors de la réaction pulmonaire allergique.

La résistance pulmonaire (RL) a été mesurée après nébulisation de doses croissantes de métacholine chez les souris PBS (carré; n=5 à 7) et chez les souris OVA (triangle; n=5 à 6) 48 heures (a), 72 heures (b) et 96 heures (c) après la dernière provocation. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'augmentation de la résistance maximale par rapport à la résistance maximale induite par le PBS \pm sem. * : $p < 0,05$ et *** : $p < 0,001$ entre les souris PBS et les souris OVA.

Au niveau de la composition cellulaire du LBA, la sensibilisation et les provocations à l'OVA ont conduit à une augmentation significative du nombre de cellules totales, d'éosinophiles et de lymphocytes dans le LBA, et ce quelque soit le temps d'analyse. En revanche, le nombre de macrophage était significativement augmenté uniquement 48 et 96 heures après la dernière provocation à l'OVA. Chez les souris OVA, le nombre d'éosinophiles ne différait pas en fonction du temps d'analyse (Figure 2).

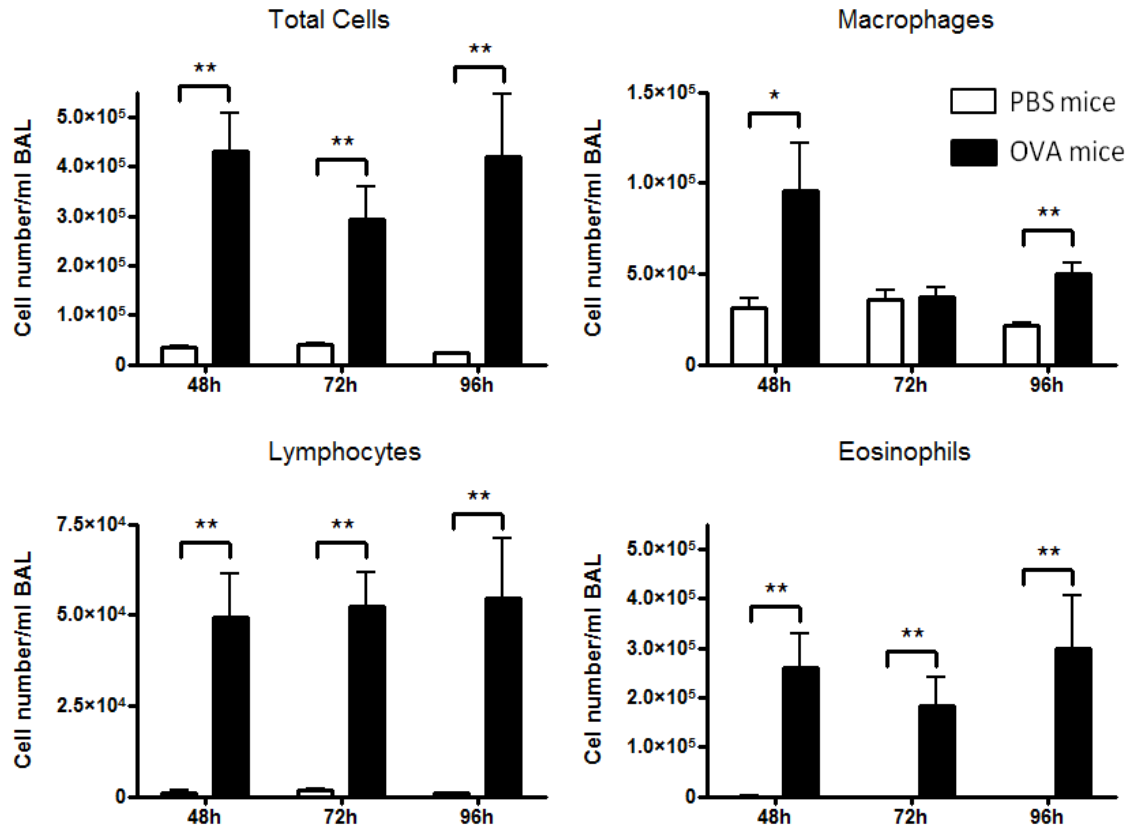


Figure 2: Composition cellulaire du LBA lors de la réaction pulmonaire allergique

Le nombre de cellules totales du LBA a été compté chez les souris PBS (barre blanche ; n=5 à 7) et les souris OVA (barre noire ; n=5 à 6). Après coloration au May Grünwald Giemsa, les macrophages, les lymphocytes et les éosinophiles des souris de chaque groupe ont été microscopiquement identifiés puis comptés. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de cellules \pm sem. * : $p < 0,05$ et *** : $p < 0,001$ entre les souris PBS et les souris OVA.

Diminution du pourcentage et du nombre de cellules NK dans les poumons 96 heures après la dernière provocation à l'OVA

La variation du nombre de cellules NK a été étudiée dans les poumons et les MLN durant l'inflammation pulmonaire allergique induite par l'OVA.

Dans les poumons, la sensibilisation et les provocations à l'OVA ont induit une diminution significative du pourcentage et du nombre de cellules NK 96 heures après la dernière provocation à l'OVA (pourcentage: $5,0 \pm 0,9\%$ chez les souris OVA et $11,5 \pm 1,2\%$ chez les souris PBS ; nombre: $1,2 \pm 0,2 \times 10^6$ chez les souris OVA et $2,2 \pm 0,3 \times 10^6$ chez les souris PBS) (Figures 3a-a'). Ce temps correspondait à l'augmentation maximum de la résistance pulmonaire (Figure 1).

Dans les ganglions médiastinaux, la sensibilisation et les provocations à l'OVA n'induisent aucune modification significative du pourcentage et du nombre de cellules NK, et ce à n'importe quel temps de l'analyse (Figures 3b-b').

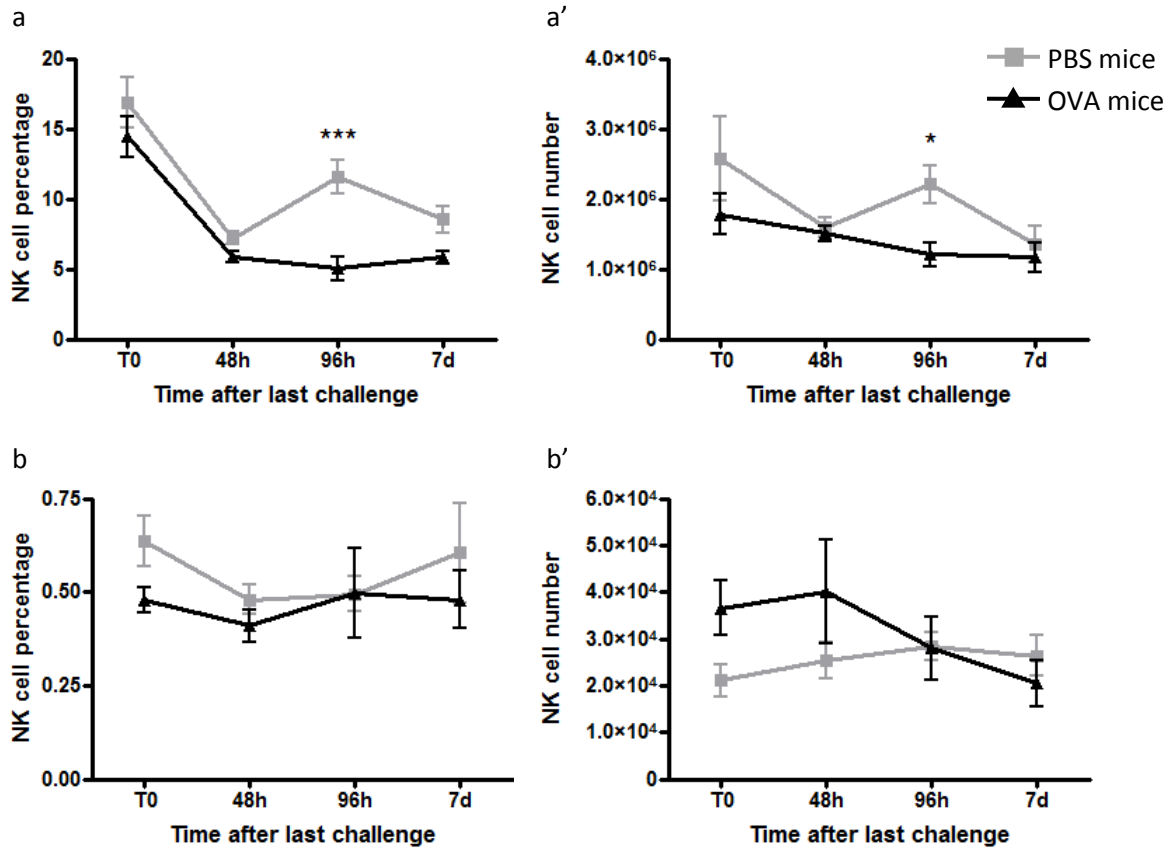


Figure 3: Effet de la sensibilisation et des provocations à l'OVA sur le pourcentage et le nombre de cellules NK des poumons et des MLN.

Les cellules NK des suspensions cellulaires obtenues à partir des poumons (a et a') et des MLN (b et b') des souris PBS (carré gris ; n=5-6) et des souris OVA (triangle noir ; n=6-7) ont été marquées à l'aide de l'anti-NKp46. Le pourcentage (a et b) et le nombre de cellules (a' et b') NK ont été analysés par cytométrie en flux avant la première provocation (T0) et 48h, 96h et 7j après la dernière provocation. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules NK \pm sem ou en nombre moyen de cellules NK \pm sem. *: $p < 0,05$ et ***: $p < 0,001$ entre les souris PBS et les souris OVA.

Diminution du pourcentage de cellules NK les plus matures CD11b^{high}CD27^{low} dans les poumons 96 heures après la dernière provocation à l'OVA

Le pourcentage et le nombre de cellules NK étant diminués dans les poumons des souris OVA 96 heures après la dernière provocation à l'OVA, temps correspondant également à l'augmentation maximale de la résistance pulmonaire, la distribution des différentes sous-populations de cellules NK a été étudiée à ce temps. La sensibilisation et les provocations à l'OVA ont induit une diminution

significative du pourcentage de cellules NK les plus matures $CD11b^{high}CD27^{low}$ ($82,6\pm 1,3\%$ chez les souris OVA et $87,7\pm 2,4\%$ chez les souris PBS) et une augmentation des cellules NK immatures $CD11b^{low}CD27^{low}$ ($2,2\pm 0,4\%$ chez les souris PBS et $4,3\pm 0,5\%$ chez les souris OVA) et $CD11b^{low}CD27^{high}$ ($5,9\pm 1,0\%$ chez les souris PBS et $9,9\pm 0,6\%$ chez les souris OVA) (Figure 4a). Le nombre de cellules NK parmi les différentes sous-populations tendait à varier de la même façon (Figure 4b).

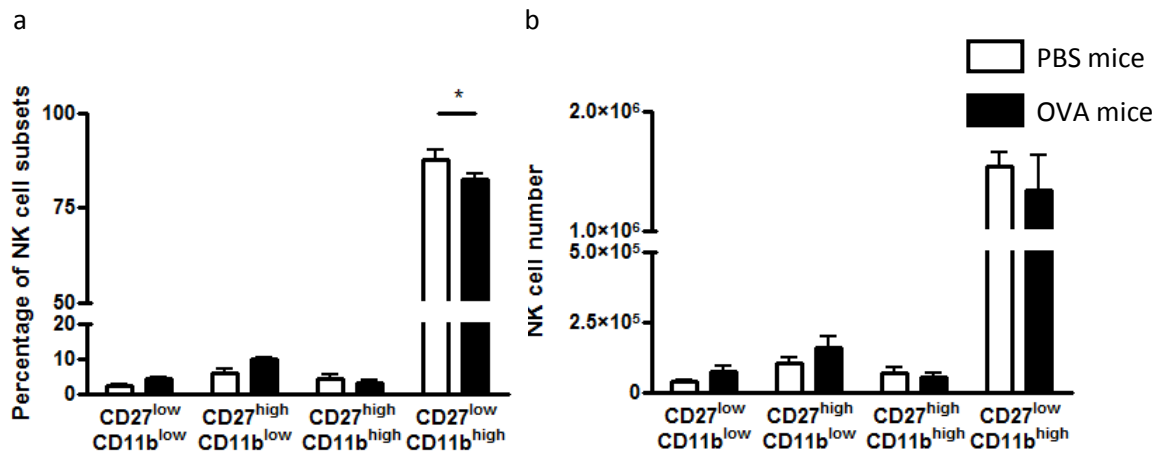


Figure 4: Effet de la sensibilisation et des provocations à l'OVA sur la distribution des sous-populations de cellules NK dans les poumons 96 heures après la dernière provocation à l'OVA.

La suspension cellulaire obtenue à partir des poumons a été marquée à l'aide d'un anti-NKp46. La distribution des sous-populations de cellules NK a été étudiée en fonction des niveaux d'expression de CD27 et du CD11b à l'intérieur de la gate $NKp46^{+}$. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen \pm sem (a) ou en nombre moyen \pm sem (b). *: $p < 0,05$ entre les souris PBS et les souris OVA.

La distribution des sous-populations de cellules NK a été également étudiée dans les MLN. La sensibilisation et les provocations à l'OVA n'ont pas affecté la distribution des sous-populations de cellules NK tant au niveau du pourcentage que du nombre (Figure 5).

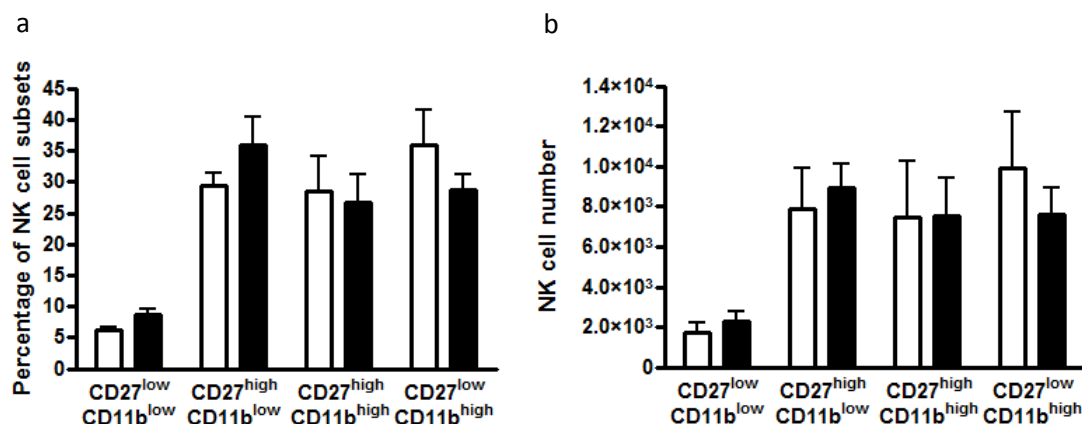


Figure 5: Effet de la sensibilisation et des provocations à l'OVA sur la distribution des sous-populations de cellules NK dans les MLN.

La suspension cellulaire obtenue à partir des MLN a été marquée à l'aide d'un anti-NKp46. La distribution des sous-populations de cellules NK a été étudiée en fonction des niveaux d'expression de CD27 et du CD11b à l'intérieur de la gate NKp46⁺. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen \pm sem (a) ou en nombre moyen \pm sem (b).

Modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK pulmonaires et ganglionnaires 96 heures après la dernière provocation à l'OVA

L'expression de certains récepteurs de cytokines permettant la caractérisation de certaines sous-populations (CD117 et CD127) ou l'expression de marqueurs d'activation (CD69 et CD86), du marqueur de dégranulation CD107a et de la molécule d'adhérence CD11a a été analysée à la surface des cellules NK pulmonaires et ganglionnaires. L'expression intracellulaire de l'IFN- γ , de l'IL-4 et du granzyme B a également été étudiée.

Dans les poumons, la sensibilisation et les provocations à l'OVA ont induit une augmentation significative de l'expression membranaire du CD127 (Δ MFI=1,4 \pm 0,4 chez les souris OVA et Δ MFI=0,5 \pm 0,1 chez les souris PBS), alors que le pourcentage de cellules NK exprimant ce marqueur tendait uniquement à l'augmentation (11,4 \pm 3,4% chez les souris OVA et 6,6 \pm 1,6% chez les souris PBS) (Figures 4a-a'). Le pourcentage de cellules exprimant le CD117 était augmenté chez les souris OVA (15,6 \pm 2,2%) comparativement aux souris PBS (11,8 \pm 0,9%), alors que son niveau d'expression n'était pas modifié (Δ MFI=2,6 \pm 0,7 chez les souris OVA et Δ MFI=1,9 \pm 0,7 chez les souris PBS) (Figures 4b-b'). La sensibilisation et les provocations à l'OVA ont également conduit à l'augmentation de l'expression du CD86 à la surface des cellules NK (Δ MFI=3,3 \pm 0,2 chez les souris OVA et Δ MFI=2,8 \pm 0,1 chez les souris PBS) sans pour autant modifier le pourcentage de cellules NK exprimant ce marqueur (42,4 \pm 5,9% chez les souris OVA et 39,6 \pm 6,8% chez les souris PBS (Figures 4c-c'). Une augmentation du

pourcentage de cellules NK exprimant le CD107a a aussi été observée chez les souris OVA ($8,6\pm 3,5\%$) comparativement aux souris PBS ($3,2\pm 1,0\%$) (Figures d-d'), traduisant leur dégranulation. Cette dernière coïncidait avec la diminution du pourcentage de cellules NK exprimant le granzyme B ($80,6\pm 4,0\%$ chez les souris OVA et $90,0\pm 2,2\%$ chez les souris PBS) (Figures 4e-e'). Le pourcentage de cellules NK exprimant l'IFN- γ était également diminué chez les souris OVA ($37,6\pm 3,1\%$) comparativement aux souris PBS ($48,5\pm 5,4\%$) (Figures 4f-f'). Concernant les autres marqueurs (CD11a, CD69 et IL-4), aucune modification n'a été observée entre les souris PBS et OVA (données non montrées).

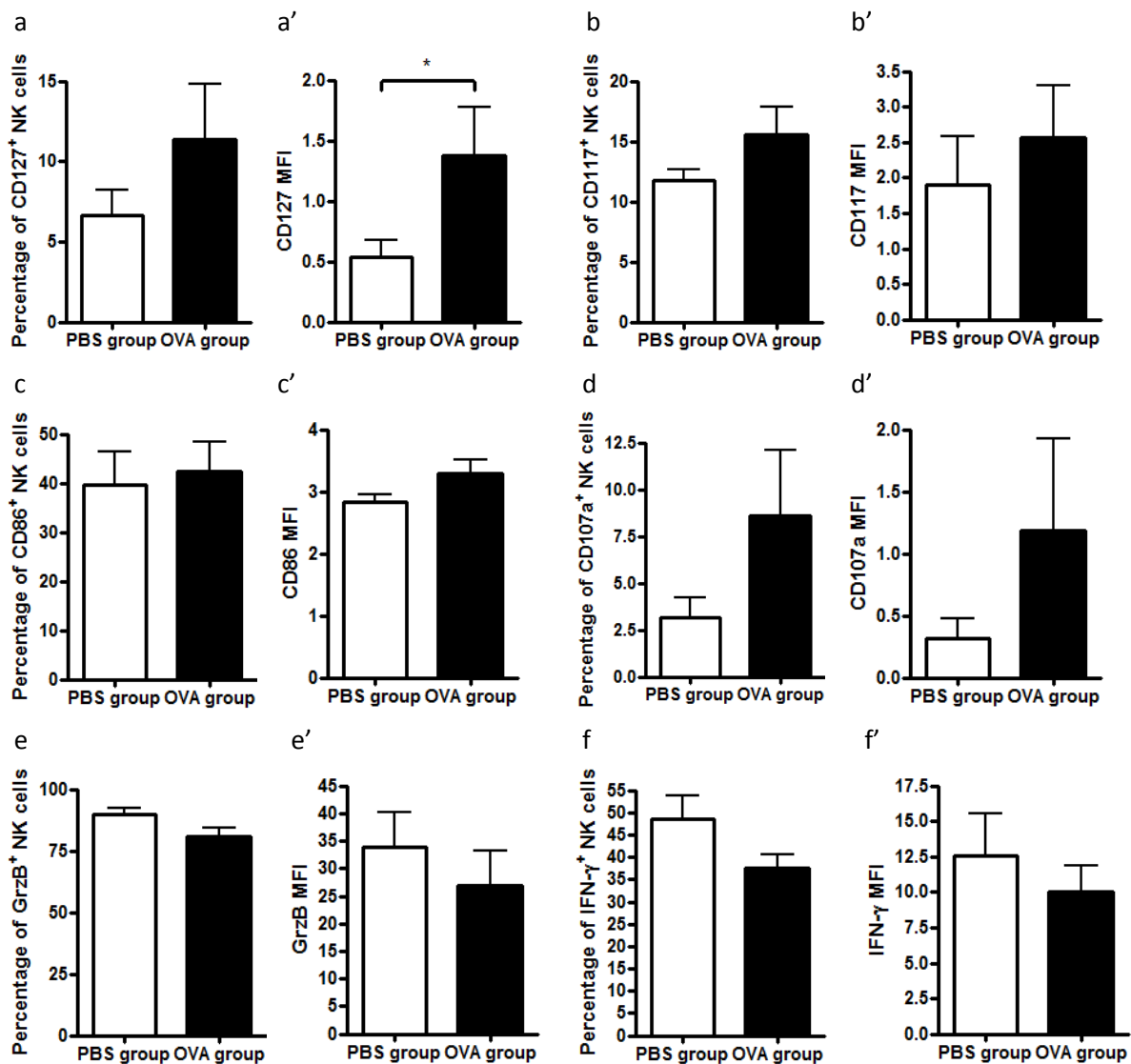


Figure 4: Modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK pulmonaires 96 heures après la dernière provocation à l'OVA.

A partir de la suspension cellulaire obtenue des poumons, l'expression du CD127 (a-a'), CD117 (b-b'), CD86 (c-c'), CD107a (d-d'), Granzyme B (e-e') et IFN- γ (f-f') a été analysée à l'intérieur de la gate Nkp46 $^{+}$. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules NK exprimant le marqueur d'intérêt \pm sem (a-f) et en Δ MFI (MFI de l'anticorps d'intérêt-MFI de l'anticorps contrôle) \pm sem (a'-f'). *: $p < 0,05$ entre les souris PBS et les souris OVA.

Dans les MLN, les niveaux d'expression des CD86 et CD69 étaient augmentés chez les souris OVA (respectivement: $\Delta\text{MFI}=15,1\pm 1,6$ et $\Delta\text{MFI}=5,8\pm 0,7$) comparativement aux souris PBS (respectivement: $\Delta\text{MFI}=10,5\pm 1,8$ et $\Delta\text{MFI}=3,7\pm 0,9$) (Figures 5a' et b'), signe de leur activation. Le pourcentage de cellules NK exprimant le CD69 était aussi augmenté chez les souris OVA ($35,5\pm 2,5\%$) comparativement aux souris PBS ($27,6\pm 3,1\%$), alors que celui du CD86 n'était pas modifié ($62,9\pm 4,3\%$ chez les souris OVA et $58,0\pm 6,0\%$ chez les souris PBS) (Figures 5a et 5b). La sensibilisation et les provocations à l'OVA ont aussi induit une augmentation significative du pourcentage de cellules exprimant le CD107a ($25,7\pm 2,6\%$ chez les souris OVA et $15,2\pm 3,1\%$ chez les souris PBS) et de son niveau d'expression ($\Delta\text{MFI}=6,6\pm 0,9$ chez les souris OVA et $\Delta\text{MFI}=3,0\pm 0,7$) (Figures 5c-c'), signe d'une dégranulation des cellules NK. Concernant les autres marqueurs (CD127, CD117, CD11a, Granzyme B, IFN- γ et IL-4), aucune modification n'a été observée (données non montrées).

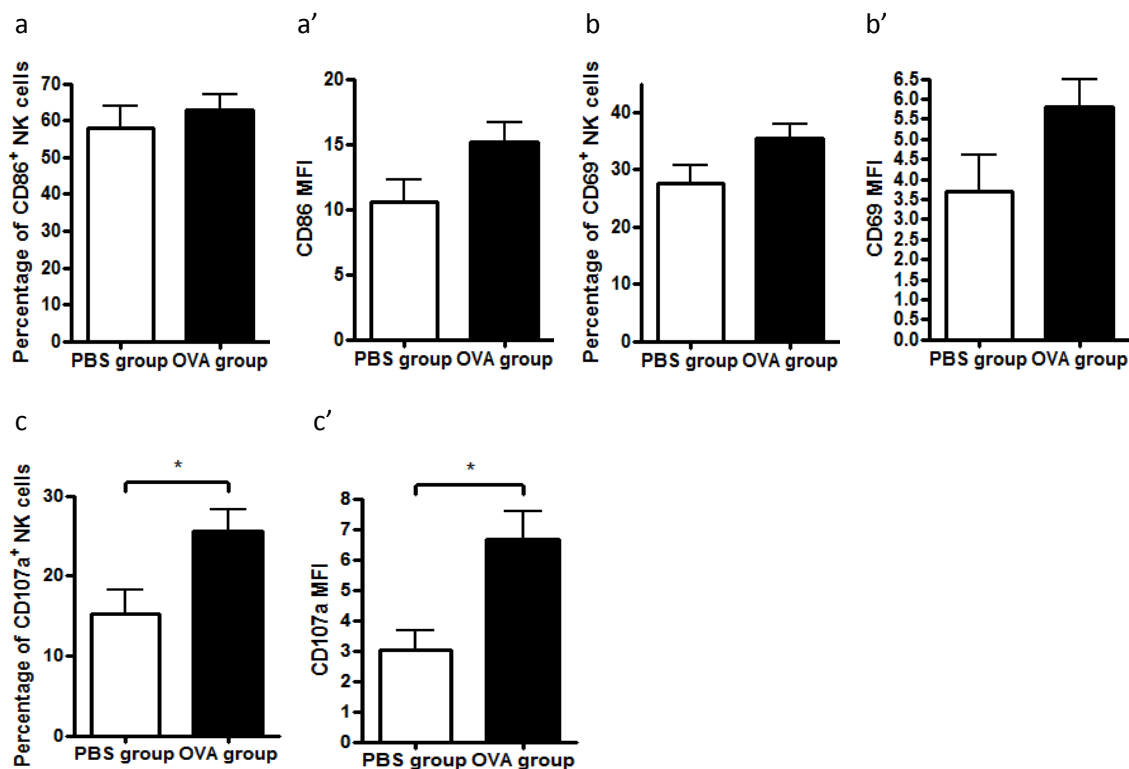


Figure 5: Modifications phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK des MLN 96 heures après la dernière provocation à l'OVA.

A partir de la suspension cellulaire obtenue des MLN, l'expression du CD86 (a-a'), CD69 (b-b') et CD107a (c-c') a été analysée à l'intérieur de la gate NKp46⁺. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules NK exprimant le marqueur d'intérêt \pm sem (a-c) et en ΔMFI (MFI de l'anticorps d'intérêt-MFI de l'anticorps contrôle) \pm sem (a'-c'). *: p<0,05

Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que la sensibilisation et les provocations à l'OVA induisaient une diminution significative du pourcentage et du nombre de cellules NK totales dans les poumons. Cette dernière pourrait être attribuée à la diminution significative du pourcentage des cellules NK les plus matures ($CD27^{low}CD11b^{high}$), sous-population majoritaire dans les poumons. L'augmentation du pourcentage des cellules NK les plus immatures ($CD27^{low}CD11b^{low}$) et des cellules NK immatures ($CD27^{high}CD11b^{low}$), deux sous-populations minoritaires, ne compenserait donc pas la perte des cellules NK les plus matures. La distribution pulmonaire des sous-populations de cellules NK diffèrent légèrement de celles obtenues dans deux autres études réalisées chez les souris C57BL/6 naïves (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006; Walzer T. *et al.*, 2007). Dans ces deux études, le pourcentage de cellules NK matures ($CD27^{high}CD11b^{high}$) était supérieur à celui des cellules NK immatures ($CD27^{low}CD11b^{low}$), alors que dans notre étude les deux pourcentages étaient quasi-similaires ($CD27^{high}CD11b^{high}$: $4,2\pm 1,3\%$ et $CD27^{low}CD11b^{low}$: $5,9\pm 1,2\%$). Cette divergence pourrait s'expliquer par le fait que, dans notre modèle, nos souris contrôle (souris PBS) ne sont pas naïves puisqu'elles ont reçu de l'alum. De plus, nous avons observé une différence de distribution de ces sous-populations de cellules NK entre les souris C57BL/6 et les souris BALB/c. Ainsi, chez les souris BALB/c, la sous-population majoritaire chez les souris PBS est toujours constituée par les cellules NK les plus matures ($CD27^{low}CD11b^{high}$) mais représente une plus faible proportion des cellules NK totales ($64,5\pm 3,1\%$ chez les souris BALB/c contre $87,7\pm 2,4\%$ chez les souris C57BL/6). Chez les souris BALB/c, les cellules NK les plus immatures ($CD27^{low}CD11b^{low}$) représentent une très forte proportion des cellules NK totales, ce qui diffère des souris C57BL/6 ($22,2\pm 2,8\%$ chez les souris BALB/c contre $2,2\pm 0,4\%$ chez les souris C57BL/6). Chez les souris BALB/c, le pourcentage de cellules NK matures ($CD27^{high}CD11b^{high}$) est supérieur à celui des cellules NK immatures ($CD27^{low}CD11b^{low}$) (respectivement: $9,0\pm 0,7\%$ et $3,6\pm 0,3\%$), alors que l'inverse est observé chez les souris C57BL/6 ($4,1\pm 1,3\%$ et $5,9\pm 1,0\%$).

Outre la modification de la distribution pulmonaire des sous-populations de cellules NK chez les souris OVA, des modifications phénotypiques et fonctionnelles ont été observées. Tout d'abord, la sensibilisation et les provocations à l'OVA ont conduit à l'augmentation du pourcentage de cellules NK exprimant le CD127 et le CD117. Ces deux marqueurs ont été retrouvés exprimés sur des cellules NK exprimant le récepteur nucléaire ROR γ t et produisant de l'IL22 dans la lamina propria et les cryptopatches de la muqueuse intestinale (Sanos S.L. *et al.*, 2009). Ainsi, dans notre modèle d'asthme expérimental, une augmentation de cellules NK produisant de l'IL-22 pourrait être envisagée. Le rôle de l'IL-22 dans l'asthme allergique est encore inconnu. Dans un modèle murin d'infection à *Klebsiella pneumoniae*, l'IL-22 a été montrée comme indispensable pour la survie des souris. Elle agit directement sur les cellules épithéliales bronchiques en augmentant leur libération de peptides anti-

microbiens et en initiant la réparation de l'épithélium. L'IL-22 est également indispensable pour la production d'IL-6 et de CCL3 (Aujla S.J. *et al.*, 2008). Ainsi, dans l'asthme allergique, l'IL-22 pourrait avoir une fonction double puisqu'elle serait capable à la fois de protéger l'épithélium bronchique contre les dommages tissulaires et de participer au recrutement de cellules inflammatoires telles que les éosinophiles et les mastocytes (expression des récepteurs au CCL3) et au remodelage bronchique (IL-6). L'augmentation du pourcentage de cellules NK exprimant le CD127 dans notre modèle d'asthme expérimental pourrait également s'expliquer par l'augmentation des sous-populations de cellules NK immatures $CD27^{low}CD11b^{low}$ et $CD27^{high}CD11b^{low}$. En effet, parmi les cellules NK matures, le CD127 a été montré quasi-exclusivement exprimé par les sous-populations «immatures» $CD27^{low}CD11b^{low}$ (50%) et $CD27^{high}CD11b^{low}$ (32%) (Chiossone L. *et al.*, 2009). Concernant l'augmentation du pourcentage de cellules NK exprimant le CD117, celle-ci pourrait être attribuée à une augmentation de la sous-population de cellules NK $CD94^{high}$, population comprenant davantage de cellules NK exprimant le CD117. Comparativement aux cellules NK $CD94^{low}$, les cellules NK $CD94^{high}$ ont été montrées posséder de plus fortes capacités prolifératives et cytotoxiques et produire davantage d'IFN- γ (Yu J. *et al.*, 2009).

La sensibilisation et les provocations à l'OVA ont conduit à l'augmentation de l'expression du CD86, traduisant l'activation des cellules NK. Cette dernière est au moins en partie observable par la dégranulation des cellules NK qui est traduite par l'augmentation du nombre de cellules NK exprimant le CD107a à leur surface. Celle-ci était accompagnée d'une diminution du pourcentage de cellules NK exprimant le granzyme B, alors que le niveau d'expression ne tendait qu'à une très légère diminution ($\Delta MFI=33,9\pm 6,4$ chez les souris PBS et $\Delta MFI=26,9\pm 3,1$ chez les souris OVA). Ce résultat est également en faveur d'une dégranulation des cellules NK même si la diminution d'expression n'est que légère. Il a été montré que le pourcentage de cellules NK exprimant le granzyme B ainsi que son niveau d'expression ne sont pas modifiés entre les cellules NK $CD107a^+$ (cellules NK ayant dégranulé) et les cellules NK $CD107a^-$ (cellules NK n'ayant pas dégranulé). De plus, les cellules NK $CD107a^+$ sont capables de dégranuler une nouvelle fois, et ce de façon similaire à la première fois (Tomescu C. *et al.*, 2009).

Dans notre modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique, la diminution du pourcentage de cellules NK exprimant le granzyme B et l'IFN- γ pourrait être due à une modification de la distribution des cellules «NK1» et «NK2», et plus précisément à une augmentation du pourcentage de cellules «NK2» et à une diminution du pourcentage de cellules «NK1». Alors que les cellules NK1 obtenues *in vitro* produisent notamment de l'IFN- γ et sont davantage cytotoxiques, les cellules NK2 obtenues *in vitro* produisent de l'IL-5 et de l'IL-13 et sont moins cytotoxiques. L'analyse de l'expression de l'ARNm

du granzyme B par RT-PCR semi-quantitative n'a montré aucune différence d'expression entre les cellules NK1 et NK2 (Katsumoto T. *et al.*, 2004). Toutefois, une différence d'expression de la protéine ne peut être exclue puisque l'expression de l'ARNm n'est pas toujours le reflet de l'expression protéique. Cette dichotomie est tout de même à prendre avec précaution puisqu'elle n'a jamais été retrouvée *in vivo* chez la souris et qu'elle n'a été décrite que dans une seule étude datant de 2004. Néanmoins, une redistribution des cellules NK1 et NK2 humaines a déjà été décrite dans le sang périphérique de sujets astmatiques allergiques (Wei H. *et al.*, 2005).

Dans les MLN, contrairement à ce qui avait été observé chez les souris BALB/c, la sensibilisation et les provocations à l'OVA n'ont induit aucune modification de la distribution des sous-populations de cellules NK. La distribution des sous-populations de cellules NK dans notre étude est en accord avec celle obtenue dans l'étude de Walzer et ses collaborateurs (Walzer T. *et al.*, 2007), mais diverge de celle obtenue par Hayakawa et Smyth (Hayakawa Y. and Smyth M.J., 2006). Similairement aux poumons, la distribution des sous-populations diffère entre les souris C57BL/6 et les souris BALB/c. Alors que les cellules NK les plus immatures ($CD27^{low}CD11b^{low}$) représentent la sous-population minoritaire chez les souris C57BL/6 ($6,3\pm 0,4\%$), cette dernière représente une sous-population majoritaire chez les souris BALB/c ($34,6\pm 2,1\%$). Les pourcentages de cellules NK matures ($CD27^{high}CD11b^{high}$) et de cellules NK les plus matures ($CD27^{low}CD11b^{high}$) sont inférieurs chez les souris BALB/c comparativement aux souris C57BL/6 ($CD27^{high}CD11b^{high}$: $21,1\pm 2,1\%$ chez les souris BALB/c et $28,5\pm 5,7\%$ chez les souris C57BL/6) ; $CD27^{low}CD11b^{high}$: $13,0\pm 3,4\%$ chez les souris BALB/c et $35,9\pm 5,7\%$ chez les souris C57BL/6). La proportion de cellules NK immatures ($CD27^{high}CD11b^{low}$) est comparable entre les souris BALB/c et les souris C57BL/6 (respectivement: $31,3\pm 2,3\%$ chez les souris BALB/c et $29,4\pm 1,9\%$ chez les souris C57BL/6).

En dépit de l'absence de modification de la distribution des sous-populations de cellules NK définies par l'expression du CD27 et CD11b dans les MLN, des modifications phénotypiques et fonctionnelles ont été observées. La sensibilisation et les provocations à l'OVA ont conduit à l'activation des cellules NK. Cette dernière était accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules NK exprimant le CD107a à la surface, témoin de la dégranulation des cellules NK.

En résumé, ces résultats montrent des modifications tant au niveau phénotypique que fonctionnel du compartiment de cellules NK chez les souris sensibilisées et provoquées à l'OVA, suggérant leur implication dans la réaction pulmonaire allergique. L'étude de l'effet de la déplétion des cellules NK dans ce modèle d'asthme expérimental permettra de déterminer leur contribution dans cette pathologie.

4. Perspectives dans le modèle C57BL/6

L'effet de la déplétion des cellules NK chez les souris NKDTR par l'injection de toxine diphtérique sera étudié dans notre modèle d'asthme expérimental chez les souris C57BL/6. La déplétion des cellules NK pourra être réalisée avant la sensibilisation et/ou au moment des provocations à l'OVA et les différents paramètres de la réaction pulmonaire allergique seront analysés. Ces derniers incluent la mesure de la résistance pulmonaire, le dosage des taux sériques d'Ig spécifiques de l'OVA, la composition cellulaire du LBA, l'analyse des infiltrats pulmonaires et de la production de mucus et le dosage de cytokines et chimiokines Th1 ou Th2 dans les extraits pulmonaires. Afin d'évaluer l'impact des cellules NK sur la polarisation lymphocytaire, les cellules ganglionnaires seront restimulées *in vitro* par la combinaison anti-CD3/CD28 ou par l'OVA. L'effet de la déplétion des cellules NK sur les cellules dendritiques sera également étudié via l'analyse de l'expression de certains marqueurs de maturation tels que le CD86 et le CD40.

Si la déplétion des cellules NK montre que ces cellules contribuent à la réaction pulmonaire allergique, nous essayerons de déterminer plus précisément leur modalité d'action. Les cellules NK sont capables de produire des cytokines Th1 (IFN- γ) et Th2 (IL-5 et IL-13). Comme nous l'avons abordé dans la discussion, une redistribution des cellules «NK1» et «NK2» pourrait avoir lieu dans notre modèle d'asthme expérimental. L'analyse de l'expression intracellulaire de l'IFN- γ , l'IL-5 et l'IL-13 par les cellules NK permettra de mettre en évidence une redistribution des cellules «NK1» et «NK2» lors d'un asthme expérimental. De plus, la reconstitution de souris déficientes en cellules NK (souris NKDTR) avec des cellules NK isolées de souris déficientes en IFN- γ , IL-5 ou IL-13 avant la sensibilisation et/ou au moment des provocations à l'OVA permettra d'évaluer le rôle de ces cytokines produites par les cellules NK aux différentes phases de la réaction allergique. Dans nos résultats préliminaires, nous avons également observé une augmentation des pourcentages de cellules NK exprimant le CD127 et le CD117. Dans la muqueuse intestinale, certaines cellules NK notamment CD127⁺CD117⁺ expriment le récepteur nucléaire ROR γ t et produisent de l'IL-22 (Sanos S.L. *et al.*, 2009). L'analyse de l'expression intracellulaire de ROR γ t et/ou de l'IL-22 permettra de mettre en évidence la présence éventuelle de cette population dans les poumons en conditions basale et allergique. Si des modifications sont observées, le phénotype des cellules NK produisant l'IL-22 sera caractérisé et le rôle de l'IL-22 produite par les cellules NK sera analysé. La reconstitution de souris déficientes en cellules NK (souris NKDTR) avec des cellules NK isolées de souris déficientes en IL-22 avant la sensibilisation et/ou au moment des provocations à l'OVA permettra d'évaluer le rôle de l'IL-22 produite par les cellules NK aux différentes phases de la réaction allergique.

CONCLUSION GENERALE DE CETTE PREMIERE PARTIE

L'ensemble des résultats obtenus lors de ma thèse renforcent notre hypothèse selon laquelle les cellules NK contribuent à la réaction pulmonaire allergique que ce soit chez les souris BALB/c ou les souris C57BL/6. Les modifications quantitatives des cellules NK ainsi que la distribution des sous-populations en fonction du niveau d'expression de CD27 et du CD11b divergent en fonction de la lignée de souris utilisée, suggérant que la contribution des cellules NK dans la réaction pulmonaire allergique pourraient être différente dans nos deux modèles d'asthme expérimental. L'effet de la déplétion des cellules NK ainsi que les autres expériences envisagées permettront une meilleure compréhension du rôle des cellules NK dans la réaction pulmonaire allergique.

DEUXIEME PARTIE

EFFET DE CCL18 SUR LES CELLULES NK DE SUJETS ALLERGIQUES ET DE SUJETS NON ALLERGIQUES

Nous avons évalué l'effet de CCL18, chimiokine préférentiellement pulmonaire, sur la migration et la fonction des cellules NK. Le rôle de CCL18 a été comparé sur des cellules NK de sujets allergiques ou non allergiques.

1. Matériels et méthodes

Patients

Le sang a été prélevé chez des sujets non allergiques et des sujets allergiques. Les sujets allergiques présentaient un taux d'IgE totales supérieur à 100kU/l et au moins un RAST positif (*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, pollens de dactyles ou phléoles, poils de chiens ou chat, allergènes de souris ou rat). Les sujets non allergiques présentaient un taux d'IgE totales inférieur à 100 kU/l et des RAST négatifs pour les aéroallergènes préalablement cités.

Isolement des PBMC et purification des cellules NK

Après élimination du plasma (centrifugation 1000 rpm pendant 15 minutes), le sang dilué dans du RPMI 1640 (Lonza, Basel, Suisse) supplémenté avec du Ticarpen a été déposé sur du Ficoll Paque plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède) puis centrifugé à température ambiante à 1700 rpm pendant 25 minutes. L'anneau contenant les cellules mononucléées a été récupéré, lavé (centrifugation 2000 rpm pendant 10 minutes) puis les cellules ont été comptées sur cellule de Thoma.

Les cellules NK ont alors été purifiées à l'aide du NK cell isolation kit® (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) suivant les recommandations du fournisseur. La pureté a été évaluée par cytométrie en flux (FACScalibur®, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) et était supérieure ou égale à 95% (absence de contaminations en cellules CD3⁺, CD19⁺ et CD14⁺).

Marquage membranaire de(s) récepteur(s) de CCL18

Après une nuit en culture en RPMI complet, 5x10⁵ cellules NK diluées dans 100 µl de PBS-SVF2% ont été incubées avec du CCL18 biotinylé (2x10⁻⁷ M ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) pendant une heure sur glace. Après deux lavages, les cellules NK ont été incubées avec 0,01 µg de streptavidine-PE (R&D Systems, Greater Minneapolis-St. Paul, MN, USA) dilué dans du PBS contenant 10% de sérum

de souris pendant 30 minutes sur glace et à l'obscurité. Après lavages, les cellules NK marquées ont été immédiatement analysées par cytométrie en flux (FACScalibur®).

Migration des cellules NK

Après purification, les cellules NK reprises à 10^6 /ml dans du RPMI 1640 complet (Lonza, Basel, Suisse) (RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF, 100 IU/mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine, 1% de Ticarpen, 2mM L-glutamine) ont été mises en culture sur la nuit dans une plaque 6 puits (Corning Incorporated, NY, USA).

Migration en chambre de Boyden

Les tests de chimiotaxie ont été réalisés dans une chambre de microchimiotaxie de 48 puits (NeuroProbe, Gaithersburg, MD, USA) avec un filtre de polycarbonate dont les pores étaient égaux à 5 μ m (Nucleopore, Pleasanton, CA, USA). Du RPMI complet, CXCL12 (10^{-7} M ; PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA), CXCL10 (10^{-7} M ; PeproTech Inc) ou CCL18 (de 10^{-7} M à 10^{-10} M ; R&D systems) a été placé dans le compartiment inférieur de la chambre. Après centrifugation, les cellules NK ont été suspendues en RPMI complet à une concentration de 3×10^6 /ml et $1,5 \times 10^5$ cellules NK ont été déposées dans le compartiment supérieur de la chambre. Chaque condition a été réalisée en triplicat. Après une incubation de 2 heures à 37°C dans 5% de CO₂, les cellules NK du compartiment inférieur de la chambre ont été comptées sur cellules de Thoma. Les résultats sont exprimés en index de migration.

$$\text{Index de migration} = \frac{\text{Migration pour la chimiokine testée} - \text{Migration en RPMI complet seul}}{\text{Migration en RPMI complet seul}}$$

Ainsi, un index de migration supérieur à 0 indique une migration spécifique des cellules NK.

Dans certaines expériences, après purification, les cellules NK en suspension à 10^6 /ml dans du RPMI complet ont été mises en culture sur la nuit en présence de toxine pertussique (PTX) (0,1 μ g/ml ; Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA).

Migration en Transwell®

Du RPMI complet ou CCL18 (5×10^{-8} M) a été déposé dans le compartiment inférieur du Transwell® (24 puits, Corning incorporated). Après centrifugation, les cellules NK ont été resuspendues en RPMI complet à 5×10^6 /ml et 5×10^5 cellules ont été déposées dans la chambre supérieure. Après 2 heures d'incubation à 37°C dans 5% de CO₂, les cellules NK présentes dans les compartiments inférieur et supérieur ont été comptées. Le pourcentage de migration spécifique des cellules NK (pourcentage de

migration obtenue en réponse à CCL18 – pourcentage de migration obtenue en RPMI complet seul) était de $9.9 \pm 4.1\%$. Le phénotype des cellules NK a été étudié avant et après migration et les résultats sont exprimés en pourcentage d'enrichissement.

$$\text{Pourcentage d'enrichissement} = \frac{\text{Pourcentage d'expression du marqueur après migration} \times 100}{\text{Pourcentage d'expression du marqueur avant migration}}$$

Marquages de cytométrie en flux

Lors de la vérification de la pureté des cellules NK obtenues, des marquages membranaires ont été effectués à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CD56, le CD3, le CD14 et le CD19 (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA pour le CD56 et BD Pharmingen, San Diego, CA, USA pour les autres anticorps) selon les recommandations des fournisseurs. Après lavages, les cellules marquées ont été immédiatement analysées par cytométrie en flux (FACScalibur®).

Lors des expériences de phénotypage des cellules NK, les marquages membranaires ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CD56 et le CD16 ou les isotypes contrôle couplés aux fluorochromes FITC ou PE (Beckman coulter pour le CD56 et BD Pharmingen pour les autres anticorps) selon les recommandations des fournisseurs. Après fixation et perméabilisation (Cytotfix/Cytoperm ; BD Biosciences), des marquages intracellulaires ont été réalisés à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre la perforine et l'IFN- γ ou les isotypes contrôle couplés aux fluorochromes FITC ou PE (BD Pharmingen) suivant les instructions du fournisseur. Après lavages, les cellules NK marquées ont été immédiatement analysées par cytométrie en flux (FACScalibur®).

Dans certaines expériences, seul un marquage intracellulaire vis-à-vis de l'IFN- γ et de la perforine a été effectué.

Test de cytotoxicité

Après purification, les cellules NK ont été remises en suspension à 10^6 cellules/ml dans du RPMI complet puis mises en culture pendant la nuit dans une plaque 6 puits (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Ces cellules ont été incubées en milieu complet seul (contrôle négatif) ou en présence de la combinaison IL-2 (10 ng/ml ; Immunotools, Friesoythe, Allemagne) / IL-12 (5 ng/ml ; Immunotools) / IL-15 (20 ng/ml ; PeproTech inc) ou de CCL18 (10^{-8} M). Dans deux expériences, deux conditions d'incubation des cellules NK ont été ajoutées: toxine pertussique (0,1 μ g/ml) et la combinaison toxine pertussique (0,1 μ g/ml) / CCL18 (10^{-8} M). Dans cette dernière, la toxine pertussique était ajoutée 15 minutes avant CCL18. Les cellules cibles (cellules Jurkat) provenaient de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

Après centrifugation, les cellules NK et les cellules cibles ont été suspendues en RPMI complet aux concentrations respectives de 10×10^6 cellules NK/ml et $0,5 \times 10^6$ cellules Jurkat/ml. Les cellules cibles et les cellules NK ont été incubées pendant 3 heures à 37°C dans 5% de CO₂ à différents ratios Effecteurs : Cibles (0:1, 1:1, 5:1, 10:1) dans une plaque 96 puits à fond rond (Corning Incorporated). Afin d'évaluer la mortalité des cellules NK, des cellules NK seules ont été incubées dans les mêmes conditions que préalablement citées à différents ratios Effecteurs : Cibles (1:0 ; 5:0 ; 10:0). Chaque condition a été réalisée en triplicat. La cytotoxicité des cellules NK a été mesurée à l'aide du ToxiLight® BioAssay Kit (Lonza). Brièvement, après centrifugation, les milieux de culture ont été collectés et 100 µl d'AK Detection Reagent ont été ajoutés à 20 µl de milieux de culture. Après incubation, la bioluminescence a été mesurée à l'aide d'un compteur de luminescence (Victor ; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). L'intensité de lumière émise est linéairement corrélée à la concentration d'Adenylate Kinase libérée par les cellules endommagées. Les résultats sont exprimés en index de cytotoxicité :

Moyenne de la mortalité des cellules NK + Jurkat – Moyenne de la mortalité des cellules NK seules
Moyenne de la mortalité des Jurkat seules

Production d'IFN-γ

Après purification, 10^5 cellules NK reprises à 10^6 /ml en RPMI complet ont été incubées en RPMI complet seul (contrôle négatif) ou en présence de la combinaison IL-2 (10 ng/ml) / IL-12 (5 ng/ml) / IL-15 (10 ng/ml) ou de CCL18 (10^{-8} M) pendant 48, 72 et 96 heures dans une plaque 96 puits (BD Biosciences). Après centrifugation, les surnageants ont été collectés et les taux d'IFN-γ ont été mesurés par ELISA suivant les recommandations du fournisseur (Diaclone, Besançon, France). Les résultats sont exprimés en pg/ml, les limites inférieures et supérieures de détection étant respectivement de 12,5 pg/ml et 400 pg/ml.

Analyses statistiques

Certaines valeurs ont été exprimées en moyenne ± erreur standard à la moyenne (sem). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de GraphPad Prism 4 software. Les tests non paramétriques de Wilcoxon ou de Mann Whitney ont été utilisés pour comparer les mesures. Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives lorsque $p < 0.05$.

2. Résultats

Expression du récepteur de CCL18 à la surface des cellules NK de sujets non allergiques et de sujets allergiques

L'expression membranaire du récepteur au CCL18 a été analysée à l'aide d'un CCL18 humain de synthèse biotinylé et de la streptavidine PE. Sur 9 sujets non allergiques testés, l'expression du récepteur au CCL18 a été détectée sur les cellules NK de 4 sujets (Figure 1a). De même, sur 8 sujets allergiques, celle-ci a été observée chez 4 sujets (Figure 1b). Ainsi, le récepteur au CCL18 peut être exprimé à la surface des cellules NK de sujets non allergiques et de sujets allergiques.

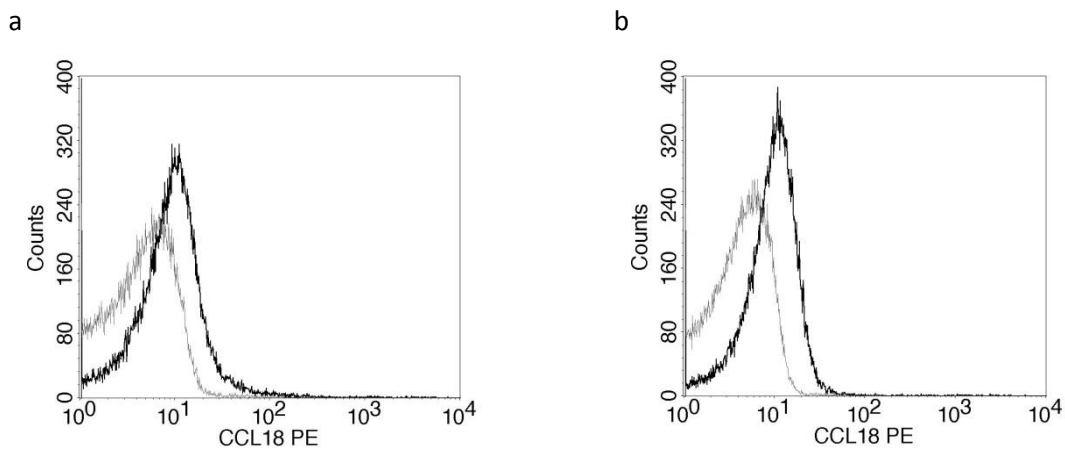


Figure 1: Expression du récepteur au CCL18 à la surface des cellules NK de sujets non allergiques et de sujets allergiques.

L'expression du récepteur au CCL18 a été analysée à la surface des cellules NK purifiées de sujets non allergiques et de sujets allergiques par cytométrie en flux à l'aide d'un CCL18 biotinylé et de la streptavidine PE (histogramme noir). Le contrôle consistait en une incubation des cellules NK avec des IgG2a biotinylées de souris suivie d'une incubation avec la streptavidine PE (histogramme gris). Une expérience représentative sur 4 est représentée à la fois chez les sujets non allergiques (a) et les sujets allergiques (b).

Attraction des cellules NK vis-à-vis de CCL18 dépendante de la protéine G et du donneur

Afin de déterminer l'effet chimioattractant de CCL18 sur les cellules NK, des chimiotaxies en chambre de Boyden ont été réalisées avec les cellules NK purifiées à partir du sang périphérique de donneurs non allergiques et de donneurs allergiques. CCL18 a attiré de façon dose dépendante les cellules NK

de 11 sujets non allergiques sur 14 et de 3 sujets allergiques sur 6 (Figures 2a et 2b). L'attraction des cellules NK vis-à-vis de CCL18 ne corrèlent pas avec l'expression membranaire de son récepteur détectée selon la méthode décrite dans le paragraphe précédent puisque chez certains donneurs les cellules NK migrent en réponse à CCL18 alors qu'aucune expression du récepteur n'a été détectée à leur surface. Pour distinguer entre l'effet de chimiokinésie ou de chimiotaxie, des expériences de chimiotaxie ont été effectuées avec des concentrations similaires de CCL18 dans les compartiments inférieurs et supérieurs de la chambre de Boyden. L'addition de CCL18 dans le compartiment supérieur de la chambre a significativement inhibée la migration des cellules NK vers le compartiment inférieur, ce qui élimine l'hypothèse de chimiokinésie (données non montrées). Par conséquent, CCL18 est capable d'attirer les cellules NK. Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre l'attraction exercée par CCL18 sur les cellules NK de sujets non allergiques comparativement aux sujets allergiques. Cependant, l'attraction des cellules NK par CCL18 semble dépendante du donneur.

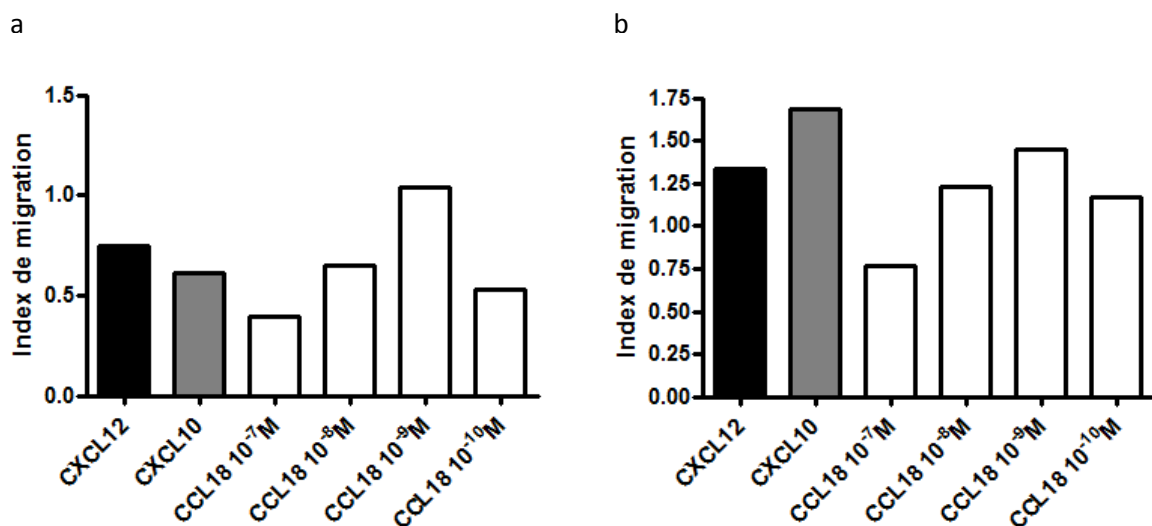


Figure 2: Migration *in vitro* des cellules NK vis-à-vis de CCL18.

Après une nuit de culture en RPMI complet, le recrutement des cellules NK isolées du sang périphérique de sujets non allergiques et de sujets allergiques vis-à-vis de CCL18 a été analysé. CXCL12 et CXCL10 étaient les contrôles positifs. (a) Une expérience de chimiotaxie représentative de 11 chez les sujets non allergiques. (b) Une expérience de chimiotaxie représentative de 3 chez les sujets allergiques. Les résultats sont exprimés en index de migration.

L'attraction des cellules NK n'étant pas dépendante du statut allergique ou non allergique du sujet, la suite des expériences de migration a été réalisée sur des donneurs non allergiques.

Pour déterminer si la migration des cellules NK vis-à-vis de CCL18 était dépendante des protéines G, l'effet de la toxine pertussique (PTX), inhibiteur des récepteurs couplés aux protéines G, a été

analysé. Comme prévu, la PTX a inhibé la migration des cellules NK vis-à-vis de CXCL12. Celle-ci a également inhibé la migration des cellules NK vis-à-vis de CCL18, suggérant que la migration des cellules NK en réponse à CCL18 est dépendante d'un récepteur couplé aux protéines G (Figure 3).

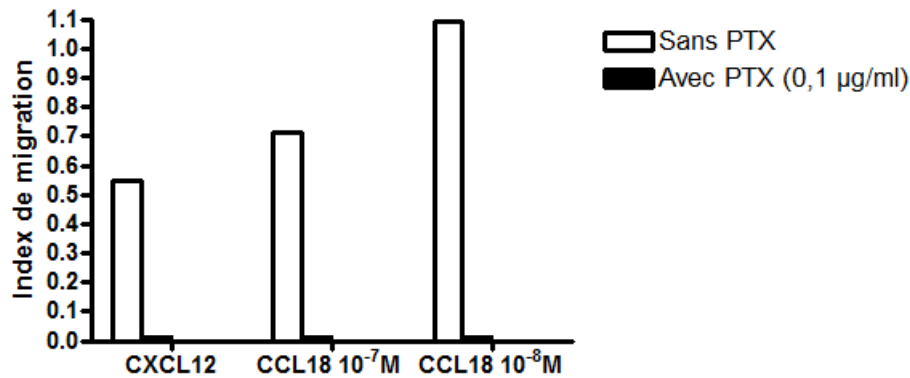


Figure 3: Migration *in vitro* des cellules NK vis-à-vis de CCL18 après incubation avec la toxine pertussique.

Après purification, les cellules NK isolées du sang périphérique de 3 donneurs non allergiques ont été mises en culture sur la nuit en RPMI complet seul (barre blanche) ou en présence de PTX (barre noire). Après lavage, la migration des cellules NK en réponse à du RPMI complet seul, à CXCL12 et à CCL18 a été analysée. Une expérience représentative de 3 est représentée et les résultats sont exprimés en index de migration.

Les cellules NK humaines sont divisées en deux-sous-populations en fonction de l'expression du CD56 et de CD16: les cellules NK CD56^{bright}CD16^{low/-} et les cellules NK CD56^{dim}CD16⁺. Afin d'évaluer si CCL18 attirait préférentiellement l'une ou l'autre de ces sous-populations, nous avons analysé la distribution de ces deux sous-populations avant et après migration en réponse à CCL18 ou au milieu seul. Aucune attraction préférentielle d'une des deux sous-populations n'a été observée en réponse à CCL18 comparativement à celle observée en milieu seul (Figure 4a). D'un point de vue fonctionnel, les cellules NK sont capables de produire des cytokines, et notamment de l'IFN- γ et sont cytotoxiques vis-à-vis de cellules cibles via la libération de granules contenant des perforines et granzymes ou via des interactions Fas/Fas-ligand. Nous avons alors étudié l'expression intracellulaire de l'IFN- γ et de la perforine avant et après migration en réponse à CCL18 ou au milieu seul. Aucune modification du pourcentage de cellules NK exprimant l'IFN- γ ou la perforine n'a été observée en réponse à CCL18 comparativement à celle observée en milieu seul (Figure 4b). Néanmoins, les cellules NK migrant vis-à-vis de CCL18 tendaient à présenter une diminution de l'expression de l'IFN- γ comparativement aux cellules NK migrant en absence de CCL18 (Figure 4c), suggérant la libération de cette cytokine.

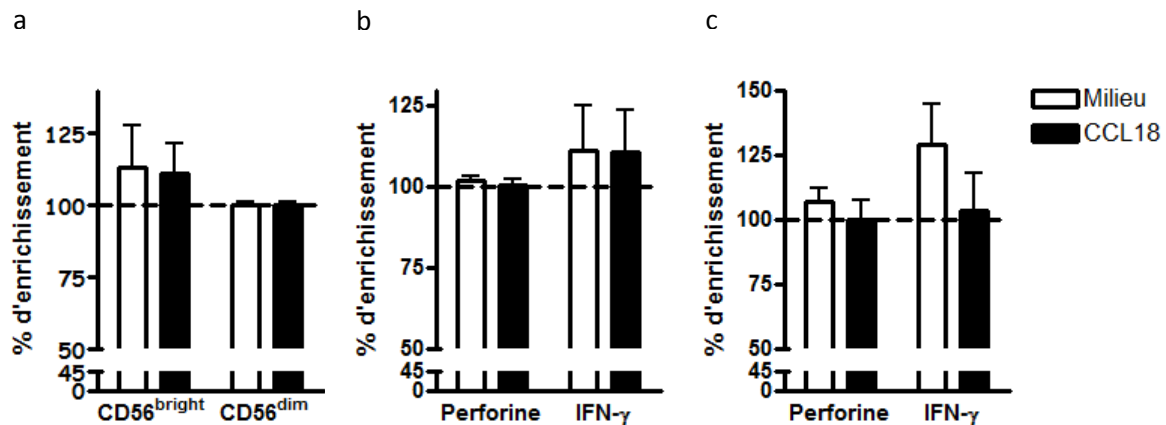


Figure 4: Phénotype des cellules NK avant et après migration *in vitro* en réponse à CCL18.

Après une nuit de culture en RPMI complet, le phénotype des cellules NK isolées du sang périphérique de 6 sujets non allergiques a été analysé avant et après migration en réponse à CCL18 (barre noire) ou au milieu seul (barre blanche). (a) Pourcentage d'enrichissement en cellules NK CD56^{bright}CD16⁻ et CD56^{dim}CD16⁺. (b) Pourcentage d'enrichissement en cellules NK exprimant la perforine et l'IFN- γ . (c) Pourcentage d'enrichissement de l'expression de la perforine et de l'IFN- γ (Δ MFI=Intensité moyenne de fluorescence de l'anticorps d'intérêt – Intensité moyenne de fluorescence de l'anticorps contrôle). Les résultats sont exprimés en pourcentage d'enrichissement \pm sem.

Libération d'IFN- γ en réponse à une stimulation directe par CCL18

La libération d'IFN- γ par les cellules NK en réponse à CCL18 pouvant être due à la migration en elle-même ou à la stimulation par CCL18, 5×10^5 cellules NK ont été incubées avec CCL18 ($5 \cdot 10^{-8}$ M) pendant deux heures (mêmes conditions que pour la migration en transwell[®]) et l'expression intracellulaire de l'IFN- γ a été analysée par cytométrie en flux. Après stimulation avec CCL18, le pourcentage de cellules NK exprimant l'IFN- γ était similaire à celui des cellules NK non stimulées (Figure 5a). Toutefois, cette stimulation a significativement diminué le niveau d'expression de l'IFN- γ dans les cellules NK (Δ MFI=79,3 \pm 17,5 après stimulation CCL18 versus Δ MFI=114,8 \pm 22,1 en absence de stimulation) (Figure 5b), suggérant que la libération d'IFN- γ est due à la stimulation par CCL18 et non à la migration. Néanmoins, l'IFN- γ n'a pu être détecté dans le surnageant de culture (données non montrées). L'expression de la perforine n'était, quant à elle, pas modifiée après une stimulation avec CCL18 (données non montrées).

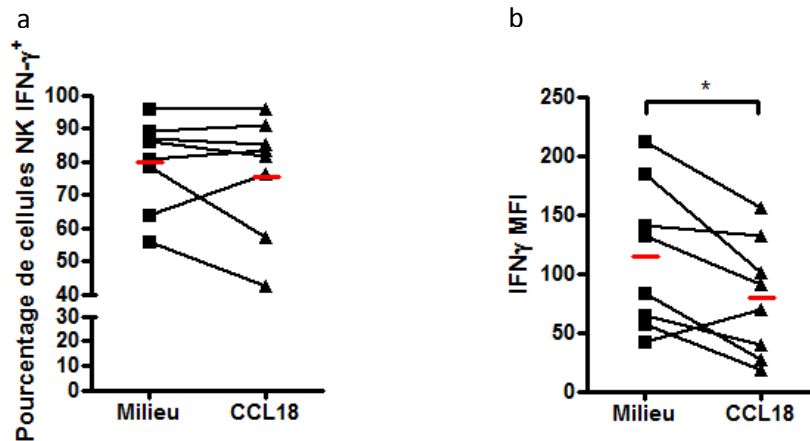


Figure 5: Libération de d'IFN-γ par les cellules NK après stimulation avec CCL18.

Après une nuit de culture en RPMI complet, les cellules NK isolées du sang périphérique de 5 sujets non allergiques et de 3 sujets allergiques ont été stimulées ou non avec du CCL18 pendant deux heures et l'expression intracellulaire d'IFN-γ a été analysée par cytométrie en flux. (a) Pourcentage de cellules NK exprimant l'IFN-γ. (b) Δ MFI de l'expression de l'IFN-γ. Les barres rouges représentent la valeur moyenne. *: $p < 0,05$.

L'effet de CCL18 sur la production d'IFN-γ a également été analysé. Pour cela, les cellules NK ont été mises en culture pendant 48, 72 ou 96 heures en RPMI complet seul ou en présence de la combinaison IL-2/IL-12/IL-15 ou de CCL18. Une stimulation des cellules NK pendant 48, 72 et 96 heures avec la combinaison de cytokines IL-2/IL-12/IL-15 a conduit à une production massive et significative d'IFN-γ comparativement aux cellules NK non stimulées (données non montrées). La stimulation avec CCL18 tendait à diminuer la quantité d'IFN-γ détectée dans les surnageants, et ce quelque soit le temps d'analyse (Figures 6a-c). Par conséquent, CCL18 semble induire une diminution de la libération d'IFN-γ par les cellules NK en culture. Ces résultats suggèrent que CCL18 n'induit pas de production *de novo* d'IFN-γ et/ou qu'elle empêche sa libération après une culture de 2 à 4 jours.

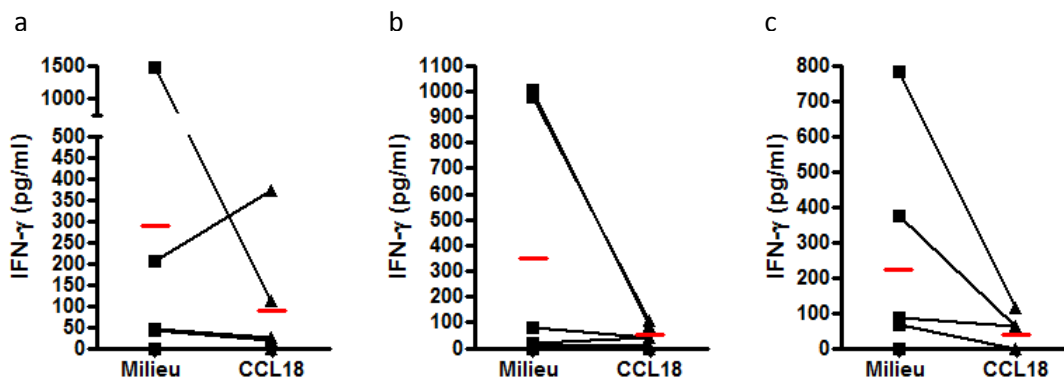


Figure 6: Production d'IFN-γ par les cellules NK après stimulation par CCL18.

Après purification, les cellules NK isolées du sang périphérique de 5 sujets non allergiques et d'1 sujet allergique ont été incubées en milieu complet seul ou supplémenté avec CCL18 pendant 48 (a), 72 (b) ou 96 (c) heures. La production d'IFN-γ a été mesurée dans le surnageant de culture par ELISA. Les résultats sont exprimés en $\text{pg/ml} \pm \text{sem}$. Les barres rouges représentent la valeur moyenne.

Potentialisation de la cytotoxicité des cellules NK par CCL18 dépendante du donneur et des protéines G

Les cellules NK sont très bien connues pour leur activité cytotoxique. L'effet de CCL18 sur la cytotoxicité des cellules NK de sujets allergiques et non allergiques a donc été analysé en utilisant une lignée cellulaire cible sensible aux cellules NK, les Jurkat. L'incubation des cellules NK avec la combinaison de cytokines IL-2/IL-12/IL-15 a amplifié l'activité cytotoxique des cellules NK isolées de tous les sujets allergiques et non allergiques testés (données non montrées). CCL18 a amplifié la cytotoxicité des cellules NK de 7 sujets non allergiques sur 13 et de 3 sujets allergiques sur 9, mais ce de façon moindre que la combinaison de cytokines (Figures 7a et b). Par conséquent, CCL18 est capable de potentialiser la cytotoxicité des cellules NK. Similairement à la chimiotaxie, cette potentialisation semble dépendante du donneur mais indépendante de son statut allergique.

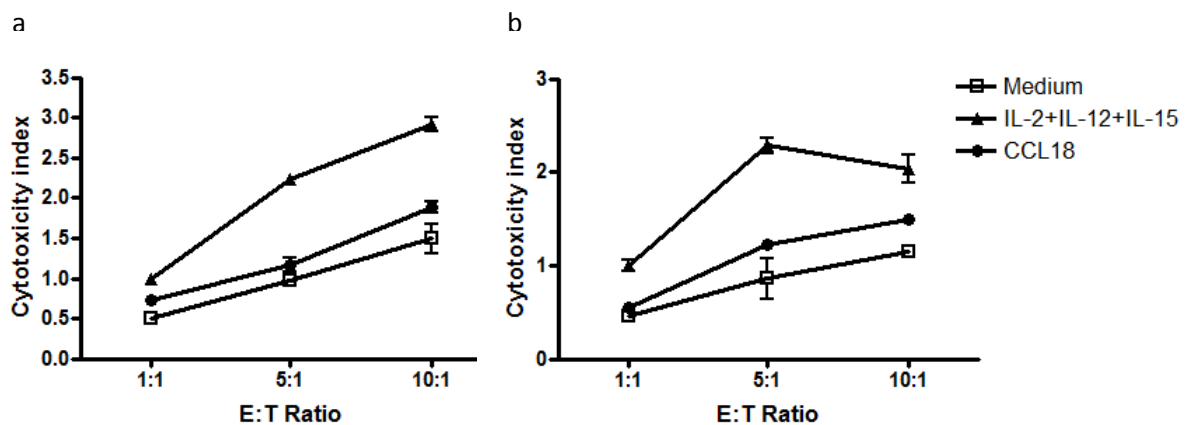


Figure 7 : Cytotoxicité des cellules NK après stimulation avec CCL18.

Après purification, les cellules NK de 13 sujets non allergiques et de 9 sujets allergiques ont été incubées sur la nuit en milieu complet seul (carré blanc) ou supplémenté avec la combinaison de cytokines IL-2/IL-12/IL-15 (triangle noir) ou CCL18 (rond noir). Les cellules NK ont ensuite été incubées avec les cellules cibles Jurkat à différents ratios Effecteurs:Cibles. (a) Une expérience représentative de 7 chez les sujets non allergiques. (b) Une expérience représentative de 3 chez les sujets allergiques. Les résultats sont exprimés en index de cytotoxicité.

Afin de déterminer si la potentialisation de la cytotoxicité des cellules NK induite par CCL18 était dépendante des protéines G, les cellules NK ont été incubées sur la nuit en présence de PTX et CCL18. L'incubation des cellules NK en présence de PTX n'a aucun effet sur la cytotoxicité en condition basale. En revanche, en présence de la PTX, l'amplification de la cytotoxicité induite par CCL18 a été inhibée (Figure 8), suggérant l'intervention des protéines G dans ce processus.

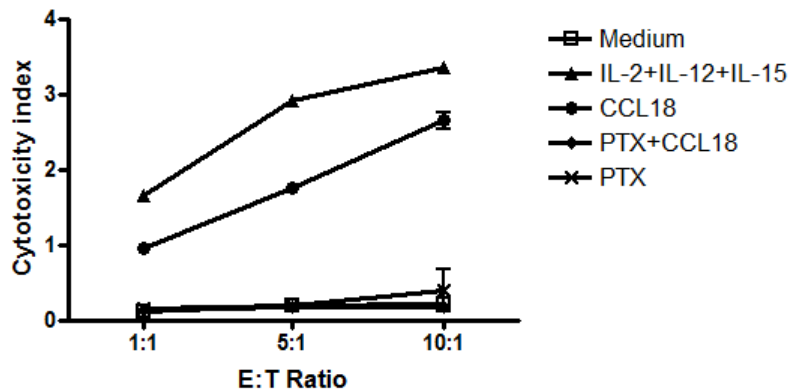


Figure 8: Effet de la PTX sur l'amplification de la cytotoxicité induite par CCL18.

Après purification, les cellules NK de sujets non allergiques ont été incubées sur la nuit en milieu complet seul (carré blanc) ou supplémenté avec la combinaison de cytokines IL-2/IL-12/IL-15 (triangle noir) ou CCL18 (rond noir) ou PTX (croix noire) ou la combinaison PTX/CCL18. Les cellules NK ont ensuite été incubées avec les cellules cibles Jurkat à différents ratios Effecteurs:Cibles. Une expérience représentative de deux est présentée et les résultats sont exprimés en index de cytotoxicité.

3. Discussion

Dans ce travail, nous avons montré que les cellules NK sont capables d'exprimer un récepteur pour CCL18 et de migrer en réponse à CCL18, et ce de façon dépendante des protéines G et du donneur. De plus, en réponse à CCL18, les cellules NK semblent libérer de l'IFN- γ dans les deux premières heures de stimulation. En revanche, CCL18 n'induit pas de libération d'IFN- γ par les cellules NK après une stimulation de 48, 72 ou 96 heures. Enfin, similairement à la migration, CCL18 est capable d'amplifier la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules Jurkat de façon dépendante des protéines G et du donneur.

L'expression du récepteur de CCL18 n'est pas retrouvée chez la totalité des sujets analysés et les cellules NK de tous les donneurs ne migrent pas en réponse à CCL18. CCL18 étant exprimée au niveau sérique, une désensibilisation de son récepteur aurait pu être à l'origine de son absence d'expression. Deux arguments viennent réfuter cette hypothèse. Tout d'abord, les marquages et les migrations ont été réalisés après une culture de 24 heures en milieu complet, temps généralement suffisant pour une réexpression du récepteur à la surface. Certaines études ont toutefois mis en évidence des désensibilisations pouvant aller jusqu'à 48 heures. Nous avons donc réalisé des expériences de migration 24 heures et 48 heures après culture. Des résultats similaires ont été obtenus entre les deux temps de culture, excluant ainsi la désensibilisation comme origine de l'absence de détection membranaire du récepteur à CCL18 (données non montrées). Ensuite,

l'expression du récepteur à CCL18 ne corrèle ni avec l'activité chimiotactique ni avec l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, même en absence de détection du récepteur à CCL18, les cellules NK sont capables de migrer et d'amplifier la cytotoxicité en réponse à cette chimiokine. L'hypothèse la plus probable permettant d'expliquer l'absence de détection membranaire du récepteur à CCL18 est la technique utilisée pour analyser l'expression du ou des récepteurs au CCL18. Ces derniers étant inconnus, la synthèse d'anticorps anti-CCL18 récepteur est impossible à réaliser faisant ainsi de la molécule de synthèse CCL18 biotinylée le seul moyen de les détecter. Afin d'éviter l'internalisation du complexe CCL18 biotinylé/Récepteur, l'ensemble du marquage a été réalisée à 4°C. Toutefois, il peut être envisageable qu'à un moment l'internalisation ait lieu, rendant alors impossible sa détection extracellulaire.

Nous avons montré que les cellules NK sont capables de migrer en réponse à CCL18. Dans le laboratoire, une corrélation entre le nombre de cellules NK et les taux de CCL18 dans les liquides pleuraux de mésothélium a été mise en évidence (Thèse de Patricia de Nadai, U416), ce qui est en accord avec nos résultats. L'attraction des cellules NK humaines vis-à-vis de CCL18 ne semble pas fonction du statut allergique des sujets testés mais plutôt fonction du donneur. Un effet donneur-dépendant de la migration des cellules NK en réponse à une chimiokine a déjà été observé. En effet, seules les cellules NK de certains donneurs migrent modestement en réponse à CXCL8, alors que ses récepteurs CXCR1 et CXCR2 (controversé pour CXCR2) sont exprimés à la surface des cellules NK humaines (Campbell J.J. *et al.*, 2001; Inngjerdigen M. *et al.*, 2001; Taub D.D. *et al.*, 1995). Similairement aux lymphocytes T naïfs CD45RA⁺ (Adema G.J. *et al.*, 1997) et aux lymphocytes B (Lindhout E. *et al.*, 2001), l'attraction des cellules NK par CCL18 fait intervenir un récepteur couplé aux protéines G puisqu'en présence de toxine pertussique cette dernière est abrogée.

CCL18 n'a pas attiré une sous-population de cellules NK particulière (CD56^{bright} ou CD56^{dim}), suggérant que son récepteur est exprimé de façon similaire sur les deux sous-populations. Des résultats similaires ont été rapportés pour CXCL12 (Campbell J.J. *et al.*, 2001).

Une stimulation de deux heures par CCL18 a conduit à une diminution de l'expression intracellulaire de l'IFN- γ , suggérant sa sécrétion. La quantité d'IFN- γ libérée devait être très faible puisqu'elle n'était pas détectable lors d'un dosage ELISA des surnageants de culture. Un autre effet rapide de CCL18 a déjà été mis en évidence sur un autre type de dégranulation. Ainsi, une stimulation de 45 minutes par CCL18 a été montrée capable d'induire la libération d'histamine par les leucocytes circulants, et plus particulièrement par les basophiles (de Nadai P. *et al.*, 2006). Une stimulation des cellules NK par CCL18 pendant 48, 72 ou 96 heures n'a pas induit d'augmentation du taux d'IFN- γ dans les surnageants de culture et tendait même à le diminuer. Ainsi, CCL18 semble induire une diminution

de la libération d'IFN- γ . Cette dernière pourrait être attribuée à une inhibition induite par CCL18 de la production *de novo* d'IFN- γ ou de sa libération. Toutefois, l'inhibition de sa libération semble peu probable puisque l'IFN- γ semble libéré après une stimulation de deux heures par CCL18.

Nous avons également montré que CCL18 était capable d'amplifier la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules cibles Jurkat comparativement aux cellules NK non stimulées. Similairement à la chimiotaxie, cette potentialisation était indépendante du statut allergique des sujets. Contrairement à notre étude, certaines ont montré que les cellules NK isolées du sang périphérique de sujets asthmatiques allergiques présentaient des capacités cytotoxiques accrues vis-à-vis des cellules cibles K562 (Di Lorenzo G. *et al.*, 2001; Timonen T. and Stenius-Aarniala B., 1985). Les techniques de purification des cellules NK utilisées pourraient être à l'origine des résultats discordants observés. Alors que nous avons travaillé avec des cellules NK pures, les autres études ont été réalisées soit à partir de LGL (Large Granular Lymphocytes: fraction contenant les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK), soit avec des LAK (Lymphokine-Activated Killer). L'utilisation de cellules cibles différentes (Jurkat versus K562), deux lignées cellulaires faisant intervenir des mécanismes de cytotoxicité différents, pourrait également contribuer à ces résultats divergents. Nos résultats actuels sont renforcés par l'observation, au cours d'un autre travail réalisé au sein du laboratoire, que les cellules NK de sujets allergiques et non allergiques présentaient des capacités cytotoxiques similaires, et ceci vis-à-vis d'une autre lignée de cellules cibles (THP-1) (article en préparation). En présence de toxine pertussique, l'amplification de la cytotoxicité induite par CCL18 n'était plus observée, suggérant le rôle des protéines G dans l'effet de CCL18. Des chimiokines avaient déjà été montrées capables d'amplifier la lyse de cellules cibles par les cellules NK, et ce de façon donneur-dépendant. Ainsi, les chimiokines CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 et CXCL10 amplifient la lyse des cellules cibles (K562), et ce de façon dépendante du donneur. CCL2, CCL4 et CCL5 augmentent la cytotoxicité des cellules NK de 8 sujets sur 12, alors que les effets amplificateurs de CCL3 et CXCL10 sont plus constants puisqu'ils sont retrouvés chez 11 donneurs sur 12 (Taub D.D. *et al.*, 1995). CX₃CL1 amplifie également la lyse des cellules NK (Yoneda O. *et al.*, 2000). Tout comme dans notre étude, l'amplification de la lyse induite par les chimiokines était moindre comparativement à une stimulation cytokinique (IL-2) (Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995; Yoneda O. *et al.*, 2000). Les modalités d'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK par les chimiokines ne sont pas connues. Toutefois, les chimiokines sont capables d'induire la dégranulation des cellules NK (Loetscher P. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995; Yoneda O. *et al.*, 2000), et ce via un mécanisme dépendant des protéines G (Yoneda O. *et al.*, 2000). De plus, CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 induisent une redistribution des molécules d'adhérence ICAM-1 et ICAM-3 à la surface des cellules NK (Nieto M. *et al.*, 1998), nécessaire à la formation des conjugués cellules NK/cellules cibles. Dans notre étude, l'induction de

la dégranulation ne semble pas impliquée puisque les cellules NK ont été pré-incubées avec CCL18 puis mises en contact avec les cellules cibles ultérieurement après lavage.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggère que CCL18 attire les cellules NK et amplifie leur cytotoxicité via des mécanismes dépendant des protéines G et de façon donneur-dépendant. Par contre, aucune différence n'a été observée entre les cellules NK de sujets allergiques et non allergiques, suggérant que les cellules NK de sujets allergiques ne présentent pas de défaut fonctionnel en réponse à CCL18.

4. Perspectives

Les cellules NK humaines sont capables de répondre à CCL18 même en absence de détection membranaire de son récepteur. Afin d'éviter un manque de détection lié à une internalisation du complexe molécule de synthèse CCL18 biotinylée/Récepteur, un marquage intracellulaire en parallèle du marquage extracellulaire sera effectué. La distribution des sous-populations de cellules NK a été réalisée pour le moment uniquement chez des sujets non allergiques. Bien que la migration des cellules NK ne semble pas dépendante du statut allergique du sujet, l'analyse des sous-populations de cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} recrutées après migration en Transwell® chez les sujets allergiques permettra d'évaluer une éventuelle migration différentielle en fonction du statut allergique. Nous avons également montré que, chez les sujets non allergiques, une stimulation de deux heures par CCL18 diminue l'expression intracellulaire d'IFN- γ suggérant la sécrétion de cette cytokine. Des résultats similaires ont été obtenus chez 2 sujets allergiques testés sur 3. Afin de confirmer que la diminution de l'expression intracellulaire de l'IFN- γ n'est pas dépendante du statut allergique du donneur, des expériences additionnelles seront réalisées chez les sujets allergiques.

Chez les sujets non allergiques, nous avons observé qu'une stimulation des cellules NK avec CCL18 pendant 48, 72 ou 96 heures n'induit pas de libération d'IFN- γ , voire même qu'elle pourrait l'inhiber. D'autres études ont, quant à elles, montré que certaines chimiokines sont capables de potentialiser la libération de médiateurs solubles par les mastocytes activés via leur Fc ϵ RI (Price K.S. *et al.*, 2003) et les basophiles activés par l'IL-3 ou des allergènes (Devouassoux G. *et al.*, 1999; Jinquan T. *et al.*, 2000; Krieger M. *et al.*, 1992; Uguccioni M. *et al.*, 1997). Une stimulation des cellules NK avec la combinaison IL-2/CCL18 ou IL-12/CCL18 permettra de déterminer si CCL18 est capable de moduler la production/sécrétion d'IFN- γ induite par l'IL-2 seule ou l'IL-12 seule. L'IL-2 seule et l'IL-12 seule ont été montrées induire la sécrétion de faibles quantités d'IFN- γ par les cellules NK après 24 heures de stimulation (Duluc D. *et al.*, 2009), ce qui permettrait dans notre étude d'observer la modulation de cette sécrétion induite par CCL18. Afin de mettre en évidence une éventuelle production et/ou

libération différentielle d'IFN- γ en fonction du statut allergique, une stimulation des cellules NK de 48, 72 ou 96h avec CCL18 sera réalisée chez les sujets allergiques. Une étude préliminaire sur un patient allergique a montré un profil similaire aux sujets non allergiques.

Lors des expériences de cytotoxicité, nous avons utilisé comme cellules cibles les cellules Jurkat qui expriment constitutivement Fas. Ainsi, après interaction entre Fas et Fas-Ligand (cellule NK), les cellules Jurkat meurent par apoptose. Les cellules NK sont également capables de lyser les cellules cibles dépourvues de CMH I via la libération de granules cytotoxiques contenant notamment la perforine et les granzymes. Cette dégranulation aboutit également à l'apoptose de leur cible. Cette modalité de cytotoxicité est par exemple utilisée par les cellules NK vis-à-vis des cellules K562. Des chimiokines ayant été montrées induire la dégranulation des cellules NK (Loetscher P. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1996; Taub D.D. *et al.*, 1995; Yoneda O. *et al.*, 2000), l'analyse de la lyse des cellules K562 après l'ajout de CCL18 au moment de la mise en présence des cellules NK et des cellules K562 permettra d'évaluer si cette chimiokine est capable d'augmenter la dégranulation des cellules NK.

ANNEXES

Annexe 1: Classification et sources cellulaires/tissulaires des chimiokines

	SOURCES CELLULAIRES/TISSULAIRES	RECEPTEUR(S)
LES CC CHIMIOKINES		
CCL1	monocytes/macrophages, cellules T, mastocytes, basophiles, cellules NK, cellules endothéliales, cellules épithéliales, cellules microgliales, astrocytes	CCR8
CCL2	monocytes, macrophages alvéolaires, mastocytes, précurseurs mastocytaires CD34 ⁺ , fibroblastes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, neutrophiles, DC, glioblastome, cellules mésangiales	CCR2, CCR10
CCL3	monocytes, macrophages alvéolaires, éosinophiles, mastocytes, neutrophiles, cellules NK, fibroblastes, glioblastome, cellules mésangiales	CCR1, CCR5
CCL4	monocytes/macrophages, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, cellules NK, basophiles, fibroblastes	CCR5
CCL5	monocyte/macrophages, cellules T, mastocytes, éosinophiles, cellules NK, cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes, cellules mésangiales	CCR1, CCR3, CCR5
CCL6	monocytes/macrophages, éosinophiles, cellules NKT, cellules microgliales	CCR1
CCL7	monocytes/macrophages, mastocytes, plaquettes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses (ARNm), fibroblastes	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	monocytes/macrophages, fibroblastes, cellules musculaires lisses bronchiques	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5
CCL9/10	monocytes/macrophages, DC, poumons, foie, thymus, pancréas	CCR1
CCL11	éosinophiles, mastocytes, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales	CCR3
CCL12	monocytes/macrophages, ganglions lymphatiques	CCR2
CCL13	DC, cellules épithéliales bronchiques, cellules musculaires lisses, poumons, thymus, intestins	CCR2, CCR3
CCL14	cellules musculaires lisses, moelle osseuse, rate, foie, intestins	CCR1, CCR5
CCL15	monocytes/macrophages, cellules T, cellules B, DC, cellules NK	CCR1, CCR3
CCL16	monocytes/macrophages	CCR1
CCL17	monocytes/macrophages, DC, cellules T, cellules NKT, précurseurs mastocytaires CD34 ⁺ , cellules épithéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses	CCR4
CCL18	monocytes/macrophages, DC (mDC et pDC), éosinophiles, neutrophiles, cellules épithéliales de la lignée Caco2, poumons, ganglions, thymus	???
CCL19	neutrophiles, ganglions lymphatiques, rate, thymus, intestins	CCR7
CCL20	monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules T, cellules Th17, cellules épithéliales, cellules endothéliales, foie, poumons, thymus, placenta, appendice	CCR6
CCL21	cellules endothéliales, ganglions lymphatiques	CCR7
CCL22	monocytes/macrophages, DC, cellules T, cellules B, cellules NK, cellules NKT, cellules épithéliales, précurseurs mastocytaires CD34 ⁺	CCR4
CCL23	monocytes/macrophages, DC, poumons, foie	CCR1
CCL24	monocytes/macrophages, cellules T, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, poumons, rate, thymus, foie	CCR3
CCL25	DC, cellules épithéliales, cellules endothéliales, intestins	CCR9
CCL26	cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, cœur, ovaires	CCR3, CCR10
CCL27	kératinocytes, placenta, peau	CCR10
CCL28	cellules épithéliales, cellules endothéliales	CCR10
LES CXC CHIMIOKINES		
CXCL1	monocytes/macrophages, neutrophiles, fibroblastes, cellules épithéliales, cellules endothéliales, cellules de mélanome	CXCR1, CXCR2
CXCL2	monocytes/macrophages, neutrophiles, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules de mélanome	CXCR2
CXCL3	monocytes/macrophages, neutrophiles, fibroblastes, cellules endothéliales, cellules de mélanome	CXCR2
CXCL4	plaquettes, mégakariocytes	???
CXCL5	éosinophiles, plaquettes, cellules endothéliales	CXCR2
CXCL6	monocytes/macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales	CXCR1, CXCR2
CXCL7	monocytes/macrophages, plaquettes, cellules endothéliales	CXCR2
CXCL8	monocytes, macrophages alvéolaires, cellules T, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, fibroblastes, cellules NK, basophiles, précurseurs mastocytaires CD34 ⁺ , cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, hépatocytes, kératinocytes, cellules mésangiales, glioblastome, plaquettes, astrocytes	CXCR1, CXCR2
CXCL9	monocytes/macrophages, neutrophiles, cellules épithéliales	CXCR3
CXCL10	monocytes/macrophages, neutrophiles, fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes, glioblastome, astrocytes	CXCR3
CXCL11	monocytes/macrophages, neutrophiles, astrocytes	CXCR3
CXCL12	cellules épithéliales, cellules endothéliales, poumons	CXCR4
CXCL13	monocytes/macrophages, DC, cellules endothéliales, ganglions lymphatiques, rate	CXCR5
CXCL14	monocytes/macrophages, cellules B, fibroblastes	???
CXCL15	cellules endothéliales (poumons)	???
CXCL16	monocytes/macrophages, DC, cellules B	CXCR6
LES CX ₃ C CHIMIOKINES		
CX₃CL1	DC, Cellules Présentatrices d'antigène, cellules T, cellules endothéliales, neurones	CX ₃ CR1
LES XCL CHIMIOKINES		
XCL1	cellules T, mastocytes, cellules NK	XCR1
XCL2	cellules T, cellules NK, rate	XCR1

Adapté de Smit JJ *et al*, European Journal of Pharmacology, 2006

Annexe 2: Classification des récepteurs aux chimiokines

	EXPRESSION	LIGAND(S)
LES CCR RECEPTEURS		
CCR1	monocytes/macrophages, DC, cellules T, cellules B, mastocytes, éosinophiles, neutrophiles, Tr1, basophiles, astrocytes	CCL3, CCL5-10, CCL14-16, CCL23
CCR2	monocytes/macrophages, éosinophiles, neutrophiles, basophiles, Tr1, cellules NK	CCL2, CCL7, CCL8, CCL12, CCL13
CCR3	éosinophiles, basophiles, mastocytes, neutrophiles, cellules T (Th2), Tr1, cellules épithéliales, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales	CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13, CCL15, CCL24, CCL26
CCR4	monocytes/macrophages, cellules T (Th2), Treg naturels, Tr1, DC, basophiles, mastocytes, éosinophiles, cellules NK humaines, cellules NKT (ARNm), plaquettes	CCL17, CCL22
CCR5	monocytes/macrophages, cellules T (Th1), Tr1, DC, mastocytes, cellules NK murines et cellules NK humaines CD56 ^{bright}	CCL3-5, CCL8, CCL14
CCR6	cellules T, cellules Th17, DC, cellules B	CCL20
CCR7	monocytes/macrophages, DC, cellules T naïves, cellules B, cellules NK CD56 ^{bright}	CCL19, CCL21
CCR8	monocytes/macrophages, cellules T (Th2), Treg naturels, Tr1, DC, cellules NK activées par l'IL-2, thymocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses	CCL1
CCR9	cellules B, cellules T, thymocytes	CCL25
CCR10	cellules B, cellules T	CCL2, CCL26-28
LES CXCR RECEPTEURS		
CXCR1	monocytes/macrophages, cellules T, Tr1, mastocytes, basophiles, neutrophiles, cellules NK humaines, cellules endothéliales	CXCL1, CXCL6, CXCL8
CXCR2	monocytes/macrophages, cellules T, mastocytes, basophiles, neutrophiles, cellules endothéliales, astrocytes, neurones	CXCL1-3, CXCL5-8
CXCR3	cellules T (Th1), Tr1, éosinophiles, mastocytes, cellules NK, cellules endothéliales	CXCL9-11
CXCR4	monocytes/macrophages, DC, cellules T naïves, cellules Th2 (+/-), Tr1, cellules B, mastocytes, éosinophiles (+/-), basophiles (sous certaines conditions), cellules NK, cellules CD34 ⁺ , cellules épithéliales, cellules endothéliales	CXCL12
CXCR5	monocytes/macrophages, cellules T, cellules B	CXCL13
CXCR6	cellules T, cellules NK murines CD27 ^{high} /CD11b ^{low}	CXCL16
LES CX ₃ CR RECEPTEURS		
CX₃CR1	monocytes/macrophages, cellules T, mastocytes, neutrophiles, cellules NK humaines CD56 ^{dim} et cellules NK murines CD27 ^{low} CD11b ^{high} , cellules microgliales	CX ₃ CL1
LES XCR RECEPTEURS		
XCR1	cellules T, mastocytes, cellules NK humaines, neurones	XCL1, XCL2

Par analogie à la nomenclature des chimiokines, leurs récepteurs sont classés en CCR, CXCR, CX₃CR et XCR. Dans ce tableau sont listées les cellules exprimant ces récepteurs et leurs ligands. Concernant les cellules T, la population apparaissant entre parenthèse est celle qui exprime préférentiellement le récepteur. (+/-), expression controversée.

Adapté de Smit JJ *et al*, European Journal of Pharmacology, 2006

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1987. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, November 1986. *Am Rev Respir Dis* 136:225-244.

A

Abe M., Kurosawa M., Ishikawa O., and Miyachi Y. 2000. Effect of mast cell-derived mediators and mast cell-related neutral proteases on human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *J Allergy Clin Immunol* 106:S78-84.

Abraham M., Biyder K., Begin M., Wald H., Weiss I.D., Galun E., Nagler A., and Peled A. 2007. Enhanced unique pattern of hematopoietic cell mobilization induced by the CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003. *Stem Cells* 25:2158-2166.

Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., and Sallusto F. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.

Acosta-Rodriguez E.V., Rivino L., Geginat J., Jarrossay D., Gattorno M., Lanzavecchia A., Sallusto F., and Napolitani G. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8:639-646.

Adamkiewicz T.V., McSherry C., Bach F.H., and Houchins J.P. 1994. Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins. *Immunogenetics* 39:218.

Adema G.J., Hartgers F., Verstraten R., de Vries E., Marland G., Menon S., Foster J., Xu Y., Nooyen P., McClanahan T., Bacon K.B., and Figdor C.G. 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387:713-717.

Adler H.S., and Steinbrink K. 2007. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 17:476-491.

Adrain C., Murphy B.M., and Martin S.J. 2005. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* 280:4663-4673.

Agaugue S., Marcenaro E., Ferranti B., Moretta L., and Moretta A. 2008. Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 112:1776-1783.

Agea E., Russano A., Bistoni O., Mannucci R., Nicoletti I., Corazzi L., Postle A.D., De Libero G., Porcelli S.A., and Spinozzi F. 2005. Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens. *J Exp Med* 202:295-308.

Ahn H.J., Maruo S., Tomura M., Mu J., Hamaoka T., Nakanishi K., Clark S., Kurimoto M., Okamura H., and Fujiwara H. 1997. A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 159:2125-2131.

Akbari O., Faul J.L., Hoyte E.G., Berry G.J., Wahlstrom J., Kronenberg M., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 2006. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354:1117-1129.

Akbari O., Freeman G.J., Meyer E.H., Greenfield E.A., Chang T.T., Sharpe A.H., Berry G., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 8:1024-1032.

Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M.J., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9:582-588.

- Akdis M., Verhagen J., Taylor A., Karamloo F., Karagiannidis C., Cramer R., Thunberg S., Deniz G., Valenta R., Fiebig H., Kegel C., Disch R., Schmidt-Weber C.B., Blaser K., and Akdis C.A. 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* 199:1567-1575.
- Akimoto T., Numata F., Tamura M., Takata Y., Higashida N., Takashi T., Takeda K., and Akira S. 1998. Abrogation of bronchial eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity in signal transducers and activators of transcription (STAT)6-deficient mice. *J Exp Med* 187:1537-1542.
- Akoum H., Tscopoulos A., Vorng H., Wallaert B., Dessaint J.P., Joseph M., Hamid Q., and Tonnel A.B. 1996. Venom immunotherapy modulates interleukin-4 and interferon-gamma messenger RNA expression of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 87:593-598.
- Aktas E., Akdis M., Bilgic S., Disch R., Falk C.S., Blaser K., Akdis C., and Deniz G. 2005. Different natural killer (NK) receptor expression and immunoglobulin E (IgE) regulation by NK1 and NK2 cells. *Clin Exp Immunol* 140:301-309.
- Aktas E., Kucuksezer U.C., Bilgic S., Erten G., and Deniz G. 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 254:149-154.
- Al-Ramli W., Prefontaine D., Chouiali F., Martin J.G., Olivenstein R., Lemiere C., and Hamid Q. 2009. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123:1185-1187.
- Al-Shami A., Spolski R., Kelly J., Keane-Myers A., and Leonard W.J. 2005. A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *J Exp Med* 202:829-839.
- Alam R., Stafford S., Forsythe P., Harrison R., Faubion D., Lett-Brown M.A., and Grant J.A. 1993. RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *J Immunol* 150:3442-3448.
- Alexis N.E., Soukup J., Nierkens S., and Becker S. 2001. Association between airway hyperreactivity and bronchial macrophage dysfunction in individuals with mild asthma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280:L369-375.
- Algeciras-Schimmich A., and Peter M.E. 2003. Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett* 546:185-188.
- Alimonti J.B., Shi L., Baijal P.K., and Greenberg A.H. 2001. Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 276:6974-6982.
- Allakhverdi Z., Smith D.E., Comeau M.R., and Delespesse G. 2007. Cutting edge: The ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 179:2051-2054.
- Allan D.S., Colonna M., Lanier L.L., Churakova T.D., Abrams J.S., Ellis S.A., McMichael A.J., and Braud V.M. 1999. Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 189:1149-1156.
- Allan S.E., Broady R., Gregori S., Himmel M.E., Locke N., Roncarolo M.G., Bacchetta R., and Levings M.K. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 223:391-421.
- Allavena P., Bianchi G., Zhou D., van Damme J., Jilek P., Sozzani S., and Mantovani A. 1994. Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol* 24:3233-3236.
- Allavena P., Paganin C., Martin-Padura I., Peri G., Gaboli M., Dejana E., Marchisio P.C., and Mantovani A. 1991. Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med* 173:439-448.
- Alter G., Malenfant J.M., and Altfeld M. 2004. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294:15-22.
- Amin K., Janson C., Harvima I., Venge P., and Nilsson G. 2005. CC chemokine receptors CCR1 and CCR4 are expressed on airway mast cells in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:1383-1386.
- Andrade F., Bull H.G., Thornberry N.A., Ketner G.W., Casciola-Rosen L.A., and Rosen A. 2001. Adenovirus L4-100K assembly protein is a granzyme B substrate that potently inhibits granzyme B-mediated cell death. *Immunity* 14:751-761.

- Andrade F., Fellows E., Jenne D.E., Rosen A., and Young C.S. 2007. Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. *Embo J* 26:2148-2157.
- Andre P., Spertini O., Guia S., Rihet P., Dignat-George F., Brailly H., Sampol J., Anderson P.J., and Vivier E. 2000. Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3400-3405.
- Andrew D.P., Chang M.S., McNinch J., Wathen S.T., Rihaneck M., Tseng J., Spellberg J.P., and Elias C.G., 3rd. 1998. STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *J Immunol* 161:5027-5038.
- Anfossi N., Andre P., Guia S., Falk C.S., Roetynck S., Stewart C.A., Bresó V., Frassati C., Revirón D., Middleton D., Romagne F., Ugolini S., and Vivier E. 2006. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25:331-342.
- Annunziato F., Cosmi L., Galli G., Beltrame C., Romagnani P., Manetti R., Romagnani S., and Maggi E. 1999. Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 65:691-699.
- Annunziato F., Cosmi L., Santarlasci V., Maggi L., Liotta F., Mazzinghi B., Parente E., Fili L., Ferri S., Frosali F., Giudici F., Romagnani P., Parronchi P., Tonelli F., Maggi E., and Romagnani S. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204:1849-1861.
- Annunziato F., Manetti R., Tomasevic I., Guidizi M.G., Biagiotti R., Gianni V., Germano P., Mavilia C., Maggi E., and Romagnani S. 1996. Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production. *Faseb J* 10:769-776.
- Arase H., Arase N., Kobayashi Y., Nishimura Y., Yonehara S., and Onoe K. 1994. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J Exp Med* 180:423-432.
- Arase H., Arase N., and Saito T. 1995. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med* 181:1235-1238.
- Arase H., Mocarski E.S., Campbell A.E., Hill A.B., and Lanier L.L. 2002. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323-1326.
- Arase H., Saito T., Phillips J.H., and Lanier L.L. 2001. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J Immunol* 167:1141-1144.
- Arase N., Arase H., Hirano S., Yokosuka T., Sakurai D., and Saito T. 2003. IgE-mediated activation of NK cells through Fc gamma RIII. *J Immunol* 170:3054-3058.
- Arm J.P., Nwankwo C., and Austen K.F. 1997. Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor. *J Immunol* 159:2342-2349.
- Arnon T.I., Achdout H., Levi O., Markel G., Saleh N., Katz G., Gazit R., Gonen-Gross T., Hanna J., Nahari E., Porgador A., Honigman A., Plachter B., Mevorach D., Wolf D.G., and Mandelboim O. 2005. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6:515-523.
- Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A., and Mandelboim O. 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31:2680-2689.
- Arnoux B., Duval D., and Benveniste J. 1980. Release of platelet-activating factor (PAF-acether) from alveolar macrophages by the calcium ionophore A23187 and phagocytosis. *Eur J Clin Invest* 10:437-441.
- Asai K., Kanazawa H., Otani K., Shiraishi S., Hirata K., and Yoshikawa J. 2002. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin levels in induced sputum from asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 110:571-575.
- Ashkar A.A., and Croy B.A. 1999. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 61:493-502.

- Aste-Amezaga M., D'Andrea A., Kubin M., and Trinchieri G. 1994. Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunol* 156:480-492.
- Atamas S.P., Luzina I.G., Choi J., Tsybalyuk N., Carbonetti N.H., Singh I.S., Trojanowska M., Jimenez S.A., and White B. 2003. Pulmonary and activation-regulated chemokine stimulates collagen production in lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:743-749.
- Auer J., Blass M., Schulze-Koops H., Russwurm S., Nagel T., Kalden J.R., Rollinghoff M., and Beuscher H.U. 2007. Expression and regulation of CCL18 in synovial fluid neutrophils of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 9:R94.
- Aujla S.J., Chan Y.R., Zheng M., Fei M., Askew D.J., Pociask D.A., Reinhart T.A., McAllister F., Edeal J., Gaus K., Husain S., Kreindler J.L., Dubin P.J., Pilewski J.M., Myerburg M.M., Mason C.A., Iwakura Y., and Kolls J.K. 2008. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14:275-281.
- Aversa G., Punnonen J., Cocks B.G., de Waal Malefyt R., Vega F., Jr., Zurawski S.M., Zurawski G., and de Vries J.E. 1993. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J Exp Med* 178:2213-2218.
- Awasthi A., Samarakoon A., Dai X., Wen R., Wang D., and Malarkannan S. 2008. Deletion of PI3K-p85alpha gene impairs lineage commitment, terminal maturation, cytokine generation and cytotoxicity of NK cells. *Genes Immun* 9:522-535.
- Azzawi M., Bradley B., Jeffery P.K., Frew A.J., Wardlaw A.J., Knowles G., Assoufi B., Collins J.V., Durham S., and Kay A.B. 1990. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis* 142:1407-1413.

B

- Bacchetta R., Bigler M., Touraine J.L., Parkman R., Tovo P.A., Abrams J., de Waal Malefyt R., de Vries J.E., and Roncarolo M.G. 1994. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 179:493-502.
- Bacchetta R., Sartirana C., Levings M.K., Bordignon C., Narula S., and Roncarolo M.G. 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 32:2237-2245.
- Bacharier L.B., and Geha R.S. 2000. Molecular mechanisms of IgE regulation. *J Allergy Clin Immunol* 105:S547-558.
- Bajenoff M., Breart B., Huang A.Y., Qi H., Cazareth J., Braud V.M., Germain R.N., and Glaichenhaus N. 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 203:619-631.
- Balbo P., Silvestri M., Rossi G.A., Crimi E., and Burastero S.E. 2001. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin Exp Allergy* 31:625-636.
- Ballantyne S.J., Barlow J.L., Jolin H.E., Nath P., Williams A.S., Chung K.F., Sturton G., Wong S.H., and McKenzie A.N. 2007. Blocking IL-25 prevents airway hyperresponsiveness in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120:1324-1331.
- Ballas Z.K., Rasmussen W.L., and Krieg A.M. 1996. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157:1840-1845.
- Balzar S., Chu H.W., Strand M., and Wenzel S. 2005. Relationship of small airway chymase-positive mast cells and lung function in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171:431-439.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J., Pulendran B., and Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.

- Bandeira-Melo C., Bozza P.T., and Weller P.F. 2002. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 109:393-400.
- Barao I., Hanash A.M., Hallett W., Welniak L.A., Sun K., Redelman D., Blazar B.R., Levy R.B., and Murphy W.J. 2006. Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5460-5465.
- Barber D.F., Faure M., and Long E.O. 2004. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 173:3653-3659.
- Bardel E., Larousserie F., Charlot-Rabiega P., Coulomb-L'Hermine A., and Devergne O. 2008. Human CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* 181:6898-6905.
- Barnes P.J. 2007. New molecular targets for the treatment of neutrophilic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 119:1055-1062; quiz 1063-1054.
- Barrat F.J., Cua D.J., Boonstra A., Richards D.F., Crain C., Savelkoul H.F., de Waal-Malefyt R., Coffman R.L., Hawrylowicz C.M., and O'Garra A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.
- Barrios V.E., Middleton S.C., Kashem M.A., Havill A.M., Toombs C.F., and Wright C.D. 1998. Tryptase mediates hyperresponsiveness in isolated guinea pig bronchi. *Life Sci* 63:2295-2303.
- Barry M., Heibei J.A., Pinkoski M.J., Lee S.F., Moyer R.W., Green D.R., and Bleackley R.C. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20:3781-3794.
- Bartemes K.R., McKinney S., Gleich G.J., and Kita H. 1999. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol* 162:2982-2989.
- Baumer W., Wendorff S., Gutzmer R., Werfel T., Dijkstra D., Chazot P., Stark H., and Kietzmann M. 2008. Histamine H4 receptors modulate dendritic cell migration through skin--immunomodulatory role of histamine. *Allergy* 63:1387-1394.
- Beasley R., Roche W.R., Roberts J.A., and Holgate S.T. 1989. Cellular events in the bronchi in mild asthma and after bronchial provocation. *Am Rev Respir Dis* 139:806-817.
- Becker I., Salaiza N., Aguirre M., Delgado J., Carrillo-Carrasco N., Kobeh L.G., Ruiz A., Cervantes R., Torres A.P., Cabrera N., Gonzalez A., Maldonado C., and Isibasi A. 2003. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130:65-74.
- Beider K., Nagler A., Wald O., Franitza S., Dagan-Berger M., Wald H., Giladi H., Brocke S., Hanna J., Mandelboim O., Darash-Yahana M., Galun E., and Peled A. 2003. Involvement of CXCR4 and IL-2 in the homing and retention of human NK and NK T cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice. *Blood* 102:1951-1958.
- Bennett C.L., Christie J., Ramsdell F., Brunkow M.E., Ferguson P.J., Whitesell L., Kelly T.E., Saulsbury F.T., Chance P.F., and Ochs H.D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 27:20-21.
- Beresford P.J., Jaju M., Friedman R.S., Yoon M.J., and Lieberman J. 1998. A role for heat shock protein 27 in CTL-mediated cell death. *J Immunol* 161:161-167.
- Beresford P.J., Xia Z., Greenberg A.H., and Lieberman J. 1999. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* 10:585-594.
- Beresford P.J., Zhang D., Oh D.Y., Fan Z., Greer E.L., Russo M.L., Jaju M., and Lieberman J. 2001. Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 276:43285-43293.
- Berger P., Compton S.J., Molimard M., Walls A.F., N'Guyen C., Marthan R., and Tunon-De-Lara J.M. 1999. Mast cell tryptase as a mediator of hyperresponsiveness in human isolated bronchi. *Clin Exp Allergy* 29:804-812.

- Berman M.E., Xie Y., and Muller W.A. 1996. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol* 156:1515-1524.
- Bernardini G., Sciume G., Bosisio D., Morrone S., Sozzani S., and Santoni A. 2008. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood* 111:3626-3634.
- Bernardini G., Spinetti G., Ribatti D., Camarda G., Morbidelli L., Ziche M., Santoni A., Capogrossi M.C., and Napolitano M. 2000. I-309 binds to and activates endothelial cell functions and acts as an angiogenic molecule in vivo. *Blood* 96:4039-4045.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., and Kuchroo V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.
- Beuneu H., Deguine J., Breart B., Mandelboim O., Di Santo J.P., and Bousso P. 2009. Dynamic behavior of NK cells during activation in lymph nodes. *Blood* 114:3227-3234.
- Bianchi G., Sironi M., Ghibaudi E., Selvaggini C., Elices M., Allavena P., and Mantovani A. 1993. Migration of natural killer cells across endothelial cell monolayers. *J Immunol* 151:5135-5144.
- Biassoni R., Cantoni C., Falco M., Verdiani S., Bottino C., Vitale M., Conte R., Poggi A., Moretta A., and Moretta L. 1996. The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med* 183:645-650.
- Biassoni R., Falco M., Cambiaggi A., Costa P., Verdiani S., Pende D., Conte R., Di Donato C., Parham P., and Moretta L. 1995. Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med* 182:605-609.
- Biassoni R., Pessino A., Bottino C., Pende D., Moretta L., and Moretta A. 1999. The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol* 29:1014-1020.
- Biassoni R., Pessino A., Malaspina A., Cantoni C., Bottino C., Sivori S., Moretta L., and Moretta A. 1997. Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol* 27:3095-3099.
- Bieber T., de la Salle H., Wollenberg A., Hakimi J., Chizzonite R., Ring J., Hanau D., and de la Salle C. 1992. Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J Exp Med* 175:1285-1290.
- Binstadt B.A., Brumbaugh K.M., Dick C.J., Scharenberg A.M., Williams B.L., Colonna M., Lanier L.L., Kinet J.P., Abraham R.T., and Leibson P.J. 1996. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* 5:629-638.
- Bishop B., and Lloyd C.M. 2003. CC chemokine ligand 1 promotes recruitment of eosinophils but not Th2 cells during the development of allergic airways disease. *J Immunol* 170:4810-4817.
- Blanchard C., Durual S., Estienne M., Emami S., Vasseur S., and Cuber J.C. 2005. Eotaxin-3/CCL26 gene expression in intestinal epithelial cells is up-regulated by interleukin-4 and interleukin-13 via the signal transducer and activator of transcription 6. *Int J Biochem Cell Biol* 37:2559-2573.
- Bloushtain N., Qimron U., Bar-Ilan A., Hershkovitz O., Gazit R., Fima E., Korc M., Vlodaysky I., Bovin N.V., and Porgador A. 2004. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173:2392-2401.
- Bochner B.S., Hudson S.A., Xiao H.Q., and Liu M.C. 2003. Release of both CCR4-active and CXCR3-active chemokines during human allergic pulmonary late-phase reactions. *J Allergy Clin Immunol* 112:930-934.
- Bochner B.S., Klunk D.A., Sterbinsky S.A., Coffman R.L., and Schleimer R.P. 1995. IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 154:799-803.

- Bochner B.S., and Schleimer R.P. 2001. Mast cells, basophils, and eosinophils: distinct but overlapping pathways for recruitment. *Immunol Rev* 179:5-15.
- Bodhankar S., Woolard M.D., Sun X., and Simecka J.W. 2009. NK cells interfere with the generation of resistance against mycoplasma respiratory infection following nasal-pulmonary immunization. *J Immunol* 183:2622-2631.
- Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P.P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani S., Allavena P., Gray P.A., Mantovani A., and Sinigaglia F. 1998. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 187:129-134.
- Boniface K., Bak-Jensen K.S., Li Y., Blumenschein W.M., McGeachy M.J., McClanahan T.K., McKenzie B.S., Kastelein R.A., Cua D.J., and de Waal Malefyt R. 2009. Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *J Exp Med* 206:535-548.
- Boos M.D., Yokota Y., Eberl G., and Kee B.L. 2007. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* 204:1119-1130.
- Borg C., Jalil A., Laderach D., Maruyama K., Wakasugi H., Charrier S., Ryffel B., Cambi A., Figdor C., Vainchenker W., Galy A., Caignard A., and Zitvogel L. 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104:3267-3275.
- Borges L., Hsu M.L., Fanger N., Kubin M., and Cosman D. 1997. A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 159:5192-5196.
- Borish L., Aarons A., Rumblyrt J., Cvietusa P., Negri J., and Wenzel S. 1996. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97:1288-1296.
- Borish L., Mascali J.J., Dishuck J., Beam W.R., Martin R.J., and Rosenwasser L.J. 1992. Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol* 149:3078-3082.
- Borish L.C., and Steinke J.W. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111:S460-475.
- Borrego F., Ulbrecht M., Weiss E.H., Coligan J.E., and Brooks A.G. 1998. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med* 187:813-818.
- Bosse Y., Thompson C., Audette K., Stankova J., and Rola-Pleszczynski M. 2008. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Int Arch Allergy Immunol* 146:138-148.
- Bottazzi B., Introna M., Allavena P., Villa A., and Mantovani A. 1985. In vitro migration of human large granular lymphocytes. *J Immunol* 134:2316-2321.
- Bousquet J., Chané P., Lacoste J.Y., Barneon G., Ghavanian N., Enander I., Venge P., Ahlstedt S., Simony-Lafontaine J., Godard P., and et al. 1990. Eosinophilic inflammation in asthma. *N Engl J Med* 323:1033-1039.
- Brandt C.S., Baratin M., Yi E.C., Kennedy J., Gao Z., Fox B., Haldeman B., Ostrander C.D., Kaifu T., Chabannon C., Moretta A., West R., Xu W., Vivier E., and Levin S.D. 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495-1503.
- Bratke K., Lommatzsch M., Julius P., Kuepper M., Kleine H.D., Luttmann W., and Christian Virchow J. 2007. Dendritic cell subsets in human bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen challenge. *Thorax* 62:168-175.
- Braud V., Jones E.Y., and McMichael A. 1997. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol* 27:1164-1169.

- Braud V.M., Allan D.S., O'Callaghan C.A., Soderstrom K., D'Andrea A., Ogg G.S., Lazetic S., Young N.T., Bell J.I., Phillips J.H., Lanier L.L., and McMichael A.J. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795-799.
- Braud V.M., Allan D.S., Wilson D., and McMichael A.J. 1998. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8:1-10.
- Brillard E., Pallandre J.R., Chalmers D., Ryffel B., Radlovic A., Seilles E., Rohrlich P.S., Pivot X., Tiberghien P., Saas P., and Borg C. 2007. Natural killer cells prevent CD28-mediated Foxp3 transcription in CD4+CD25- T lymphocytes. *Exp Hematol* 35:416-425.
- Brilot F., Strowig T., Roberts S.M., Arrey F., and Munz C. 2007. NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15 α . *J Clin Invest* 117:3316-3329.
- Broeren C.P., Gray G.S., Carreno B.M., and June C.H. 2000. Costimulation light: activation of CD4+ T cells with CD80 or CD86 rather than anti-CD28 leads to a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 165:6908-6914.
- Brooks A.G., Posch P.E., Scorzelli C.J., Borrego F., and Coligan J.E. 1997. NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor. *J Exp Med* 185:795-800.
- Broxmeyer H.E., Kim C.H., Cooper S.H., Hangoc G., Hromas R., and Pelus L.M. 1999. Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann N Y Acad Sci* 872:142-162; discussion 163.
- Bruder D., Probst-Kepper M., Westendorf A.M., Geffers R., Beisert S., Loser K., von Boehmer H., Buer J., and Hansen W. 2004. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 34:623-630.
- Bruna-Romero O., Schmieg J., Del Val M., Buschle M., and Tsuji M. 2003. The dendritic cell-specific chemokine, dendritic cell-derived CC chemokine 1, enhances protective cell-mediated immunity to murine malaria. *J Immunol* 170:3195-3203.
- Brustle A., Heink S., Huber M., Rosenplanter C., Stadelmann C., Yu P., Arpaia E., Mak T.W., Kamradt T., and Lohoff M. 2007. The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* 8:958-966.
- Bryan S.A., O'Connor B.J., Matti S., Leckie M.J., Kanabar V., Khan J., Warrington S.J., Renzetti L., Rames A., Bock J.A., Boyce M.J., Hansel T.T., Holgate S.T., and Barnes P.J. 2000. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2149-2153.
- Bryceson Y.T., March M.E., Ljunggren H.G., and Long E.O. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73-91.
- Burgler S., Ouaked N., Bassin C., Basinski T.M., Mantel P.Y., Siegmund K., Meyer N., Akdis C.A., and Schmidt-Weber C.B. 2009. Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:588-595, 595 e581-587.
- Burkett P.R., Koka R., Chien M., Chai S., Boone D.L., and Ma A. 2004. Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 α and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 200:825-834.
- Burshtyn D.N., Scharenberg A.M., Wagtmann N., Rajagopalan S., Berrada K., Yi T., Kinet J.P., and Long E.O. 1996. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4:77-85.
- Burshtyn D.N., Yang W., Yi T., and Long E.O. 1997. A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1. *J Biol Chem* 272:13066-13072.

C

- Caligiuri M.A., Zmuidzinas A., Manley T.J., Levine H., Smith K.A., and Ritz J. 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171:1509-1526.
- Campbell E., Kunkel S.L., Strieter R.M., and Lukacs N.W. 2000. Differential roles of IL-18 in allergic airway disease: induction of eotaxin by resident cell populations exacerbates eosinophil accumulation. *J Immunol* 164:1096-1102.
- Campbell J.J., Bowman E.P., Murphy K., Youngman K.R., Siani M.A., Thompson D.A., Wu L., Zlotnik A., and Butcher E.C. 1998. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. *J Cell Biol* 141:1053-1059.
- Campbell J.J., Qin S., Unutmaz D., Soler D., Murphy K.E., Hodge M.R., Wu L., and Butcher E.C. 2001. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166:6477-6482.
- Campbell K.S., Dessing M., Lopez-Botet M., Cella M., and Colonna M. 1996. Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184:93-100.
- Cantoni C., Bottino C., Vitale M., Pessino A., Augugliaro R., Malaspina A., Parolini S., Moretta L., Moretta A., and Biassoni R. 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-796.
- Cantoni C., Verdiani S., Falco M., Pessino A., Cilli M., Conte R., Pende D., Ponte M., Mikaelsson M.S., Moretta L., and Biassoni R. 1998. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur J Immunol* 28:1980-1990.
- Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., Song J., Collins L.I., Piwnicka-Worms D.R., and Ley T.J. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
- Carbone E., Terrazzano G., Ruggiero G., Zanzi D., Ottaiano A., Manzo C., Karre K., and Zappacosta S. 1999. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29:4022-4029.
- Cardell L.O., Uddman R., Zhang Y., and Adner M. 2008. Interleukin-1beta up-regulates tumor necrosis factor receptors in the mouse airways. *Pulm Pharmacol Ther* 21:675-681.
- Careau E., and Bissonnette E.Y. 2004. Adoptive transfer of alveolar macrophages abrogates bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:22-27.
- Careau E., Proulx L.I., Pouliot P., Spahr A., Turmel V., and Bissonnette E.Y. 2006. Antigen sensitization modulates alveolar macrophage functions in an asthma model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L871-879.
- Carlyle J.R., Mesci A., Fine J.H., Chen P., Belanger S., Tai L.H., and Makrigiannis A.P. 2008. Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Semin Immunol* 20:321-330.
- Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Herbault N., Magistrelli G., Bonnefoy J.Y., Pestel J., and Jeannin P. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J Immunol* 166:6000-6006.
- Carpen O., Virtanen I., Lehto V.P., and Saksela E. 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J Immunol* 131:2695-2698.
- Carpen O., Virtanen I., and Saksela E. 1982. Ultrastructure of human natural killer cells: nature of the cytolytic contacts in relation to cellular secretion. *J Immunol* 128:2691-2697.
- Carretero M., Cantoni C., Bellon T., Bottino C., Biassoni R., Rodriguez A., Perez-Villar J.J., Moretta L., Moretta A., and Lopez-Botet M. 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently

- assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27:563-567.
- Carson W.E., Giri J.G., Lindemann M.J., Linett M.L., Ahdieh M., Paxton R., Anderson D., Eisenmann J., Grabstein K., and Caligiuri M.A. 1994. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180:1395-1403.
- Casciola-Rosen L., Garcia-Calvo M., Bull H.G., Becker J.W., Hines T., Thornberry N.A., and Rosen A. 2007. Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. *J Biol Chem* 282:4545-4552.
- Cassatella M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16:21-26.
- Castriconi R., Cantoni C., Della Chiesa M., Vitale M., Marcenaro E., Conte R., Biassoni R., Bottino C., Moretta L., and Moretta A. 2003. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4120-4125.
- Caven T.H., Shelburne A., Sato J., Chan-Li Y., Becker S., and Conrad D.H. 2005. IL-21 dependent IgE production in human and mouse in vitro culture systems is cell density and cell division dependent and is augmented by IL-10. *Cell Immunol* 238:123-134.
- Cederarv M., Soderberg-Naucler C., and Odeberg J. 2009. HCMV infection of PDCs deviates the NK cell response into cytokine-producing cells unable to perform cytotoxicity. *Immunobiology* 214:331-341.
- Cella M., Dohring C., Samaridis J., Dessing M., Brockhaus M., Lanzavecchia A., and Colonna M. 1997. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* 185:1743-1751.
- Cella M., Fuchs A., Vermi W., Facchetti F., Otero K., Lennerz J.K., Doherty J.M., Mills J.C., and Colonna M. 2009. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457:722-725.
- Cerwenka A. 2009. New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 206:265-268.
- Chalifour A., Jeannin P., Gauchat J.F., Blaecke A., Malissard M., N'Guyen T., Thieblemont N., and Delneste Y. 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104:1778-1783.
- Chan A., Hong D.L., Atzberger A., Kollnberger S., Filer A.D., Buckley C.D., McMichael A., Enver T., and Bowness P. 2007. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol* 179:89-94.
- Chan C.W., Crafton E., Fan H.N., Flook J., Yoshimura K., Skarica M., Brockstedt D., Dubensky T.W., Stins M.F., Lanier L.L., Pardoll D.M., and Housseau F. 2006. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 12:207-213.
- Chan H.W., Kurago Z.B., Stewart C.A., Wilson M.J., Martin M.P., Mace B.E., Carrington M., Trowsdale J., and Lutz C.T. 2003. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 197:245-255.
- Chang C., Rodriguez A., Carretero M., Lopez-Botet M., Phillips J.H., and Lanier L.L. 1995. Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur J Immunol* 25:2433-2437.
- Charbonnier A.S., Hammad H., Gosset P., Stewart G.A., Alkan S., Tonnel A.B., and Pestel J. 2003. Der p 1-pulsed myeloid and plasmacytoid dendritic cells from house dust mite-sensitized allergic patients dysregulate the T cell response. *J Leukoc Biol* 73:91-99.
- Chavez-Galan L., Arenas-Del Angel M.C., Zenteno E., Chavez R., and Lascurain R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6:15-25.
- Chen A.I., McAdam A.J., Buhlmann J.E., Scott S., Lupper M.L., Jr., Greenfield E.A., Baum P.R., Fanslow W.C., Calderhead D.M., Freeman G.J., and Sharpe A.H. 1999. Ox40-ligand has a critical costimulatory role in dendritic cell:T cell interactions. *Immunity* 11:689-698.

- Chen S., Kawashima H., Lowe J.B., Lanier L.L., and Fukuda M. 2005. Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment. *J Exp Med* 202:1679-1689.
- Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., and Wahl S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- Chen Y., Gao F., Chu F., Peng H., Zong L., Liu Y., Tien P., and Gao G.F. 2009. Crystal structure of myeloid cell activating receptor leukocyte Ig-like receptor A2 (LILRA2/ILT1/LIR-7) domain swapped dimer: molecular basis for its non-binding to MHC complexes. *J Mol Biol* 386:841-853.
- Chen Y., Thai P., Zhao Y.H., Ho Y.S., DeSouza M.M., and Wu R. 2003. Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. *J Biol Chem* 278:17036-17043.
- Chen Z., Tato C.M., Muul L., Laurence A., and O'Shea J.J. 2007. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. *Arthritis Rheum* 56:2936-2946.
- Chen Z.G., Li M., Chen Y.F., Ji J.Z., Li Y.T., Chen W., Chen F.H., and Chen H. 2009. Effects of dermatophagoides pteronyssinus allergen-specific immunotherapy on the serum interleukin-13 and pulmonary functions in asthmatic children. *Chin Med J (Engl)* 122:1157-1161.
- Chensue S.W., Lukacs N.W., Yang T.Y., Shang X., Frait K.A., Kunkel S.L., Kung T., Wiekowski M.T., Hedrick J.A., Cook D.N., Zingoni A., Narula S.K., Zlotnik A., Barrat F.J., O'Garra A., Napolitano M., and Lira S.A. 2001. Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. *J Exp Med* 193:573-584.
- Cheong H.S., Park C.S., Kim L.H., Park B.L., Uh S.T., Kim Y.H., Lym G.I., Lee J.Y., Lee J.K., Kim H.T., Ryu H.J., Han B.G., Kim J.W., Park C., Kimm K., Shin H.D., and Oh B. 2005. CXCR3 polymorphisms associated with risk of asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1219-1225.
- Cherry W.B., Yoon J., Bartemes K.R., Iijima K., and Kita H. 2008. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 121:1484-1490.
- Chewning J.H., Gudme C.N., Hsu K.C., Selvakumar A., and Dupont B. 2007. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179:854-868.
- Chiossone L., Chaix J., Fuseri N., Roth C., Vivier E., and Walzer T. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113:5488-5496.
- Chizzolini C., Chicheportiche R., Alvarez M., de Rham C., Roux-Lombard P., Ferrari-Lacraz S., and Dayer J.M. 2008. Prostaglandin E2 synergistically with interleukin-23 favors human Th17 expansion. *Blood* 112:3696-3703.
- Chou C.C., Huang M.S., Hsieh K.H., and Chiang B.L. 1999. Reduced IL-12 level correlates with decreased IFN-gamma secreting T cells but not natural killer cell activity in asthmatic children. *Ann Allergy Asthma Immunol* 82:479-484.
- Chowdhury D., Beresford P.J., Zhu P., Zhang D., Sung J.S., Demple B., Perrino F.W., and Lieberman J. 2006. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 23:133-142.
- Chowdhury D., and Lieberman J. 2008. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 26:389-420.
- Christodoulopoulos P., Cameron L., Nakamura Y., Lemiere C., Muro S., Dugas M., Boulet L.P., Laviolette M., Olivenstein R., and Hamid Q. 2001. TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol* 107:586-591.
- Chua H.L., Serov Y., and Brahmī Z. 2004. Regulation of FasL expression in natural killer cells. *Hum Immunol* 65:317-327.
- Chung C.D., Kuo F., Kumer J., Motani A.S., Lawrence C.E., Henderson W.R., Jr., and Venkataraman C. 2003. CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *J Immunol* 170:581-587.

- Chvatchko Y., Hoogewerf A.J., Meyer A., Alouani S., Juillard P., Buser R., Conquet F., Proudfoot A.E., Wells T.N., and Power C.A. 2000. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* 191:1755-1764.
- Clark J.M., Abraham W.M., Fishman C.E., Forteza R., Ahmed A., Cortes A., Warne R.L., Moore W.R., and Tanaka R.D. 1995. Tryptase inhibitors block allergen-induced airway and inflammatory responses in allergic sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 152:2076-2083.
- Clarke P., Beckham J.D., Leser J.S., Hoyt C.C., and Tyler K.L. 2009. Fas-mediated apoptotic signaling in the mouse brain following reovirus infection. *J Virol* 83:6161-6170.
- Cleret A., Quesnel-Hellmann A., Vallon-Eberhard A., Verrier B., Jung S., Vidal D., Mathieu J., and Tournier J.N. 2007. Lung dendritic cells rapidly mediate anthrax spore entry through the pulmonary route. *J Immunol* 178:7994-8001.
- Coffman R.L., Seymour B.W., Hudak S., Jackson J., and Rennick D. 1989. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245:308-310.
- Cohn L., Homer R.J., Marinov A., Rankin J., and Bottomly K. 1997. Induction of airway mucus production by T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* 186:1737-1747.
- Cohn L., Homer R.J., Niu N., and Bottomly K. 1999. T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production. *J Exp Med* 190:1309-1318.
- Cohn L., Tepper J.S., and Bottomly K. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* 161:3813-3816.
- Collison L.W., Pillai M.R., Chaturvedi V., and Vignali D.A. 2009. Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* 182:6121-6128.
- Collison L.W., Workman C.J., Kuo T.T., Boyd K., Wang Y., Vignali K.M., Cross R., Sehy D., Blumberg R.S., and Vignali D.A. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
- Colmenero P., Zhang A.L., Qian T., Lu L., Cantor H., Soderstrom K., and Engleman E.G. 2007. Qa-1(b)-dependent modulation of dendritic cell and NK cell cross-talk in vivo. *J Immunol* 179:4608-4615.
- Colonna M., Nakajima H., Navarro F., and Lopez-Botet M. 1999. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 66:375-381.
- Colonna M., Navarro F., Bellon T., Llano M., Garcia P., Samaridis J., Angman L., Cella M., and Lopez-Botet M. 1997. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186:1809-1818.
- Colonna M., Samaridis J., Cella M., Angman L., Allen R.L., O'Callaghan C.A., Dunbar R., Ogg G.S., Cerundolo V., and Rolink A. 1998. Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules. *J Immunol* 160:3096-3100.
- Colucci F., Caligiuri M.A., and Di Santo J.P. 2003. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3:413-425.
- Colucci F., and Di Santo J.P. 2000. The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood* 95:984-991.
- Colucci F., Di Santo J.P., and Leibson P.J. 2002. Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3:807-813.
- Colucci F., Samson S.I., DeKoter R.P., Lantz O., Singh H., and Di Santo J.P. 2001. Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* 97:2625-2632.
- Com-Ruelle L., Crestin B., and Dumesnil S. 2000. L'asthme en France selon les stades de sévérité (Asthma in France by gravity degrees). *CREDES* 25:1-191.
- Conroy D.M., Jopling L.A., Lloyd C.M., Hodge M.R., Andrew D.P., Williams T.J., Pease J.E., and Sabroe I. 2003. CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *J Leukoc Biol* 74:558-563.

- Cooper M.A., Bush J.E., Fehniger T.A., VanDeusen J.B., Waite R.E., Liu Y., Aguila H.L., and Caligiuri M.A. 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 100:3633-3638.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., and Caligiuri M.A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.
- Cooper M.A., Fehniger T.A., Turner S.C., Chen K.S., Ghaheri B.A., Ghayur T., Carson W.E., and Caligiuri M.A. 2001. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97:3146-3151.
- Coquet J.M., Chakravarti S., Smyth M.J., and Godfrey D.I. 2008. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180:7097-7101.
- Correia M.P., Cardoso E.M., Pereira C.F., Neves R., Uhrberg M., and Arosa F.A. 2009. Hepatocytes and IL-15: a favorable microenvironment for T cell survival and CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* 182:6149-6159.
- Corrigan C.J., and Kay A.B. 1990. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 141:970-977.
- Corry D.B., Folkesson H.G., Warnock M.L., Erle D.J., Matthay M.A., Wiener-Kronish J.P., and Locksley R.M. 1996. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 183:109-117.
- Cosman D., Fanger N., Borges L., Kubin M., Chin W., Peterson L., and Hsu M.L. 1997. A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7:273-282.
- Cosman D., Mullberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., and Chalupny N.J. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133.
- Cosmi L., De Palma R., Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., and Annunziato F. 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 205:1903-1916.
- Costello R.T., Sivori S., Marcenaro E., Lafage-Pochitaloff M., Mozziconacci M.J., Reviron D., Gastaut J.A., Pende D., Olive D., and Moretta A. 2002. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 99:3661-3667.
- Costello R.W., Schofield B.H., Kephart G.M., Gleich G.J., Jacoby D.B., and Fryer A.D. 1997. Localization of eosinophils to airway nerves and effect on neuronal M2 muscarinic receptor function. *Am J Physiol* 273:L93-103.
- Cote-Sierra J., Foucras G., Guo L., Chiodetti L., Young H.A., Hu-Li J., Zhu J., and Paul W.E. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3880-3885.
- Croft M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3:609-620.
- Crowe N.Y., Coquet J.M., Berzins S.P., Kyparissoudis K., Keating R., Pellicci D.G., Hayakawa Y., Godfrey D.I., and Smyth M.J. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* 202:1279-1288.
- Cullen S.P., Adrain C., Luthi A.U., Duriez P.J., and Martin S.J. 2007. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J Cell Biol* 176:435-444.
- Cupedo T., Nagasawa M., Weijer K., Blom B., and Spits H. 2005. Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *Eur J Immunol* 35:383-390.
- Curti A., Trabanelli S., Salvestrini V., Baccarani M., and Lemoli R.M. 2009. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood* 113:2394-2401.

- Cyphert J.M., Kovarova M., Allen I.C., Hartney J.M., Murphy D.L., Wess J., and Koller B.H. 2009. Cooperation between mast cells and neurons is essential for antigen-mediated bronchoconstriction. *J Immunol* 182:7430-7439.
- Cyster J.G. 2005. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23:127-159.

D

- D'Ambrosio D., Iellem A., Bonecchi R., Mazzeo D., Sozzani S., Mantovani A., and Sinigaglia F. 1998. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol* 161:5111-5115.
- da Silva A.P., Unks D., Lyu S.C., Ma J., Zbozien-Pacamaj R., Chen X., Krensky A.M., and Clayberger C. 2008. In vitro and in vivo antimicrobial activity of granulysin-derived peptides against *Vibrio cholerae*. *J Antimicrob Chemother* 61:1103-1109.
- Dabbagh K., Takeyama K., Lee H.M., Ueki I.F., Lausier J.A., and Nadel J.A. 1999. IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:6233-6237.
- Daffern P.J., Pfeifer P.H., Ember J.A., and Hugli T.E. 1995. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J Exp Med* 181:2119-2127.
- Dalbeth N., Gundle R., Davies R.J., Lee Y.C., McMichael A.J., and Callan M.F. 2004. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol* 173:6418-6426.
- Darcanc-Nicolaisen Y., Meinicke H., Fels G., Hegend O., Haberland A., Kuhl A., Loddenkemper C., Witzentrath M., Kube S., Henke W., and Hamelmann E. 2009. Small interfering RNA against transcription factor STAT6 inhibits allergic airway inflammation and hyperreactivity in mice. *J Immunol* 182:7501-7508.
- Darmon A.J., Nicholson D.W., and Bleackley R.C. 1995. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377:446-448.
- Dauer M., Obermaier B., Herten J., Haerle C., Pohl K., Rothenfusser S., Schnurr M., Endres S., and Eigler A. 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 170:4069-4076.
- de Andres B., del Pozo V., Martin E., Palomino P., and Lahoz C. 1990. Release of O₂- and LTC₄ by murine eosinophils: role of intra- and extracellular calcium. *Immunology* 69:271-276.
- de Heer H.J., Hammad H., Soullie T., Hijdra D., Vos N., Willart M.A., Hoogsteden H.C., and Lambrecht B.N. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200:89-98.
- de Jong E.C., Vieira P.L., Kalinski P., Schuitemaker J.H., Tanaka Y., Wierenga E.A., Yazdanbakhsh M., and Kapsenberg M.L. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 168:1704-1709.
- de Nadai P., Charbonnier A.S., Chenivresse C., Senechal S., Fournier C., Gilet J., Vorng H., Chang Y., Gosset P., Wallaert B., Tonnel A.B., Lassalle P., and Tsicopoulos A. 2006. Involvement of CCL18 in allergic asthma. *J Immunol* 176:6286-6293.
- de Vries J.E. 1998. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. *J Allergy Clin Immunol* 102:165-169.
- de Waal Malefyt R., Abrams J.S., Zurawski S.M., Lecron J.C., Mohan-Peterson S., Sanjanwala B., Bennett B., Silver J., de Vries J.E., and Yssel H. 1995. Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 T cell clones and EBV-transformed B cells. *Int Immunol* 7:1405-1416.

- Degli-Esposti M. 1999. To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors. *J Leukoc Biol* 65:535-542.
- Degli-Esposti M.A., and Smyth M.J. 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 5:112-124.
- Del Prete G., De Carli M., Almerigogna F., Giudizi M.G., Biagiotti R., and Romagnani S. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150:353-360.
- del Rio M.L., Rodriguez-Barbosa J.I., Kremmer E., and Forster R. 2007. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178:6861-6866.
- Delfino R.J. 2002. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 4:573-589.
- Della Chiesa M., Romagnani C., Thiel A., Moretta L., and Moretta A. 2006. Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses. *Blood* 108:3851-3858.
- Della Chiesa M., Vitale M., Carlomagno S., Ferlazzo G., Moretta L., and Moretta A. 2003. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33:1657-1666.
- Demedts I.K., Brusselle G.G., Vermaelen K.Y., and Pauwels R.A. 2005. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:177-184.
- Denburg J.A., Woolley M., Leber B., Linden M., and O'Byrne P. 1994. Basophil and eosinophil differentiation in allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 94:1135-1141.
- Deng A., Chen S., Li Q., Lyu S.C., Clayberger C., and Krensky A.M. 2005. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator. *J Immunol* 174:5243-5248.
- Deniz G., Akdis M., Aktas E., Blaser K., and Akdis C.A. 2002. Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells. *Eur J Immunol* 32:879-884.
- Deniz G., Erten G., Kucuksezer U.C., Kocacik D., Karagiannidis C., Aktas E., Akdis C.A., and Akdis M. 2008. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 180:850-857.
- Denoroy M.C., Yodoi J., and Banchereau J. 1990. Interleukin 4 and interferons alpha and gamma regulate Fc epsilon R2/CD23 mRNA expression on normal human B cells. *Mol Immunol* 27:129-134.
- Denzler K.L., Borchers M.T., Crosby J.R., Cieslewicz G., Hines E.M., Justice J.P., Cormier S.A., Lindenberger K.A., Song W., Wu W., Hazen S.L., Gleich G.J., Lee J.J., and Lee N.A. 2001. Extensive eosinophil degranulation and peroxidase-mediated oxidation of airway proteins do not occur in a mouse ovalbumin-challenge model of pulmonary inflammation. *J Immunol* 167:1672-1682.
- Denzler K.L., Farmer S.C., Crosby J.R., Borchers M., Cieslewicz G., Larson K.A., Cormier-Regard S., Lee N.A., and Lee J.J. 2000. Eosinophil major basic protein-1 does not contribute to allergen-induced airway pathologies in mouse models of asthma. *J Immunol* 165:5509-5517.
- Devalia J.L., Bayram H., Abdelaziz M.M., Sapsford R.J., and Davies R.J. 1999. Differences between cytokine release from bronchial epithelial cells of asthmatic patients and non-asthmatic subjects: effect of exposure to diesel exhaust particles. *Int Arch Allergy Immunol* 118:437-439.
- Devouassoux G., Metcalfe D.D., and Prussin C. 1999. Eotaxin potentiates antigen-dependent basophil IL-4 production. *J Immunol* 163:2877-2882.
- Di Lorenzo G., Esposito Pellitteri M., Drago A., Di Blasi P., Candore G., Balistreri C., Listi F., and Caruso C. 2001. Effects of in vitro treatment with fluticasone propionate on natural killer and lymphokine-induced killer activity in asthmatic and healthy individuals. *Allergy* 56:323-327.

- Di Santo J.P. 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 24:257-286.
- Di Santo J.P., and Vosshenrich C.A. 2006. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev* 214:35-46.
- Dieckmann D., Plottner H., Berchtold S., Berger T., and Schuler G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-1310.
- Diefenbach A., Tomasello E., Lucas M., Jamieson A.M., Hsia J.K., Vivier E., and Raulet D.H. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3:1142-1149.
- Dinarello C.A. 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519-550.
- DiScipio R.G., Daffern P.J., Jagels M.A., Broide D.H., and Sriramarao P. 1999. A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol* 162:1127-1136.
- Djuretic I.M., Levanon D., Negreanu V., Groner Y., Rao A., and Ansel K.M. 2007. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 8:145-153.
- Dodge I.L., Carr M.W., Cernadas M., and Brenner M.B. 2003. IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. *J Immunol* 170:4457-4464.
- Doganci A., Eigenbrod T., Krug N., De Sanctis G.T., Hausding M., Erpenbeck V.J., Haddad el B., Lehr H.A., Schmitt E., Bopp T., Kallen K.J., Herz U., Schmitt S., Luft C., Hecht O., Hohlfeld J.M., Ito H., Nishimoto N., Yoshizaki K., Kishimoto T., Rose-John S., Renz H., Neurath M.F., Galle P.R., and Finotto S. 2005. The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *J Clin Invest* 115:313-325.
- Dohring C., Scheidegger D., Samaridis J., Cella M., and Colonna M. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156:3098-3101.
- Dong Q., Louahed J., Vink A., Sullivan C.D., Messler C.J., Zhou Y., Haczku A., Huaux F., Arras M., Holroyd K.J., Renaud J.C., Levitt R.C., and Nicolaidis N.C. 1999. IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice. *Eur J Immunol* 29:2130-2139.
- Dorner B.G., Scheffold A., Rolph M.S., Huser M.B., Kaufmann S.H., Radbruch A., Flesch I.E., and Kroczeck R.A. 2002. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6181-6186.
- Dorner B.G., Smith H.R., French A.R., Kim S., Poursine-Laurent J., Beckman D.L., Pingel J.T., Kroczeck R.A., and Yokoyama W.M. 2004. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol* 172:3119-3131.
- Dragon S., Rahman M.S., Yang J., Unruh H., Halayko A.J., and Gounni A.S. 2007. IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1023-1029.
- Duan W., Chan J.H., McKay K., Crosby J.R., Choo H.H., Leung B.P., Karras J.G., and Wong W.S. 2005. Inhaled p38alpha mitogen-activated protein kinase antisense oligonucleotide attenuates asthma in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:571-578.
- Dubois S., Mariner J., Waldmann T.A., and Tagaya Y. 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* 17:537-547.
- Duez C., Dakhama A., Tomkinson A., Marquillies P., Balhorn A., Tonnel A.B., Bratton D.L., and Gelfand E.W. 2004. Migration and accumulation of eosinophils toward regional lymph nodes after airway allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 114:820-825.
- Dugas B., Renaud J.C., Pene J., Bonnefoy J.Y., Peti-Frere C., Braquet P., Bousquet J., Van Snick J., and Mencia-Huerta J.M. 1993. Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 23:1687-1692.

Duluc D., Tan F., Scotet M., Blanchard S., Fremaux I., Garo E., Horvat B., Eid P., Delneste Y., and Jeannin P. 2009. PolyI:C plus IL-2 or IL-12 induce IFN-gamma production by human NK cells via autocrine IFN-beta. *Eur J Immunol* 39:2877-2884.

E

Eagle R.A., Traherne J.A., Hair J.R., Jafferji I., and Trowsdale J. 2009. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol*.

Elgueta R., Benson M.J., de Vries V.C., Wasiuk A., Guo Y., and Noelle R.J. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229:152-172.

Elias J.A., Wu Y., Zheng T., and Panettieri R. 1997. Cytokine- and virus-stimulated airway smooth muscle cells produce IL-11 and other IL-6-type cytokines. *Am J Physiol* 273:L648-655.

Elias J.A., Zheng T., Einarsson O., Landry M., Trow T., Rebert N., and Panuska J. 1994. Epithelial interleukin-11. Regulation by cytokines, respiratory syncytial virus, and retinoic acid. *J Biol Chem* 269:22261-22268.

Elias J.A., Zheng T., Whiting N.L., Trow T.K., Merrill W.W., Zitnik R., Ray P., and Alderman E.M. 1994. IL-1 and transforming growth factor-beta regulation of fibroblast-derived IL-11. *J Immunol* 152:2421-2429.

Elsner J., Petering H., Kluthe C., Kimmig D., Smolarski R., Ponath P., and Kapp A. 1998. Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils. *Eur J Immunol* 28:2152-2158.

Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., and Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.

Esin S., Batoni G., Counoupas C., Stringaro A., Brancatisano F.L., Colone M., Maisetta G., Florio W., Arancia G., and Campa M. 2008. Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* 76:1719-1727.

F

Falschlehner C., Schaefer U., and Walczak H. 2009. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127:145-154.

Fan Z., Beresford P.J., Oh D.Y., Zhang D., and Lieberman J. 2003. Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112:659-672.

Fan Z., Beresford P.J., Zhang D., and Lieberman J. 2002. HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol* 22:2810-2820.

Fan Z., Beresford P.J., Zhang D., Xu Z., Novina C.D., Yoshida A., Pommier Y., and Lieberman J. 2003. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 4:145-153.

Fanger N.A., Cosman D., Peterson L., Braddy S.C., Maliszewski C.R., and Borges L. 1998. The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes. *Eur J Immunol* 28:3423-3434.

Farkas L., Kvale E.O., Johansen F.E., Jahnsen F.L., and Lund-Johansen F. 2004. Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2 memory cells: modulation by CpG oligodeoxynucleotides. *J Allergy Clin Immunol* 114:436-443.

Faure M., and Long E.O. 2002. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168:6208-6214.

- Fauriat C., Moretta A., Olive D., and Costello R.T. 2005. Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients. *Blood* 106:2186-2188.
- Fehniger T.A., Cooper M.A., Nuovo G.J., Cella M., Facchetti F., Colonna M., and Caligiuri M.A. 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052-3057.
- Fehniger T.A., Herbein G., Yu H., Para M.I., Bernstein Z.P., O'Brien W.A., and Caligiuri M.A. 1998. Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 161:6433-6438.
- Fehniger T.A., Shah M.H., Turner M.J., VanDeusen J.B., Whitman S.P., Cooper M.A., Suzuki K., Wechsler M., Goodsaid F., and Caligiuri M.A. 1999. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162:4511-4520.
- Fellows E., Gil-Parrado S., Jenne D.E., and Kurschus F.C. 2007. Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood* 110:544-552.
- Feltis B.N., Reid D.W., Ward C., and Walters E.H. 2004. BAL eotaxin and IL-5 in asthma, and the effects of inhaled corticosteroid and beta2 agonist. *Respirology* 9:507-513.
- Ferlazzo G., Pack M., Thomas D., Paludan C., Schmid D., Strowig T., Bougras G., Muller W.A., Moretta L., and Munz C. 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16606-16611.
- Ferlazzo G., Semino C., and Melioli G. 2001. HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis. *Immunol Lett* 76:37-41.
- Ferlazzo G., Thomas D., Lin S.L., Goodman K., Morandi B., Muller W.A., Moretta A., and Munz C. 2004. The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* 172:1455-1462.
- Ferlazzo G., Tsang M.L., Moretta L., Melioli G., Steinman R.M., and Munz C. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351.
- Fernandez E.J., and Lolis E. 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:469-499.
- Fernandez N.C., Treiner E., Vance R.E., Jamieson A.M., Lemieux S., and Raulet D.H. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105:4416-4423.
- Ferrara G., Bleck B., Richeldi L., Reibman J., Fabbri L.M., Rom W.N., and Condos R. 2008. Mycobacterium tuberculosis induces CCL18 expression in human macrophages. *Scand J Immunol* 68:668-674.
- Finkelman F.D., Morris S.C., Orekhova T., Mori M., Donaldson D., Reiner S.L., Reilly N.L., Schopf L., and Urban J.F., Jr. 2000. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 164:2303-2310.
- Finotto S., De Sanctis G.T., Lehr H.A., Herz U., Buerke M., Schipp M., Bartsch B., Atreya R., Schmitt E., Galle P.R., Renz H., and Neurath M.F. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med* 193:1247-1260.
- Finotto S., Neurath M.F., Glickman J.N., Qin S., Lehr H.A., Green F.H., Ackerman K., Haley K., Galle P.R., Szabo S.J., Drazen J.M., De Sanctis G.T., and Glimcher L.H. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295:336-338.
- Fitzpatrick A.M., Holguin F., Teague W.G., and Brown L.A. 2008. Alveolar macrophage phagocytosis is impaired in children with poorly controlled asthma. *J Allergy Clin Immunol* 121:1372-1378, 1378 e1371-1373.

- Flood-Page P., Menzies-Gow A., Phipps S., Ying S., Wangoo A., Ludwig M.S., Barnes N., Robinson D., and Kay A.B. 2003. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 112:1029-1036.
- Flood-Page P.T., Menzies-Gow A.N., Kay A.B., and Robinson D.S. 2003. Eosinophil's role remains uncertain as anti-interleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med* 167:199-204.
- Foley B., De Santis D., Lathbury L., Christiansen F., and Witt C. 2008. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol* 20:555-563.
- Fontenot J.D., Gavin M.A., and Rudensky A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Ford-Hutchinson A.W., Bray M.A., Doig M.V., Shipley M.E., and Smith M.J. 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286:264-265.
- Fort M.M., Cheung J., Yen D., Li J., Zurawski S.M., Lo S., Menon S., Clifford T., Hunte B., Lesley R., Muchamuel T., Hurst S.D., Zurawski G., Leach M.W., Gorman D.M., and Rennick D.M. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15:985-995.
- Foster P.S., Hogan S.P., Ramsay A.J., Matthaei K.I., and Young I.G. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183:195-201.
- Fox A.J., Patel H.J., Barnes P.J., and Belvisi M.G. 2001. Release of nerve growth factor by human pulmonary epithelial cells: role in airway inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 424:159-162.
- Freud A.G., Becknell B., Roychowdhury S., Mao H.C., Ferketich A.K., Nuovo G.J., Hughes T.L., Marburger T.B., Sung J., Baiocchi R.A., Guimond M., and Caligiuri M.A. 2005. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity* 22:295-304.
- Freud A.G., and Caligiuri M.A. 2006. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214:56-72.
- Freud A.G., Yokohama A., Becknell B., Lee M.T., Mao H.C., Ferketich A.K., and Caligiuri M.A. 2006. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203:1033-1043.
- Freund V., Pons F., Joly V., Mathieu E., Martinet N., and Frossard N. 2002. Upregulation of nerve growth factor expression by human airway smooth muscle cells in inflammatory conditions. *Eur Respir J* 20:458-463.
- Frey M., Packianathan N.B., Fehniger T.A., Ross M.E., Wang W.C., Stewart C.C., Caligiuri M.A., and Evans S.S. 1998. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol* 161:400-408.
- Frossard N., Naline E., Olgart Hoglund C., Georges O., and Advenier C. 2005. Nerve growth factor is released by IL-1beta and induces hyperresponsiveness of the human isolated bronchus. *Eur Respir J* 26:15-20.
- Fry A.M., Lanier L.L., and Weiss A. 1996. Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* 184:295-300.
- Fujisawa T., Kato Y., Nagase H., Atsuta J., Terada A., Iguchi K., Kamiya H., Morita Y., Kitaura M., Kawasaki H., Yoshie O., and Hirai K. 2000. Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol* 106:507-513.
- Fujisawa T., Kato Y., Terada A., Iguchi K., and Kamiya H. 1999. Matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 120 Suppl 1:65-69.
- Fukuda M. 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 266:21327-21330.

- Fulkerson P.C., Fischetti C.A., McBride M.L., Hassman L.M., Hogan S.P., and Rothenberg M.E. 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* 103:16418-16423.
- Fuller R.W., Morris P.K., Richmond R., Sykes D., Varndell I.M., Kemeny D.M., Cole P.J., Dollery C.T., and MacDermot J. 1986. Immunoglobulin E-dependent stimulation of human alveolar macrophages: significance in type 1 hypersensitivity. *Clin Exp Immunol* 65:416-426.
- Furukawa H., Iizuka K., Poursine-Laurent J., Shastri N., and Yokoyama W.M. 2002. A ligand for the murine NK activation receptor Ly-49D: activation of tolerized NK cells from beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Immunol* 169:126-136.

G

- Gallagher G., Eskdale J., Jordan W., Peat J., Campbell J., Boniotto M., Lennon G.P., Dickensheets H., and Donnelly R.P. 2004. Human interleukin-19 and its receptor: a potential role in the induction of Th2 responses. *Int Immunopharmacol* 4:615-626.
- Galli S.J., and Franco C.B. 2008. Basophils are back! *Immunity* 28:495-497.
- Galli S.J., Tsai M., and Piliponsky A.M. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
- Gamen S., Hanson D.A., Kaspar A., Naval J., Krensky A.M., and Anel A. 1998. Granulysin-induced apoptosis. I. Involvement of at least two distinct pathways. *J Immunol* 161:1758-1764.
- Garrod K.R., Wei S.H., Parker I., and Cahalan M.D. 2007. Natural killer cells actively patrol peripheral lymph nodes forming stable conjugates to eliminate MHC-mismatched targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12081-12086.
- Garton K.J., Gough P.J., Blobel C.P., Murphy G., Greaves D.R., Dempsey P.J., and Raines E.W. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 276:37993-38001.
- Gascan H., Gauchat J.F., Aversa G., Van Vlasselaer P., and de Vries J.E. 1991. Anti-CD40 monoclonal antibodies or CD4+ T cell clones and IL-4 induce IgG4 and IgE switching in purified human B cells via different signaling pathways. *J Immunol* 147:8-13.
- Gascan H., Gauchat J.F., Roncarolo M.G., Yssel H., Spits H., and de Vries J.E. 1991. Human B cell clones can be induced to proliferate and to switch to IgE and IgG4 synthesis by interleukin 4 and a signal provided by activated CD4+ T cell clones. *J Exp Med* 173:747-750.
- Gascoyne D.M., Long E., Veiga-Fernandes H., de Boer J., Williams O., Seddon B., Coles M., Kioussis D., and Brady H.J. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* 10:1118-1124.
- Gasperini S., Marchi M., Calzetti F., Laudanna C., Vicentini L., Olsen H., Murphy M., Liao F., Farber J., and Cassatella M.A. 1999. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162:4928-4937.
- Gauvreau G.M., Lee J.M., Watson R.M., Irani A.M., Schwartz L.B., and O'Byrne P.M. 2000. Increased numbers of both airway basophils and mast cells in sputum after allergen inhalation challenge of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1473-1478.
- Gavett S.H., O'Hearn D.J., Li X., Huang S.K., Finkelman F.D., and Wills-Karp M. 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 182:1527-1536.
- Gerosa F., Baldani-Guerra B., Nisii C., Marchesini V., Carra G., and Trinchieri G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333.
- Gerosa F., Gobbi A., Zorzi P., Burg S., Briere F., Carra G., and Trinchieri G. 2005. The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* 174:727-734.

- Ghiringhelli F., Menard C., Terme M., Flament C., Taieb J., Chaput N., Puig P.E., Novault S., Escudier B., Vivier E., Lecesne A., Robert C., Blay J.Y., Bernard J., Caillat-Zucman S., Freitas A., Tursz T., Wagner-Ballon O., Capron C., Vainchencker W., Martin F., and Zitvogel L. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202:1075-1085.
- Giancarlo B., Silvano S., Albert Z., Mantovani A., and Allavena P. 1996. Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur J Immunol* 26:3238-3241.
- Gibson P.G., Simpson J.L., and Saltos N. 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119:1329-1336.
- Gilchrest H., Cheewatrakoolpong B., Billah M., Egan R.W., Anthes J.C., and Greenfeder S. 2003. Human cord blood-derived mast cells synthesize and release I-309 in response to IgE. *Life Sci* 73:2571-2581.
- Gilliet M., Soumelis V., Watanabe N., Hanabuchi S., Antonenko S., de Waal-Malefyt R., and Liu Y.J. 2003. Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T cells. *J Exp Med* 197:1059-1063.
- Girart M.V., Fuertes M.B., Domaica C.I., Rossi L.E., and Zwirner N.W. 2007. Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol* 179:3472-3479.
- Giroux M., Yurchenko E., St-Pierre J., Piccirillo C.A., and Perreault C. 2007. T regulatory cells control numbers of NK cells and CD8alpha+ immature dendritic cells in the lymph node paracortex. *J Immunol* 179:4492-4502.
- Gismondi A., Jacobelli J., Mainiero F., Paolini R., Piccoli M., Frati L., and Santoni A. 2000. Cutting edge: functional role for proline-rich tyrosine kinase 2 in NK cell-mediated natural cytotoxicity. *J Immunol* 164:2272-2276.
- Gleich G.J., and Adolphson C.R. 1986. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol* 39:177-253.
- Golden D.B. 2007. What is anaphylaxis? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 7:331-336.
- Goldstein I.M., Malmsten C.L., Kindahl H., Kaplan H.B., Radmark O., Samuelsson B., and Weissmann G. 1978. Thromboxane generation by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 148:787-792.
- Gonzalo J.A., Lloyd C.M., Peled A., Delaney T., Coyle A.J., and Gutierrez-Ramos J.C. 2000. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol* 165:499-508.
- Gonzalo J.A., Lloyd C.M., Wen D., Albar J.P., Wells T.N., Proudfoot A., Martinez A.C., Dorf M., Bjerke T., Coyle A.J., and Gutierrez-Ramos J.C. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 188:157-167.
- Gonzalo J.A., Pan Y., Lloyd C.M., Jia G.Q., Yu G., Dussault B., Powers C.A., Proudfoot A.E., Coyle A.J., Gearing D., and Gutierrez-Ramos J.C. 1999. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 163:403-411.
- Gonzalo J.A., Qiu Y., Lora J.M., Al-Garawi A., Villeval J.L., Boyce J.A., Martinez A.C., Marquez G., Goya I., Hamid Q., Fraser C.C., Picarella D., Cote-Sierra J., Hodge M.R., Gutierrez-Ramos J.C., Kolbeck R., and Coyle A.J. 2007. Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis. *J Immunol* 179:1740-1750.
- Gordon J.R., and Galli S.J. 1990. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-alpha/cachectin. *Nature* 346:274-276.
- Gosset P., Bureau F., Angeli V., Pichavant M., Faveeuw C., Tonnel A.B., and Trottein F. 2003. Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J Immunol* 170:4943-4952.

- Gosset P., Tillie-Leblond I., Oudin S., Parmentier O., Wallaert B., Joseph M., and Tonnel A.B. 1999. Production of chemokines and proinflammatory and antiinflammatory cytokines by human alveolar macrophages activated by IgE receptors. *J Allergy Clin Immunol* 103:289-297.
- Gosset P., Tscopoulos A., Wallaert B., Joseph M., Capron A., and Tonnel A.B. 1992. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis* 146:768-774.
- Gough P.J., Garton K.J., Wille P.T., Rychlewski M., Dempsey P.J., and Raines E.W. 2004. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 172:3678-3685.
- Gould H.J., and Sutton B.J. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8:205-217.
- Gounni A.S., Gregory B., Nutku E., Aris F., Latifa K., Minshall E., North J., Tavernier J., Levit R., Nicolaidis N., Robinson D., and Hamid Q. 2000. Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. *Blood* 96:2163-2171.
- Gounni A.S., Lamkhouioued B., Ochiai K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron A., Kinet J.P., and Capron M. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367:183-186.
- Goya I., Villares R., Zaballos A., Gutierrez J., Kremer L., Gonzalo J.A., Varona R., Carramolino L., Serrano A., Pallares P., Criado L.M., Kolbeck R., Torres M., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Martinez A.C., and Marquez G. 2003. Absence of CCR8 does not impair the response to ovalbumin-induced allergic airway disease. *J Immunol* 170:2138-2146.
- Gramaglia I., Jember A., Pippig S.D., Weinberg A.D., Killeen N., and Croft M. 2000. The OX40 costimulatory receptor determines the development of CD4 memory by regulating primary clonal expansion. *J Immunol* 165:3043-3050.
- Gregoire C., Chasson L., Luci C., Tomasello E., Geissmann F., Vivier E., and Walzer T. 2007. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220:169-182.
- Gregoire C., Cagnet C., Chasson L., Coupet C.A., Dalod M., Reboldi A., Marvel J., Sallusto F., Vivier E., and Walzer T. 2008. Intrasplenic trafficking of natural killer cells is redirected by chemokines upon inflammation. *Eur J Immunol* 38:2076-2084.
- Gregori S., Magnani C.F., and Roncarolo M.G. 2009. Role of human leukocyte antigen-G in the induction of adaptive type 1 regulatory T cells. *Hum Immunol*.
- Gri G., Piconese S., Frossi B., Manfredi V., Merluzzi S., Tripodo C., Viola A., Odom S., Rivera J., Colombo M.P., and Pucillo C.E. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 29:771-781.
- Grindebacke H., Wing K., Andersson A.C., Suri-Payer E., Rak S., and Rudin A. 2004. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season. *Clin Exp Allergy* 34:1364-1372.
- Grohmann U., Volpi C., Fallarino F., Bozza S., Bianchi R., Vacca C., Orabona C., Belladonna M.L., Ayroldi E., Nocentini G., Boon L., Bistoni F., Fioretti M.C., Romani L., Riccardi C., and Puccetti P. 2007. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* 13:579-586.
- Grossman W.J., Verbsky J.W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., and Ley T.J. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21:589-601.
- Grossman W.J., Verbsky J.W., Tollefsen B.L., Kemper C., Atkinson J.P., and Ley T.J. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840-2848.
- Groux H., O'Garra A., Bigler M., Rouleau M., Antonenko S., de Vries J.E., and Roncarolo M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Groux H., Sornasse T., Cottrez F., de Vries J.E., Coffman R.L., Roncarolo M.G., and Yssel H. 1997. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol* 158:5627-5631.

- Grunig G., Warnock M., Wakil A.E., Venkayya R., Brombacher F., Rennick D.M., Sheppard D., Mohrs M., Donaldson D.D., Locksley R.M., and Corry D.B. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282:2261-2263.
- Grunstein M.M., Hakonarson H., Leiter J., Chen M., Whelan R., Grunstein J.S., and Chuang S. 2002. IL-13-dependent autocrine signaling mediates altered responsiveness of IgE-sensitized airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L520-528.
- Gu Y., Kuida K., Tsutsui H., Ku G., Hsiao K., Fleming M.A., Hayashi N., Higashino K., Okamura H., Nakanishi K., Kurimoto M., Tanimoto T., Flavell R.A., Sato V., Harding M.W., Livingston D.J., and Su M.S. 1997. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275:206-209.
- Guan P., Burghes A.H., Cunningham A., Lira P., Brissette W.H., Neote K., and McColl S.R. 1999. Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18. *Genomics* 56:296-302.
- Guarda G., Hons M., Soriano S.F., Huang A.Y., Polley R., Martin-Fontecha A., Stein J.V., Germain R.N., Lanzavecchia A., and Sallusto F. 2007. L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol* 8:743-752.
- Gubler U., Chua A.O., Schoenhaut D.S., Dwyer C.M., McComas W., Motyka R., Nabavi N., Wolitzky A.G., Quinn P.M., Familletti P.C., and et al. 1991. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4143-4147.
- Gumperz J.E., Litwin V., Phillips J.H., Lanier L.L., and Parham P. 1995. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 181:1133-1144.
- Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T., and Brenner M.B. 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195:625-636.
- Gunn M.D., Tangemann K., Tam C., Cyster J.G., Rosen S.D., and Williams L.T. 1998. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:258-263.
- Gunther C., Bello-Fernandez C., Kopp T., Kund J., Carballido-Perrig N., Hinteregger S., Fassel S., Schwarzler C., Lametschwandtner G., Stingl G., Biedermann T., and Carballido J.M. 2005. CCL18 is expressed in atopic dermatitis and mediates skin homing of human memory T cells. *J Immunol* 174:1723-1728.

H

- Hachem P., Lisbonne M., Michel M.L., Diem S., Roongapinun S., Lefort J., Marchal G., Herbelin A., Askenase P.W., Dy M., and Leite-de-Moraes M.C. 2005. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* 35:2793-2802.
- Hadeiba H., and Locksley R.M. 2003. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J Immunol* 170:5502-5510.
- Haller O., and Wigzell H. 1977. Suppression of natural killer cell activity with radioactive strontium: effector cells are marrow dependent. *J Immunol* 118:1503-1506.
- Hamid Q., and Tulic M. 2009. Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 71:489-507.
- Hamid Q., Tulic M.K., Liu M.C., and Moqbel R. 2003. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol* 111:S5-S12; discussion S12-17.
- Hammad H., Charbonnier A.S., Duez C., Jacquet A., Stewart G.A., Tonnel A.B., and Pestel J. 2001. Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 98:1135-1141.

- Hammad H., and Lambrecht B.N. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8:193-204.
- Hamzaoui A., Rouhou S.C., Grairi H., Abid H., Ammar J., Chelbi H., and Hamzaoui K. 2006. NKT cells in the induced sputum of severe asthmatics. *Mediators Inflamm* 2006:71214.
- Handzel Z.T., Busse W.W., Sedgwick J.B., Vrtis R., Lee W.M., Kelly E.A., and Gern J.E. 1998. Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells. *J Immunol* 160:1279-1284.
- Hanke T., Takizawa H., McMahon C.W., Busch D.H., Pamer E.G., Miller J.D., Altman J.D., Liu Y., Cado D., Lemonnier F.A., Bjorkman P.J., and Raulet D.H. 1999. Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors. *Immunity* 11:67-77.
- Hansasuta P., Dong T., Thananchai H., Weekes M., Willberg C., Aldemir H., Rowland-Jones S., and Braud V.M. 2004. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol* 34:1673-1679.
- Hansel T.T., Braunstein J.B., Walker C., Blaser K., Bruijnzeel P.L., Virchow J.C., Jr., and Virchow C., Sr. 1991. Sputum eosinophils from asthmatics express ICAM-1 and HLA-DR. *Clin Exp Immunol* 86:271-277.
- Hansen G., Berry G., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103:175-183.
- Hanson D.A., Kaspar A.A., Poulain F.R., and Krensky A.M. 1999. Biosynthesis of granulysin, a novel cytolytic molecule. *Mol Immunol* 36:413-422.
- Haque N.S., Fallon J.T., Pan J.J., Taubman M.B., and Harpel P.C. 2004. Chemokine receptor-8 (CCR8) mediates human vascular smooth muscle cell chemotaxis and metalloproteinase-2 secretion. *Blood* 103:1296-1304.
- Haque N.S., Zhang X., French D.L., Li J., Poon M., Fallon J.T., Gabel B.R., Taubman M.B., Koschinsky M., and Harpel P.C. 2000. CC chemokine I-309 is the principal monocyte chemoattractant induced by apolipoprotein(a) in human vascular endothelial cells. *Circulation* 102:786-792.
- Hargreaves D.C., Hyman P.L., Lu T.T., Ngo V.N., Bidgol A., Suzuki G., Zou Y.R., Littman D.R., and Cyster J.G. 2001. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194:45-56.
- Harris T.J., Grosso J.F., Yen H.R., Xin H., Kortylewski M., Albesiano E., Hipkiss E.L., Getnet D., Goldberg M.V., Maris C.H., Housseau F., Yu H., Pardoll D.M., and Drake C.G. 2007. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 179:4313-4317.
- Hart O.M., Athie-Morales V., O'Connor G.M., and Gardiner C.M. 2005. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 175:1636-1642.
- Hartl D., Koller B., Mehlhorn A.T., Reinhardt D., Nicolai T., Schendel D.J., Griese M., and Krauss-Etschmann S. 2007. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119:1258-1266.
- Hashimoto T., Akiyama K., Kobayashi N., and Mori A. 2005. Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 137 Suppl 1:51-54.
- Hawrylowicz C.M., and O'Garra A. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5:271-283.
- Hayakawa Y., and Smyth M.J. 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 176:1517-1524.
- He Y.W., and Malek T.R. 1996. Interleukin-7 receptor alpha is essential for the development of gamma delta + T cells, but not natural killer cells. *J Exp Med* 184:289-293.
- Hecht M.L., Rosental B., Horlacher T., Herschkovitz O., De Paz J.L., Noti C., Schauer S., Porgador A., and Seeberger P.H. 2009. Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res* 8:712-720.

- Hedrick J.A., Saylor V., Figueroa D., Mizoue L., Xu Y., Menon S., Abrams J., Handel T., and Zlotnik A. 1997. Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* 158:1533-1540.
- Hedrick J.A., and Zlotnik A. 1997. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol* 159:1589-1593.
- Heibei J.A., Goping I.S., Barry M., Pinkoski M.J., Shore G.C., Green D.R., and Bleackley R.C. 2000. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bcl-2 and bcl-xL. *J Exp Med* 192:1391-1402.
- Heiman A.S., Abonyo B.O., Darling-Reed S.F., and Alexander M.S. 2005. Cytokine-stimulated human lung alveolar epithelial cells release eotaxin-2 (CCL24) and eotaxin-3 (CCL26). *J Interferon Cytokine Res* 25:82-91.
- Henderson W.R., Harley J.B., and Fauci A.S. 1984. Arachidonic acid metabolism in normal and hypereosinophilic syndrome human eosinophils: generation of leukotrienes B₄, C₄, D₄ and 15-lipoxygenase products. *Immunology* 51:679-686.
- Henderson W.R., Jr., Chi E.Y., and Maliszewski C.R. 2000. Soluble IL-4 receptor inhibits airway inflammation following allergen challenge in a mouse model of asthma. *J Immunol* 164:1086-1095.
- Hennes S., Johnson C.K., Ge Q., Armour C.L., Hughes J.M., and Ammit A.J. 2004. IL-17A augments TNF-alpha-induced IL-6 expression in airway smooth muscle by enhancing mRNA stability. *J Allergy Clin Immunol* 114:958-964.
- Hershkovitz O., Jivov S., Bloushtain N., Zilka A., Landau G., Bar-Ilan A., Lichtenstein R.G., Campbell K.S., van Kuppevelt T.H., and Porgador A. 2007. Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 46:7426-7436.
- Hershkovitz O., Rosental B., Rosenberg L.A., Navarro-Sanchez M.E., Jivov S., Zilka A., Gershoni-Yahalom O., Brient-Litzler E., Bedouelle H., Ho J.W., Campbell K.S., Rager-Zisman B., Despres P., and Porgador A. 2009. NKp44 Receptor Mediates Interaction of the Envelope Glycoproteins from the West Nile and Dengue Viruses with NK Cells. *J Immunol*.
- Hieshima K., Imai T., Baba M., Shoudai K., Ishizuka K., Nakagawa T., Tsuruta J., Takeya M., Sakaki Y., Takatsuki K., Miura R., Opdenakker G., Van Damme J., Yoshie O., and Nomiyama H. 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.
- Higgs G.A., Bunting S., Moncada S., and Vane J.R. 1976. Polymorphonuclear leukocytes produce thromboxane A₂-like activity during phagocytosis. *Prostaglandins* 12:749-757.
- Hintzen G., Ohl L., del Rio M.L., Rodriguez-Barbosa J.I., Pabst O., Kocks J.R., Krege J., Hardtke S., and Forster R. 2006. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 177:7346-7354.
- Hirai H., Tanaka K., Yoshie O., Ogawa K., Kenmotsu K., Takamori Y., Ichimasa M., Sugamura K., Nakamura M., Takano S., and Nagata K. 2001. Prostaglandin D₂ selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J Exp Med* 193:255-261.
- Hirata H., Arima M., Cheng G., Honda K., Fukushima F., Yoshida N., Eda F., and Fukuda T. 2003. Production of TARC and MDC by naive T cells in asthmatic patients. *J Clin Immunol* 23:34-45.
- Hirst S.J., Hallsworth M.P., Peng Q., and Lee T.H. 2002. Selective induction of eotaxin release by interleukin-13 or interleukin-4 in human airway smooth muscle cells is synergistic with interleukin-1beta and is mediated by the interleukin-4 receptor alpha-chain. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1161-1171.
- Ho I.C., Lo D., and Glimcher L.H. 1998. c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms. *J Exp Med* 188:1859-1866.

- Ho J.W., Hershkovitz O., Peiris M., Zilka A., Bar-Ilan A., Nal B., Chu K., Kudelko M., Kam Y.W., Achdout H., Mandelboim M., Altmeyer R., Mandelboim O., Bruzzone R., and Porgador A. 2008. H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44. *J Virol* 82:2028-2032.
- Ho L.H., Ohno T., Oboki K., Kajiwara N., Suto H., Iikura M., Okayama Y., Akira S., Saito H., Galli S.J., and Nakae S. 2007. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcepsilonRI signals. *J Leukoc Biol* 82:1481-1490.
- Hofstra C.L., Van Ark I., Hofman G., Kool M., Nijkamp F.P., and Van Oosterhout A.J. 1998. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J Immunol* 161:5054-5060.
- Hofstra C.L., Van Ark I., Hofman G., Nijkamp F.P., Jardieu P.M., and Van Oosterhout A.J. 1998. Differential effects of endogenous and exogenous interferon-gamma on immunoglobulin E, cellular infiltration, and airway responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:826-835.
- Holgate S.T., Bodey K.S., Janezic A., Frew A.J., Kaplan A.P., and Teran L.M. 1997. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1377-1383.
- Hollyoake M., Campbell R.D., and Aguado B. 2005. NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol Biol Evol* 22:1661-1672.
- Hori S., Nomura T., and Sakaguchi S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Hornung V., Rothenfusser S., Britsch S., Krug A., Jahrsdorfer B., Giese T., Endres S., and Hartmann G. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168:4531-4537.
- Hoshino M., Nakamura Y., and Hamid Q.A. 2001. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 107:1034-1038.
- Hou Q., Zhao T., Zhang H., Lu H., Zhang Q., Sun L., and Fan Z. 2008. Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage. *Mol Immunol* 45:1044-1055.
- Houchins J.P., Yabe T., McSherry C., and Bach F.H. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1017-1020.
- Houssiau F.A., Renaud J.C., Stevens M., Lehmann F., Lethe B., Coulie P.G., and Van Snick J. 1993. Human T cell lines and clones respond to IL-9. *J Immunol* 150:2634-2640.
- Howarth P.H., Babu K.S., Arshad H.S., Lau L., Buckley M., McConnell W., Beckett P., Al Ali M., Chauhan A., Wilson S.J., Reynolds A., Davies D.E., and Holgate S.T. 2005. Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax* 60:1012-1018.
- Hsieh C.S., Heimberger A.B., Gold J.S., O'Garra A., and Murphy K.M. 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6065-6069.
- Hsieh F.H., Lam B.K., Penrose J.F., Austen K.F., and Boyce J.A. 2001. T helper cell type 2 cytokines coordinately regulate immunoglobulin E-dependent cysteinyl leukotriene production by human cord blood-derived mast cells: profound induction of leukotriene C(4) synthase expression by interleukin 4. *J Exp Med* 193:123-133.
- Hsu H.C., Yang P., Wang J., Wu Q., Myers R., Chen J., Yi J., Guentert T., Tousson A., Stanus A.L., Le T.V., Lorenz R.G., Xu H., Kolls J.K., Carter R.H., Chaplin D.D., Williams R.W., and Mountz J.D. 2008. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 9:166-175.

- Hua G., Zhang Q., and Fan Z. 2007. Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 282:20553-20560.
- Huber M., Brustle A., Reinhard K., Guralnik A., Walter G., Mahiny A., von Low E., and Lohoff M. 2008. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20846-20851.
- Hughes T., Becknell B., McClory S., Briercheck E., Freud A.G., Zhang X., Mao H., Nuovo G., Yu J., and Caligiuri M.A. 2009. Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22. *Blood* 113:4008-4010.
- Huh J.C., Strickland D.H., Jahnsen F.L., Turner D.J., Thomas J.A., Napoli S., Tobagus I., Stumbles P.A., Sly P.D., and Holt P.G. 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* 198:19-30.
- Humbles A.A., Lloyd C.M., McMillan S.J., Friend D.S., Xanthou G., McKenna E.E., Ghiran S., Gerard N.P., Yu C., Orkin S.H., and Gerard C. 2004. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science* 305:1776-1779.
- Huntington N.D., Legrand N., Alves N.L., Jaron B., Weijer K., Plet A., Corcuff E., Mortier E., Jacques Y., Spits H., and Di Santo J.P. 2009. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206:25-34.
- Huntington N.D., Tabarias H., Fairfax K., Brady J., Hayakawa Y., Degli-Esposti M.A., Smyth M.J., Tarlinton D.M., and Nutt S.L. 2007. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol* 178:4764-4770.
- Hwang E.S., Szabo S.J., Schwartzberg P.L., and Glimcher L.H. 2005. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science* 307:430-433.

|

- Iellem A., Colantonio L., Bhakta S., Sozzani S., Mantovani A., Sinigaglia F., and D'Ambrosio D. 2000. Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur J Immunol* 30:1030-1039.
- Iellem A., Mariani M., Lang R., Recalde H., Panina-Bordignon P., Sinigaglia F., and D'Ambrosio D. 2001. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 194:847-853.
- Iho S., Yamamoto T., Takahashi T., and Yamamoto S. 1999. Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro. *J Immunol* 163:3642-3652.
- Iikura M., Suto H., Kajiwaru N., Oboki K., Ohno T., Okayama Y., Saito H., Galli S.J., and Nakae S. 2007. IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest* 87:971-978.
- Ikeda K., Nakajima H., Suzuki K., Kagami S., Hirose K., Suto A., Saito Y., and Iwamoto I. 2003. Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* 101:3594-3596.
- Ikegami Y., Yokoyama A., Haruta Y., Hiyama K., and Kohno N. 2004. Circulating natural killer T cells in patients with asthma. *J Asthma* 41:877-882.
- Inngjerdingen M., Damaj B., and Maghazachi A.A. 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* 164:4048-4054.
- Inngjerdingen M., Damaj B., and Maghazachi A.A. 2001. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97:367-375.

- Irani A.M., Bradford T.R., Kepley C.L., Schechter N.M., and Schwartz L.B. 1989. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 37:1509-1515.
- Irifune K., Yokoyama A., Sakai K., Watanabe A., Katayama H., Ohnishi H., Hamada H., Nakajima M., Kohno N., and Higaki J. 2005. Adoptive transfer of T-helper cell type 1 clones attenuates an asthmatic phenotype in mice. *Eur Respir J* 25:653-659.
- Ito T., Hanabuchi S., Wang Y.H., Park W.R., Arima K., Bover L., Qin F.X., Gilliet M., and Liu Y.J. 2008. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28:870-880.
- Ito T., Wang Y.H., Duramad O., Hori T., Delespesse G.J., Watanabe N., Qin F.X., Yao Z., Cao W., and Liu Y.J. 2005. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202:1213-1223.
- Ivanov, II, McKenzie B.S., Zhou L., Tadokoro C.E., Lepelley A., Lafaille J.J., Cua D.J., and Littman D.R. 2006. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126:1121-1133.
- Iwamoto I., Nakajima H., Endo H., and Yoshida S. 1993. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J Exp Med* 177:573-576.

J

- Jacobs R., Hintzen G., Kemper A., Beul K., Kempf S., Behrens G., Sykora K.W., and Schmidt R.E. 2001. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol* 31:3121-3127.
- Jacobs R., Stoll M., Stratmann G., Leo R., Link H., and Schmidt R.E. 1992. CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood* 79:3239-3244.
- Jacobsen E.A., Ochkur S.I., Pero R.S., Taranova A.G., Protheroe C.A., Colbert D.C., Lee N.A., and Lee J.J. 2008. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205:699-710.
- Jaffar Z., Sivakuru T., and Roberts K. 2004. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J Immunol* 172:3842-3849.
- Jaiswal A.I., Dubey C., Swain S.L., and Croft M. 1996. Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals. *Int Immunol* 8:275-285.
- Jamieson A.M., Isnard P., Dorfman J.R., Coles M.C., and Raulet D.H. 2004. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol* 172:864-870.
- Jatakanon A., Uasuf C., Maziak W., Lim S., Chung K.F., and Barnes P.J. 1999. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1532-1539.
- Jenkins S.J., Perona-Wright G., Worsley A.G., Ishii N., and MacDonald A.S. 2007. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol* 179:3515-3523.
- Jenne C.N., Enders A., Rivera R., Watson S.R., Bankovich A.J., Pereira J.P., Xu Y., Roots C.M., Beilke J.N., Banerjee A., Reiner S.L., Miller S.A., Weinmann A.S., Goodnow C.C., Lanier L.L., Cyster J.G., and Chun J. 2009. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. *J. Exp. Med.* 206:2469-2481.
- Jiang D., Liang J., Hodge J., Lu B., Zhu Z., Yu S., Fan J., Gao Y., Yin Z., Homer R., Gerard C., and Noble P.W. 2004. Regulation of pulmonary fibrosis by chemokine receptor CXCR3. *J Clin Invest* 114:291-299.
- Jin Y., Knudsen E., Wang L., and Maghazachi A.A. 2003. Lysophosphatidic acid induces human natural killer cell chemotaxis and intracellular calcium mobilization. *Eur J Immunol* 33:2083-2089.

- Jinquan T., Jacobi H.H., Jing C., Reimert C.M., Quan S., Dissing S., Poulsen L.K., and Skov P.S. 2000. Chemokine stromal cell-derived factor 1 α activates basophils by means of CXCR4. *J Allergy Clin Immunol* 106:313-320.
- Jira M., Antosova E., Vondra V., Strejcek J., Mazakova H., and Prazakova J. 1988. Natural killer and interleukin-2 induced cytotoxicity in asthmatics. I. Effect of acute antigen-specific challenge. *Allergy* 43:294-298.
- Joetham A., Takeda K., Taube C., Miyahara N., Matsubara S., Koya T., Rha Y.H., Dakhama A., and Gelfand E.W. 2007. Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF- β . *J Immunol* 178:1433-1442.
- Johansson S., Johansson M., Rosmaraki E., Vahlne G., Mehr R., Salmon-Divon M., Lemonnier F., Karre K., and Hoglund P. 2005. Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 201:1145-1155.
- Johnson V.J., Yucesoy B., and Luster M.I. 2005. Prevention of IL-1 signaling attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a murine model of toluene diisocyanate-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:851-858.
- Joncker N.T., Fernandez N.C., Treiner E., Vivier E., and Raulet D.H. 2009. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182:4572-4580.
- Joncker N.T., and Raulet D.H. 2008. Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunol Rev* 224:85-97.
- Jonsson A.H., and Yokoyama W.M. 2009. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol* 101:27-79.
- Joseph M., Tonnel A.B., Capron A., and Voisin C. 1980. Enzyme release and superoxide anion production by human alveolar macrophages stimulated with immunoglobulin E. *Clin Exp Immunol* 40:416-422.
- Joubert P., Lajoie-Kadoch S., Labonte I., Gounni A.S., Maghni K., Wellemans V., Chakir J., Laviolette M., Hamid Q., and Lamkhioued B. 2005. CCR3 expression and function in asthmatic airway smooth muscle cells. *J Immunol* 175:2702-2708.
- Juniper E.F., Frith P.A., Dunnett C., Cockcroft D.W., and Hargreave F.E. 1978. Reproducibility and comparison of responses to inhaled histamine and methacholine. *Thorax* 33:705-710.
- Juremalm M., and Nilsson G. 2005. Chemokine receptor expression by mast cells. *Chem Immunol Allergy* 87:130-144.
- Jutel M., Pichler W.J., Skrbic D., Urwyler A., Dahinden C., and Muller U.R. 1995. Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN- γ secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 154:4187-4194.

K

- Kalayci O., Sonna L.A., Woodruff P.G., Camargo C.A., Jr., Luster A.D., and Lilly C.M. 2004. Monocyte chemotactic protein-4 (MCP-4; CCL-13): a biomarker of asthma. *J Asthma* 41:27-33.
- Kaminuma O., Kitamura F., Kitamura N., Miyagishi M., Taira K., Yamamoto K., Miura O., and Miyatake S. 2004. GATA-3 suppresses IFN- γ promoter activity independently of binding to cis-regulatory elements. *FEBS Lett* 570:63-68.
- Kanda A., Driss V., Hornez N., Abdallah M., Roumier T., Abboud G., Legrand F., Staumont-Salle D., Queant S., Bertout J., Fleury S., Remy P., Papin J.P., Julia V., Capron M., and Dombrowicz D. 2009. Eosinophil-derived IFN- γ induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*.
- Kano S., Sato K., Morishita Y., Vollstedt S., Kim S., Bishop K., Honda K., Kubo M., and Taniguchi T. 2008. The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon- γ -interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4 $^{+}$ T cells. *Nat Immunol* 9:34-41.

- Kaplan M.H., Schindler U., Smiley S.T., and Grusby M.J. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4:313-319.
- Kaplan M.H., Sun Y.L., Hoey T., and Grusby M.J. 1996. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 382:174-177.
- Karre K., Ljunggren H.G., Piontek G., and Kiessling R. 1986. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675-678.
- Kaspar A.A., Okada S., Kumar J., Poulain F.R., Drouvalakis K.A., Kelekar A., Hanson D.A., Kluck R.M., Hitoshi Y., Johnson D.E., Froelich C.J., Thompson C.B., Newmeyer D.D., Anel A., Clayberger C., and Krensky A.M. 2001. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. *J Immunol* 167:350-356.
- Katsumoto T., Kimura M., Yamashita M., Hosokawa H., Hashimoto K., Hasegawa A., Omori M., Miyamoto T., Taniguchi M., and Nakayama T. 2004. STAT6-dependent differentiation and production of IL-5 and IL-13 in murine NK2 cells. *J Immunol* 173:4967-4975.
- Kawaguchi M., Kokubu F., Kuga H., Matsukura S., Hoshino H., Ieki K., Imai T., Adachi M., and Huang S.K. 2001. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *J Allergy Clin Immunol* 108:804-809.
- Kawasaki S., Takizawa H., Yoneyama H., Nakayama T., Fujisawa R., Izumizaki M., Imai T., Yoshie O., Homma I., Yamamoto K., and Matsushima K. 2001. Intervention of thymus and activation-regulated chemokine attenuates the development of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 166:2055-2062.
- Kayaba H., Dombrowicz D., Woerly G., Papin J.P., Loiseau S., and Capron M. 2001. Human eosinophils and human high affinity IgE receptor transgenic mouse eosinophils express low levels of high affinity IgE receptor, but release IL-10 upon receptor activation. *J Immunol* 167:995-1003.
- Kayagaki N., Yamaguchi N., Nakayama M., Takeda K., Akiba H., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K., Okumura K., and Yagita H. 1999. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 163:1906-1913.
- Kearley J., Barker J.E., Robinson D.S., and Lloyd C.M. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202:1539-1547.
- Kearley J., Buckland K.F., Mathie S.A., and Lloyd C.M. 2009. Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 179:772-781.
- Kearley J., Robinson D.S., and Lloyd C.M. 2008. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 122:617-624 e616.
- Keefe D., Shi L., Feske S., Massol R., Navarro F., Kirchhausen T., and Lieberman J. 2005. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* 23:249-262.
- Kehrl J.H., Wakefield L.M., Roberts A.B., Jakowlew S., Alvarez-Mon M., Derynck R., Sporn M.B., and Fauci A.S. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.
- Kelly J.M., Darcy P.K., Markby J.L., Godfrey D.I., Takeda K., Yagita H., and Smyth M.J. 2002. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat Immunol* 3:83-90.
- Kelly J.M., Waterhouse N.J., Cretney E., Browne K.A., Ellis S., Trapani J.A., and Smyth M.J. 2004. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem* 279:22236-22242.
- Kemper C., Chan A.C., Green J.M., Brett K.A., Murphy K.M., and Atkinson J.P. 2003. Activation of human CD4+ cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature* 421:388-392.
- Khattri R., Cox T., Yasayko S.A., and Ramsdell F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4:337-342.

- Kikuchi-Maki A., Catina T.L., and Campbell K.S. 2005. Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein. *J Immunol* 174:3859-3863.
- Kikuchi-Maki A., Yusa S., Catina T.L., and Campbell K.S. 2003. KIR2DL4 is an IL-2-regulated NK cell receptor that exhibits limited expression in humans but triggers strong IFN-gamma production. *J Immunol* 171:3415-3425.
- Kim C.H., Butcher E.C., and Johnston B. 2002. Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol* 23:516-519.
- Kim C.H., Pelus L.M., Appelbaum E., Johanson K., Anzai N., and Broxmeyer H.E. 1999. CCR7 ligands, SLC/6CKine/Exodus2/TCAA4 and CKbeta-11/MIP-3beta/ELC, are chemoattractants for CD56(+)CD16(-) NK cells and late stage lymphoid progenitors. *Cell Immunol* 193:226-235.
- Kim H.B., Kim C.K., Iijima K., Kobayashi T., and Kita H. 2009. Protein microarray analysis in patients with asthma: elevation of the chemokine PARC/CCL18 in sputum. *Chest* 135:295-302.
- Kim J., McKinley L., Natarajan S., Bolgos G.L., Siddiqui J., Copeland S., and Remick D.G. 2006. Anti-tumor necrosis factor-alpha antibody treatment reduces pulmonary inflammation and methacholine hyper-responsiveness in a murine asthma model induced by house dust. *Clin Exp Allergy* 36:122-132.
- Kim J.I., Ho I.C., Grusby M.J., and Glimcher L.H. 1999. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 10:745-751.
- Kim J.M., Rasmussen J.P., and Rudensky A.Y. 2007. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol* 8:191-197.
- Kim S., Iizuka K., Kang H.S., Dokun A., French A.R., Greco S., and Yokoyama W.M. 2002. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3:523-528.
- Kim S., Poursine-Laurent J., Truscott S.M., Lybarger L., Song Y.J., Yang L., French A.R., Sunwoo J.B., Lemieux S., Hansen T.H., and Yokoyama W.M. 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436:709-713.
- Kim Y.S., Ko H.M., Kang N.I., Song C.H., Zhang X., Chung W.C., Kim J.H., Choi I.H., Park Y.M., Kim G.Y., Im S.Y., and Lee H.K. 2007. Mast cells play a key role in the development of late airway hyperresponsiveness through TNF-alpha in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* 37:1107-1115.
- Kips J.C., Brusselle G.J., Joos G.F., Peleman R.A., Tavernier J.H., Devos R.R., and Pauwels R.A. 1996. Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 153:535-539.
- Klein L.M., Lavker R.M., Matis W.L., and Murphy G.F. 1989. Degranulation of human mast cells induces an endothelial antigen central to leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8972-8976.
- Kleinschek M.A., Boniface K., Sadekova S., Grein J., Murphy E.E., Turner S.P., Raskin L., Desai B., Faubion W.A., de Waal Malefyt R., Pierce R.H., McClanahan T., and Kastelein R.A. 2009. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med* 206:525-534.
- Kloss M., Decker P., Baltz K.M., Baessler T., Jung G., Rammensee H.G., Steinle A., Krusch M., and Salih H.R. 2008. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol* 181:6711-6719.
- Kobayashi S.D., Voyich J.M., and DeLeo F.R. 2003. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 5:1337-1344.
- Kodama T., Matsuyama T., Kuribayashi K., Nishioka Y., Sugita M., Akira S., Nakanishi K., and Okamura H. 2000. IL-18 deficiency selectively enhances allergen-induced eosinophilia in mice. *J Allergy Clin Immunol* 105:45-53.
- Kodelja V., Muller C., Politz O., Hakij N., Orfanos C.E., and Goerdt S. 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.

- Kohka H., Nishibori M., Iwagaki H., Nakaya N., Yoshino T., Kobashi K., Saeki K., Tanaka N., and Akagi T. 2000. Histamine is a potent inducer of IL-18 and IFN-gamma in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 164:6640-6646.
- Kollert F., Probst C., Muller-Quernheim J., Zissel G., and Prasse A. 2009. CCL18 production is decreased in alveolar macrophages from cigarette smokers. *Inflammation* 32:163-168.
- Komai-Koma M., Xu D., Li Y., McKenzie A.N., McInnes I.B., and Liew F.Y. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37:2779-2786.
- Komiya A., Nagase H., Yamada H., Sekiya T., Yamaguchi M., Sano Y., Hanai N., Furuya A., Ohta K., Matsushima K., Yoshie O., Yamamoto K., and Hirai K. 2003. Concerted expression of eotaxin-1, eotaxin-2, and eotaxin-3 in human bronchial epithelial cells. *Cell Immunol* 225:91-100.
- Kondo Y., Yoshimoto T., Yasuda K., Futatsugi-Yumikura S., Morimoto M., Hayashi N., Hoshino T., Fujimoto J., and Nakanishi K. 2008. Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 20:791-800.
- Kool M., and Lambrecht B.N. 2007. Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr Opin Immunol* 19:701-710.
- Kopf M., Le Gros G., Bachmann M., Lamers M.C., Bluethmann H., and Kohler G. 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-248.
- Korn T., Bettelli E., Gao W., Awasthi A., Jager A., Strom T.B., Oukka M., and Kuchroo V.K. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448:484-487.
- Korsgren M., Persson C.G., Sundler F., Bjerke T., Hansson T., Chambers B.J., Hong S., Van Kaer L., Ljunggren H.G., and Korsgren O. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med* 189:553-562.
- Kos F.J., and Engleman E.G. 1995. Requirement for natural killer cells in the induction of cytotoxic T cells. *J Immunol* 155:578-584.
- Kos F.J., and Engleman E.G. 1996. Role of natural killer cells in the generation of influenza virus-specific cytotoxic T cells. *Cell Immunol* 173:1-6.
- Koshino T., Teshima S., Fukushima N., Takaishi T., Hirai K., Miyamoto Y., Arai Y., Sano Y., Ito K., and Morita Y. 1993. Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 23:919-925.
- Kottke T., Galivo F., Wongthida P., Diaz R.M., Thompson J., Jevremovic D., Barber G.N., Hall G., Chester J., Selby P., Harrington K., Melcher A., and Vile R.G. 2008. Treg depletion-enhanced IL-2 treatment facilitates therapy of established tumors using systemically delivered oncolytic virus. *Mol Ther* 16:1217-1226.
- Koya T., Kodama T., Takeda K., Miyahara N., Yang E.S., Taube C., Joetham A., Park J.W., Dakhama A., and Gelfand E.W. 2006. Importance of myeloid dendritic cells in persistent airway disease after repeated allergen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 173:42-55.
- Krieger M., Brunner T., Bischoff S.C., von Tscherner V., Walz A., Moser B., Baggiolini M., and Dahinden C.A. 1992. Activation of human basophils through the IL-8 receptor. *J Immunol* 149:2662-2667.
- Kulka M., Alexopoulou L., Flavell R.A., and Metcalfe D.D. 2004. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol* 114:174-182.
- Kulkarni S., Martin M.P., and Carrington M. 2008. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 20:343-352.
- Kumano K., Nakao A., Nakajima H., Hayashi F., Kurimoto M., Okamura H., Saito Y., and Iwamoto I. 1999. Interleukin-18 enhances antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 160:873-878.
- Kumar V., and McNerney M.E. 2005. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 5:363-374.

- Kuperman D., Schofield B., Wills-Karp M., and Grusby M.J. 1998. Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* 187:939-948.
- Kupfer A., Dennert G., and Singer S.J. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:7224-7228.
- Kurashima K., Fujimura M., Myou S., Ishiura Y., Onai N., and Matsushima K. 2006. Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. *Respirology* 11:152-157.
- Kurata H., Lee H.J., O'Garra A., and Arai N. 1999. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity* 11:677-688.
- Kurowska-Stolarska M., Kewin P., Murphy G., Russo R.C., Stolarski B., Garcia C.C., Komai-Koma M., Pitman N., Li Y., Niedbala W., McKenzie A.N., Teixeira M.M., Liew F.Y., and Xu D. 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181:4780-4790.

L

- Lack G., Bradley K.L., Hamelmann E., Renz H., Loader J., Leung D.Y., Larsen G., and Gelfand E.W. 1996. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol* 157:1432-1439.
- Lack G., Renz H., Saloga J., Bradley K.L., Loader J., Leung D.Y., Larsen G., and Gelfand E.W. 1994. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. *J Immunol* 152:2546-2554.
- Lamblin C., Gosset P., Tillie-Leblond I., Saulnier F., Marquette C.H., Wallaert B., and Tonnel A.B. 1998. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med* 157:394-402.
- Lambrecht B.N., De Veerman M., Coyle A.J., Gutierrez-Ramos J.C., Thielemans K., and Pauwels R.A. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 106:551-559.
- Lambrecht B.N., Salomon B., Klatzmann D., and Pauwels R.A. 1998. Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 160:4090-4097.
- Lanier L.L. 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16:359-393.
- Lanier L.L. 2003. Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* 15:308-314.
- Lanier L.L. 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9:495-502.
- Lanier L.L., Corliss B.C., Wu J., Leong C., and Phillips J.H. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391:703-707.
- Lanier L.L., Le A.M., Civin C.I., Loken M.R., and Phillips J.H. 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480-4486.
- Lanier L.L., Testi R., Bindi J., and Phillips J.H. 1989. Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169:2233-2238.
- Lanzavecchia A., Lezzi G., and Viola A. 1999. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 96:1-4.
- Lapinet J.A., Scapini P., Calzetti F., Perez O., and Cassatella M.A. 2000. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible

- protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. *Infect Immun* 68:6917-6923.
- Lappalainen U., Whitsett J.A., Wert S.E., Tichelaar J.W., and Bry K. 2005. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:311-318.
- Larche M., Akdis C.A., and Valenta R. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:761-771.
- Lazetic S., Chang C., Houchins J.P., Lanier L.L., and Phillips J.H. 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157:4741-4745.
- Le Gros G., Ben-Sasson S.Z., Seder R., Finkelman F.D., and Paul W.E. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172:921-929.
- Leckie M.J., ten Brinke A., Khan J., Diamant Z., O'Connor B.J., Walls C.M., Mathur A.K., Cowley H.C., Chung K.F., Djukanovic R., Hansel T.T., Holgate S.T., Sterk P.J., and Barnes P.J. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356:2144-2148.
- Lee C.C., Huang H.Y., and Chiang B.L. 2008. Lentiviral-mediated GATA-3 RNAi decreases allergic airway inflammation and hyperresponsiveness. *Mol Ther* 16:60-65.
- Lee C.G., Homer R.J., Zhu Z., Lanone S., Wang X., Koteliansky V., Shipley J.M., Gotwals P., Noble P., Chen Q., Senior R.M., and Elias J.A. 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* 194:809-821.
- Lee C.G., Link H., Baluk P., Homer R.J., Chapoval S., Bhandari V., Kang M.J., Cohn L., Kim Y.K., McDonald D.M., and Elias J.A. 2004. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med* 10:1095-1103.
- Lee J.J., Dimina D., Macias M.P., Ochkur S.I., McGarry M.P., O'Neill K.R., Protheroe C., Pero R., Nguyen T., Cormier S.A., Lenkiewicz E., Colbert D., Rinaldi L., Ackerman S.J., Irvin C.G., and Lee N.A. 2004. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305:1773-1776.
- Lee J.J., McGarry M.P., Farmer S.C., Denzler K.L., Larson K.A., Carrigan P.E., Brenneise I.E., Horton M.A., Haczku A., Gelfand E.W., Leikauf G.D., and Lee N.A. 1997. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma. *J Exp Med* 185:2143-2156.
- Lee K.H., Feig C., Tchikov V., Schickel R., Hallas C., Schutze S., Peter M.E., and Chan A.C. 2006. The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J* 25:1009-1023.
- Lee N., Llano M., Carretero M., Ishitani A., Navarro F., Lopez-Botet M., and Geraghty D.E. 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5199-5204.
- Lee S.A., Fitzgerald S.M., Huang S.K., Li C., Chi D.S., Milhorn D.M., and Krishnaswamy G. 2004. Molecular regulation of interleukin-13 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human mast cells by interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:283-291.
- Lee Y.K., Turner H., Maynard C.L., Oliver J.R., Chen D., Elson C.O., and Weaver C.T. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107.
- Lee Y.L., Fu C.L., Ye Y.L., and Chiang B.L. 1999. Administration of interleukin-12 prevents mite Der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophil infiltration in an animal model of airway inflammation. *Scand J Immunol* 49:229-236.
- Lehmann J., Huehn J., de la Rosa M., Maszyra F., Kretschmer U., Krenn V., Brunner M., Scheffold A., and Hamann A. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13031-13036.

- Leite-De-Moraes M.C., Hameg A., Pacilio M., Koezuka Y., Taniguchi M., Van Kaer L., Schneider E., Dy M., and Herbelin A. 2001. IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J Immunol* 166:945-951.
- Lemieux G.A., Blumenkron F., Yeung N., Zhou P., Williams J., Grammer A.C., Petrovich R., Lipsky P.E., Moss M.L., and Werb Z. 2007. The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J Biol Chem* 282:14836-14844.
- Levi-Schaffer F., and Piliponsky A.M. 2003. Tryptase, a novel link between allergic inflammation and fibrosis. *Trends Immunol* 24:158-161.
- Levings M.K., Gregori S., Tresoldi E., Cazzaniga S., Bonini C., and Roncarolo M.G. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105:1162-1169.
- Levings M.K., Sangregorio R., Galbiati F., Squadrone S., de Waal Malefyt R., and Roncarolo M.G. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 166:5530-5539.
- Lewkowich I.P., Herman N.S., Schleifer K.W., Dance M.P., Chen B.L., Dienger K.M., Sproles A.A., Shah J.S., Kohl J., Belkaid Y., and Wills-Karp M. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med* 202:1549-1561.
- Lewkowicz P., Lewkowicz N., Sasiak A., and Tchorzewski H. 2006. Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J Immunol* 177:7155-7163.
- Lezcano-Meza D., Negrete-Garcia M.C., Dante-Escobedo M., and Teran L.M. 2003. The monocyte-derived chemokine is released in the bronchoalveolar lavage fluid of steady-state asthmatics. *Allergy* 58:1125-1130.
- Li H., Zhu H., Xu C.J., and Yuan J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.
- Li L., Xia Y., Nguyen A., Lai Y.H., Feng L., Mosmann T.R., and Lo D. 1999. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol* 162:2477-2487.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., and Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
- Liao N.S., Bix M., Zijlstra M., Jaenisch R., and Raulet D. 1991. MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253:199-202.
- Liao S.C., Cheng Y.C., Wang Y.C., Wang C.W., Yang S.M., Yu C.K., Shieh C.C., Cheng K.C., Lee M.F., Chiang S.R., Shieh J.M., and Chang M.S. 2004. IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients. *J Immunol* 173:6712-6718.
- Lie W.J., Homburg C.H., Kuijpers T.W., Knol E.F., Mul F.P., Roos D., and Tool A.T. 2003. Regulation and kinetics of platelet-activating factor and leukotriene C4 synthesis by activated human basophils. *Clin Exp Allergy* 33:1125-1134.
- Lighvani A.A., Frucht D.M., Jankovic D., Yamane H., Aliberti J., Hissong B.D., Nguyen B.V., Gadina M., Sher A., Paul W.E., and O'Shea J.J. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15137-15142.
- Lin S.J., Chang L.Y., Yan D.C., Huang Y.J., Lin T.J., and Lin T.Y. 2003. Decreased intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and L-selectin (CD62L) expression on peripheral blood natural killer cells in asthmatic children with acute exacerbation. *Allergy* 58:67-71.
- Lin Y.L., Shieh C.C., and Wang J.Y. 2008. The functional insufficiency of human CD4+CD25 high T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF-alpha modulation. *Allergy* 63:67-74.
- Lindhout E., Vissers J.L., Hartgers F.C., Huijbens R.J., Scharenborg N.M., Figdor C.G., and Adema G.J. 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* 166:3284-3289.

- Ling E.M., Smith T., Nguyen X.D., Pridgeon C., Dallman M., Arbery J., Carr V.A., and Robinson D.S. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363:608-615.
- Lisbonne M., Diem S., de Castro Keller A., Lefort J., Araujo L.M., Hachem P., Fourneau J.M., Sidobre S., Kronenberg M., Taniguchi M., Van Ender P., Dy M., Askenase P., Russo M., Vargaftig B.B., Herbelin A., and Leite-de-Moraes M.C. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol* 171:1637-1641.
- Liu L.Y., Jarjour N.N., Busse W.W., and Kelly E.A. 2003. Chemokine receptor expression on human eosinophils from peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid after segmental antigen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 112:556-562.
- Liu L.Y., Sedgwick J.B., Bates M.E., Vrtis R.F., Gern J.E., Kita H., Jarjour N.N., Busse W.W., and Kelly E.A. 2002. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: I. Loss of membrane IL-5 receptor alpha on airway eosinophils and increased soluble IL-5 receptor alpha in the airway after allergen challenge. *J Immunol* 169:6452-6458.
- Liu L.Y., Sedgwick J.B., Bates M.E., Vrtis R.F., Gern J.E., Kita H., Jarjour N.N., Busse W.W., and Kelly E.A. 2002. Decreased expression of membrane IL-5 receptor alpha on human eosinophils: II. IL-5 down-modulates its receptor via a proteinase-mediated process. *J Immunol* 169:6459-6466.
- Liu M.C., Hubbard W.C., Proud D., Stealey B.A., Galli S.J., Kagey-Sobotka A., Bleeker E.R., and Lichtenstein L.M. 1991. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. *Am Rev Respir Dis* 144:51-58.
- Liu M.C., Proud D., Lichtenstein L.M., MacGlashan D.W., Jr., Schleimer R.P., Adkinson N.F., Jr., Kagey-Sobotka A., Schulman E.S., and Plaut M. 1986. Human lung macrophage-derived histamine-releasing activity is due to IgE-dependent factors. *J Immunol* 136:2588-2595.
- Liu X., Li M., Wu Y., Zhou Y., Zeng L., and Huang T. 2009. Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 386:181-185.
- Liu X., Li P., Widlak P., Zou H., Luo X., Garrard W.T., and Wang X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8461-8466.
- Liu X., Zou H., Slaughter C., and Wang X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.
- Liu X., Zou H., Widlak P., Garrard W., and Wang X. 1999. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* 274:13836-13840.
- Ljunggren H.G., and Karre K. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237-244.
- Llano M., Lee N., Navarro F., Garcia P., Albar J.P., Geraghty D.E., and Lopez-Botet M. 1998. HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol* 28:2854-2863.
- Lloyd C.M., and Rankin S.M. 2003. Chemokines in allergic airway disease. *Curr Opin Pharmacol* 3:443-448.
- Loetscher P., Seitz M., Clark-Lewis I., Baggiolini M., and Moser B. 1996. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 156:322-327.
- Loetscher P., Uguccioni M., Bordoli L., Baggiolini M., Moser B., Chizzolini C., and Dayer J.M. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
- Lohoff M., Mitrucker H.W., Prechtel S., Bischof S., Sommer F., Kock S., Ferrick D.A., Duncan G.S., Gessner A., and Mak T.W. 2002. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11808-11812.

- Loke Y.W., and King A. 1997. Immunology of human placental implantation: clinical implications of our current understanding. *Mol Med Today* 3:153-159.
- Lopez A.F., Begley C.G., Williamson D.J., Warren D.J., Vadas M.A., and Sanderson C.J. 1986. Murine eosinophil differentiation factor. An eosinophil-specific colony-stimulating factor with activity for human cells. *J Exp Med* 163:1085-1099.
- Lotzova E., Savary C.A., and Champlin R.E. 1993. Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33- bone marrow progenitors. *J Immunol* 150:5263-5269.
- Louahed J., Toda M., Jen J., Hamid Q., Renaud J.C., Levitt R.C., and Nicolaides N.C. 2000. Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22:649-656.
- Louis R., Shute J., Biagi S., Stanciu L., Marrelli F., Tenor H., Hidi R., and Djukanovic R. 1997. Cell infiltration, ICAM-1 expression, and eosinophil chemotactic activity in asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med* 155:466-472.
- Louten J., Boniface K., and de Waal Malefyt R. 2009. Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123:1004-1011.
- Loza M.J., and Perussia B. 2001. Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nat Immunol* 2:917-924.
- Loza M.J., and Perussia B. 2004. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol* 172:88-96.
- Lu H., Hou Q., Zhao T., Zhang H., Zhang Q., Wu L., and Fan Z. 2006. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J Immunol* 177:1171-1178.
- Luci C., Reynders A., Ivanov, II, Cognet C., Chiche L., Chasson L., Hardwigsen J., Anguiano E., Banchereau J., Chaussabel D., Dalod M., Littman D.R., Vivier E., and Tomasello E. 2009. Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 10:75-82.
- Lukacs N.W., Berlin A., Schols D., Skerlj R.T., and Bridger G.J. 2002. AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *Am J Pathol* 160:1353-1360.
- Lungarella G., Menegazzi R., Gardi C., Spessotto P., de Santi M.M., Bertocin P., Patriarca P., Calzoni P., and Zabucchi G. 1992. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys* 292:128-135.
- Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., and Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
- Luther S.A., Tang H.L., Hyman P.L., Farr A.G., and Cyster J.G. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12694-12699.

M

- Ma A., Koka R., and Burkett P. 2006. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 24:657-679.
- Ma L.L., Wang C.L., Neely G.G., Epelman S., Krensky A.M., and Mody C.H. 2004. NK cells use perforin rather than granzysin for anticryptococcal activity. *J Immunol* 173:3357-3365.
- MacDonald G., Shi L., Vande Velde C., Lieberman J., and Greenberg A.H. 1999. Mitochondria-dependent and -independent regulation of Granzyme B-induced apoptosis. *J Exp Med* 189:131-144.

- Mace E.M., Monkley S.J., Critchley D.R., and Takei F. 2009. A dual role for talin in NK cell cytotoxicity: activation of LFA-1-mediated cell adhesion and polarization of NK cells. *J Immunol* 182:948-956.
- MacKenzie J.R., Mattes J., Dent L.A., and Foster P.S. 2001. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167:3146-3155.
- MacPhee I.A., Turner D.R., Yagita H., and Oliveira D.B. 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* 54:486-494.
- Maghazachi A.A., Al-Aoukaty A., and Schall T.J. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur J Immunol* 26:315-319.
- Magnan A., van Pee D., Bongrand P., and Vervloet D. 1998. Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy* 53:1092-1095.
- Mahrus S., and Craik C.S. 2005. Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol* 12:567-577.
- Mailliard R.B., Alber S.M., Shen H., Watkins S.C., Kirkwood J.M., Herberman R.B., and Kalinski P. 2005. IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* 202:941-953.
- Mainiero F., Soriani A., Strippoli R., Jacobelli J., Gismondi A., Piccoli M., Frati L., and Santoni A. 2000. RAC1/P38 MAPK signaling pathway controls beta1 integrin-induced interleukin-8 production in human natural killer cells. *Immunity* 12:7-16.
- Malisan F., Briere F., Bridon J.M., Harindranath N., Mills F.C., Max E.E., Banchereau J., and Martinez-Valdez H. 1996. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med* 183:937-947.
- Mandelboim O., Lieberman N., Lev M., Paul L., Arnon T.I., Bushkin Y., Davis D.M., Strominger J.L., Yewdell J.W., and Porgador A. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
- Mandelboim O., Reyburn H.T., Vales-Gomez M., Pazmany L., Colonna M., Borsellino G., and Strominger J.L. 1996. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med* 184:913-922.
- Manel N., Unutmaz D., and Littman D.R. 2008. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9:641-649.
- Manetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni M.P., Maggi E., Trinchieri G., and Romagnani S. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177:1199-1204.
- Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R., and Weaver C.T. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231-234.
- Mantel P.Y., Kuipers H., Boyman O., Rhyner C., Ouaked N., Ruckert B., Karagiannidis C., Lambrecht B.N., Hendriks R.W., Cramer R., Akdis C.A., Blaser K., and Schmidt-Weber C.B. 2007. GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biol* 5:e329.
- Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., and Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686.
- Marcenaro E., Ferranti B., Falco M., Moretta L., and Moretta A. 2008. Human NK cells directly recognize *Mycobacterium bovis* via TLR2 and acquire the ability to kill monocyte-derived DC. *Int Immunol* 20:1155-1167.
- Marini M., Vittori E., Hollemborg J., and Mattoli S. 1992. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and

- interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 89:1001-1009.
- Mark D.A., Donovan C.E., De Sanctis G.T., He H.Z., Cernadas M., Kobzik L., Perkins D.L., Sharpe A., and Finn P.W. 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* 22:265-271.
- Marone G., Triggiani M., and de Paulis A. 2005. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol* 26:25-31.
- Marshall J.D., Heeke D.S., Abbate C., Yee P., and Van Nest G. 2006. Induction of interferon-gamma from natural killer cells by immunostimulatory CpG DNA is mediated through plasmacytoid-dendritic-cell-produced interferon-alpha and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 117:38-46.
- Martin-Fontecha A., Thomsen L.L., Brett S., Gerard C., Lipp M., Lanzavecchia A., and Sallusto F. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
- Martinvalet D., Dykxhoorn D.M., Ferrini R., and Lieberman J. 2008. Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* 133:681-692.
- Martinvalet D., Zhu P., and Lieberman J. 2005. Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22:355-370.
- Masten B.J., Olson G.K., Tarleton C.A., Rund C., Schuyler M., Mehran R., Archibeque T., and Lipscomb M.F. 2006. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol* 177:7784-7793.
- Masuda T., Tanaka H., Komai M., Nagao K., Ishizaki M., Kajiwara D., and Nagai H. 2003. Mast cells play a partial role in allergen-induced subepithelial fibrosis in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy* 33:705-713.
- Matangkasombut P., Marigowda G., Ervine A., Idris L., Pichavant M., Kim H.Y., Yasumi T., Wilson S.B., DeKruyff R.H., Faul J.L., Israel E., Akbari O., and Umetsu D.T. 2009. Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123:1181-1185.
- Mathur A.N., Chang H.C., Zisoulis D.G., Stritesky G.L., Yu Q., O'Malley J.T., Kapur R., Levy D.E., Kansas G.S., and Kaplan M.H. 2007. Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *J Immunol* 178:4901-4907.
- Matos M.E., Schnier G.S., Beecher M.S., Ashman L.K., William D.E., and Caligiuri M.A. 1993. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J Exp Med* 178:1079-1084.
- Matsuda H., Suda T., Sato J., Nagata T., Koide Y., Chida K., and Nakamura H. 2005. alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:22-31.
- Matsumoto G., Nghiem M.P., Nozaki N., Schmits R., and Penninger J.M. 1998. Cooperation between CD44 and LFA-1/CD11a adhesion receptors in lymphokine-activated killer cell cytotoxicity. *J Immunol* 160:5781-5789.
- Mawhorter S.D., Kazura J.W., and Boom W.H. 1994. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology* 81:584-591.
- Mazzucchelli R., and Durum S.K. 2007. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 7:144-154.
- McCusker C.T., Wang Y., Shan J., Kinyanjui M.W., Villeneuve A., Michael H., and Fixman E.D. 2007. Inhibition of experimental allergic airways disease by local application of a cell-penetrating dominant-negative STAT-6 peptide. *J Immunol* 179:2556-2564.
- McFadden E.R., Jr., and Gilbert I.A. 1992. Asthma. *N Engl J Med* 327:1928-1937.
- McGuirk P., McCann C., and Mills K.H. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by

- dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J Exp Med* 195:221-231.
- McHugh R.S., Whitters M.J., Piccirillo C.A., Young D.A., Shevach E.M., Collins M., and Byrne M.C. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16:311-323.
- McLane M.P., Haczku A., van de Rijn M., Weiss C., Ferrante V., MacDonald D., Renauld J.C., Nicolaides N.C., Holroyd K.J., and Levitt R.C. 1998. Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:713-720.
- McNerney M.E., Guzior D., and Kumar V. 2005. 2B4 (CD244)-CD48 interactions provide a novel MHC class I-independent system for NK-cell self-tolerance in mice. *Blood* 106:1337-1340.
- Medoff B.D., Sauty A., Tager A.M., Maclean J.A., Smith R.N., Mathew A., Dufour J.H., and Luster A.D. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Immunol* 168:5278-5286.
- Meiler F., Klunker S., Zimmermann M., Akdis C.A., and Akdis M. 2008. Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 63:1455-1463.
- Melewicz F.M., Kline L.E., Cohen A.B., and Spiegelberg H.L. 1982. Characterization of Fc receptors for IgE on human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 49:364-370.
- Message S.D., and Johnston S.L. 2004. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J Leukoc Biol* 75:5-17.
- Metcalfe D.D. 2008. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 112:946-956.
- Metkar S.S., Wang B., Ebbs M.L., Kim J.H., Lee Y.J., Raja S.M., and Froelich C.J. 2003. Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J Cell Biol* 160:875-885.
- Meyer E.H., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 2008. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annu Rev Med* 59:281-292.
- Miah S.M., Hughes T.L., and Campbell K.S. 2008. KIR2DL4 differentially signals downstream functions in human NK cells through distinct structural modules. *J Immunol* 180:2922-2932.
- Michel M.L., Keller A.C., Paget C., Fujio M., Trottein F., Savage P.B., Wong C.H., Schneider E., Dy M., and Leite-de-Moraes M.C. 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
- Mikhak Z., Fukui M., Farsidjani A., Medoff B.D., Tager A.M., and Luster A.D. 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 e63.
- Miller J.S., and McCullar V. 2001. Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. *Blood* 98:705-713.
- Miller J.S., McCullar V., Punzel M., Lemischka I.R., and Moore K.A. 1999. Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood* 93:96-106.
- Milovanovic M., Heine G., Zuberbier T., and Worm M. 2009. Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production. *Clin Exp Allergy* 39:671-678.
- Minshall E., Chakir J., Laviolette M., Molet S., Zhu Z., Olivenstein R., Elias J.A., and Hamid Q. 2000. IL-11 expression is increased in severe asthma: association with epithelial cells and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 105:232-238.
- Minshall E.M., Leung D.Y., Martin R.J., Song Y.L., Cameron L., Ernst P., and Hamid Q. 1997. Eosinophil-associated TGF-beta1 mRNA expression and airways fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17:326-333.
- Mocikat R., Braumuller H., Gumy A., Egeter O., Ziegler H., Reusch U., Bubeck A., Louis J., Mailhammer R., Riethmuller G., Koszinowski U., and Rocken M. 2003. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19:561-569.

- Molet S., Hamid Q., Davoine F., Nutku E., Taha R., Page N., Olivenstein R., Elias J., and Chakir J. 2001. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108:430-438.
- Molinari J.F., Scuri M., Moore W.R., Clark J., Tanaka R., and Abraham W.M. 1996. Inhaled tryptase causes bronchoconstriction in sheep via histamine release. *Am J Respir Crit Care Med* 154:649-653.
- Moniuszko M., Bodzenta-Lukaszyk A., Kowal K., and Dabrowska M. 2007. Bronchial macrophages in asthmatics reveal decreased CD16 expression and substantial levels of receptors for IL-10, but not IL-4 and IL-7. *Folia Histochem Cytobiol* 45:181-189.
- Montel A.H., Bochan M.R., Hobbs J.A., Lynch D.H., and Brahmi Z. 1995. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol* 166:236-246.
- Montes-Vizuet R., Vega-Miranda A., Valencia-Maqueda E., Negrete-Garcia M.C., Velasquez J.R., and Teran L.M. 2006. CC chemokine ligand 1 is released into the airways of atopic asthmatics. *Eur Respir J* 28:59-67.
- Montuschi P., and Barnes P.J. 2002. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109:615-620.
- Morandi B., Bougras G., Muller W.A., Ferlazzo G., and Munz C. 2006. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 36:2394-2400.
- Moretta A. 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2:957-964.
- Moretta A., Biassoni R., Bottino C., Mingari M.C., and Moretta L. 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21:228-234.
- Moretta A., Locatelli F., and Moretta L. 2008. Human NK cells: from HLA class I-specific killer Ig-like receptors to the therapy of acute leukemias. *Immunol Rev* 224:58-69.
- Moretta L., Ferlazzo G., Bottino C., Vitale M., Pende D., Mingari M.C., and Moretta A. 2006. Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* 214:219-228.
- Moretta L., and Moretta A. 2004. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *Embo J* 23:255-259.
- Morishima Y., Ishii Y., Kimura T., Shibuya A., Shibuya K., Hegab A.E., Iizuka T., Kiwamoto T., Matsuno Y., Sakamoto T., Nomura A., Taniguchi M., and Sekizawa K. 2005. Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* 35:2803-2814.
- Mortier E., Woo T., Advincula R., Gozalo S., and Ma A. 2008. IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *J Exp Med* 205:1213-1225.
- Motyka B., Korbitt G., Pinkoski M.J., Heibin J.A., Caputo A., Hobman M., Barry M., Shostak I., Sawchuk T., Holmes C.F., Gauldie J., and Bleackley R.C. 2000. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103:491-500.
- Moulin D., Donze O., Talabot-Ayer D., Mezin F., Palmer G., and Gabay C. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40:216-225.
- Mrozek E., Anderson P., and Caligiuri M.A. 1996. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:2632-2640.
- Mullen A.C., Hutchins A.S., High F.A., Lee H.W., Sykes K.J., Chodosh L.A., and Reiner S.L. 2002. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 3:652-658.
- Murata K., Ishii N., Takano H., Miura S., Ndhlovu L.C., Nose M., Noda T., and Sugamura K. 2000. Impairment of antigen-presenting cell function in mice lacking expression of OX40 ligand. *J Exp Med* 191:365-374.

- Murphy E.E., Terres G., Macatonia S.E., Hsieh C.S., Mattson J., Lanier L., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy K., and O'Garra A. 1994. B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation. *J Exp Med* 180:223-231.
- Murphy K.M., and Reiner S.L. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
- Murray P.J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178:2623-2629.

N

- Nagata K., Tanaka K., Ogawa K., Kemmotsu K., Imai T., Yoshie O., Abe H., Tada K., Nakamura M., Sugamura K., and Takano S. 1999. Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo. *J Immunol* 162:1278-1286.
- Nagira M., Imai T., Hieshima K., Kusuda J., Ridanpaa M., Takagi S., Nishimura M., Kakizaki M., Nomiyama H., and Yoshie O. 1997. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem* 272:19518-19524.
- Nagler A., Lanier L.L., and Phillips J.H. 1990. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 171:1527-1533.
- Nakae S., Ho L.H., Yu M., Monteforte R., Iikura M., Suto H., and Galli S.J. 2007. Mast cell-derived TNF contributes to airway hyperreactivity, inflammation, and TH2 cytokine production in an asthma model in mice. *J Allergy Clin Immunol* 120:48-55.
- Nakajima H., Samaridis J., Angman L., and Colonna M. 1999. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* 162:5-8.
- Nakajima H., Sano H., Nishimura T., Yoshida S., and Iwamoto I. 1994. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med* 179:1145-1154.
- Nakamura Y., Ghaffar O., Olivenstein R., Taha R.A., Soussi-Gounni A., Zhang D.H., Ray A., and Hamid Q. 1999. Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 103:215-222.
- Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., and Okamura H. 2001. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:53-72.
- Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., and Okamura H. 2001. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19:423-474.
- Naoe Y., Setoguchi R., Akiyama K., Muroi S., Kuroda M., Hatam F., Littman D.R., and Taniuchi I. 2007. Repression of interleukin-4 in T helper type 1 cells by Runx/Cbfbeta binding to the IL4 silencer. *J Exp Med* 204:1749-1755.
- Nausch N., and Cerwenka A. 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27:5944-5958.
- Neveu W.A., Allard J.B., Dienz O., Wargo M.J., Ciliberto G., Whittaker L.A., and Rincon M. 2009. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol* 183:1732-1738.
- Newman K.C., and Riley E.M. 2007. Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nat Rev Immunol* 7:279-291.
- Nguyen K.D., Vanichsarn C., Fohner A., and Nadeau K.C. 2009. Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi)CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123:933-939 e910.

- Nguyen K.D., Vanichsarn C., and Nadeau K.C. 2009. Impaired IL-10-dependent Induction of Tolerogenic Dendritic Cells by CD4⁺CD25^{hi}CD127^{lo}/- Natural Regulatory T Cells In Human Allergic Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*.
- Nibbs R.J., Salcedo T.W., Campbell J.D., Yao X.T., Li Y., Nardelli B., Olsen H.S., Morris T.S., Proudfoot A.E., Patel V.P., and Graham G.J. 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* 164:1488-1497.
- Nice T.J., Coscoy L., and Raulet D.H. 2009. Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J Exp Med* 206:287-298.
- Nielsen L.P., Peterson C.G., and Dahl R. 2009. Serum eosinophil granule proteins predict asthma risk in allergic rhinitis. *Allergy* 64:733-737.
- Nieto M., Navarro F., Perez-Villar J.J., del Pozo M.A., Gonzalez-Amaro R., Mellado M., Frade J.M., Martinez A.C., Lopez-Botet M., and Sanchez-Madrid F. 1998. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J Immunol* 161:3330-3339.
- Nitta T., Yagita H., Sato K., and Okumura K. 1989. Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med* 170:1757-1761.
- Nonaka M., Pawankar R., Fukumoto A., Ogihara N., Sakanushi A., and Yagi T. 2004. Induction of eotaxin production by interleukin-4, interleukin-13 and lipopolysaccharide by nasal fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 34:804-811.
- Noso N., Proost P., Van Damme J., and Schroder J.M. 1994. Human monocyte chemotactic proteins-2 and 3 (MCP-2 and MCP-3) attract human eosinophils and desensitize the chemotactic responses towards RANTES. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1470-1476.
- Nurieva R., Yang X.O., Martinez G., Zhang Y., Panopoulos A.D., Ma L., Schluns K., Tian Q., Watowich S.S., Jetten A.M., and Dong C. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448:480-483.

O

- O'Connor G.M., Hart O.M., and Gardiner C.M. 2006. Putting the natural killer cell in its place. *Immunology* 117:1-10.
- O'Gorman M.T., Jatoti N.A., Lane S.J., and Mahon B.P. 2005. IL-1beta and TNF-alpha induce increased expression of CCL28 by airway epithelial cells via an NFkappaB-dependent pathway. *Cell Immunol* 238:87-96.
- Ochoa M.T., Stenger S., Sieling P.A., Thoma-Uszynski S., Sabet S., Cho S., Krensky A.M., Rollinghoff M., Nunes Sarno E., Burdick A.E., Rea T.H., and Modlin R.L. 2001. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med* 7:174-179.
- Odaka M., Matsukura S., Kuga H., Kokubu F., Kasama T., Kurokawa M., Kawaguchi M., Ieki K., Suzuki S., Watanabe S., Homma T., Takeuchi H., Nohtomi K., Schleimer R.P., and Adachi M. 2007. Differential regulation of chemokine expression by Th1 and Th2 cytokines and mechanisms of eotaxin/CCL-11 expression in human airway smooth muscle cells. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:84-88.
- Ogasawara K., Hamerman J.A., Hsin H., Chikuma S., Bour-Jordan H., Chen T., Pertel T., Carnaud C., Bluestone J.A., and Lanier L.L. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18:41-51.
- Ohkawara Y., Lim K.G., Xing Z., Glibetic M., Nakano K., Dolovich J., Croitoru K., Weller P.F., and Jordana M. 1996. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J Clin Invest* 97:1761-1766.
- Ohno S., Sato T., Kohu K., Takeda K., Okumura K., Satake M., and Habu S. 2008. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. *Int Immunol* 20:71-79.

- Ohshima Y., Tanaka Y., Tozawa H., Takahashi Y., Maliszewski C., and Delespesse G. 1997. Expression and function of OX40 ligand on human dendritic cells. *J Immunol* 159:3838-3848.
- Okada S., Li Q., Whitin J.C., Clayberger C., and Krensky A.M. 2003. Intracellular mediators of granulysin-induced cell death. *J Immunol* 171:2556-2562.
- Okamura H., Tsutsi H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., and et al. 1995. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378:88-91.
- Okayama Y., Ra C., and Saito H. 2007. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* 19:687-693.
- Olcese L., Cambiaggi A., Semenzato G., Bottino C., Moretta A., and Vivier E. 1997. Human killer cell activatory receptors for MHC class I molecules are included in a multimeric complex expressed by natural killer cells. *J Immunol* 158:5083-5086.
- Olcese L., Lang P., Vely F., Cambiaggi A., Marguet D., Blery M., Hippen K.L., Biassoni R., Moretta A., Moretta L., Cambier J.C., and Vivier E. 1996. Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol* 156:4531-4534.
- Olgart C., and Frossard N. 2001. Human lung fibroblasts secrete nerve growth factor: effect of inflammatory cytokines and glucocorticoids. *Eur Respir J* 18:115-121.
- Oliva A., Kinter A.L., Vaccarezza M., Rubbert A., Catanzaro A., Moir S., Monaco J., Ehler L., Mizell S., Jackson R., Li Y., Romano J.W., and Fauci A.S. 1998. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. *J Clin Invest* 102:223-231.
- Onishi Y., Fehervari Z., Yamaguchi T., and Sakaguchi S. 2008. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10113-10118.
- Ono M., Yaguchi H., Ohkura N., Kitabayashi I., Nagamura Y., Nomura T., Miyachi Y., Tsukada T., and Sakaguchi S. 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 446:685-689.
- Ortaldo J.R., Bere E.W., Hodge D., and Young H.A. 2001. Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production. *J Immunol* 166:4994-4999.
- Oshikawa K., Kuroiwa K., Tago K., Iwahana H., Yanagisawa K., Ohno S., Tominaga S.I., and Sugiyama Y. 2001. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 164:277-281.
- Oshikawa K., Yanagisawa K., Tominaga S., and Sugiyama Y. 2002. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 32:1520-1526.
- Ostroukhova M., Seguin-Devaux C., Oriss T.B., Dixon-McCarthy B., Yang L., Ameredes B.T., Corcoran T.E., and Ray A. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest* 114:28-38.
- Owen W.F., Jr., Rothenberg M.E., Silberstein D.S., Gasson J.C., Stevens R.L., Austen K.F., and Soberman R.J. 1987. Regulation of human eosinophil viability, density, and function by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in the presence of 3T3 fibroblasts. *J Exp Med* 166:129-141.

P

- Pai S.Y., Truitt M.L., and Ho I.C. 2004. GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1993-1998.
- Palframan R.T., Collins P.D., Williams T.J., and Rankin S.M. 1998. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 91:2240-2248.

- Pallandre J.R., Krzewski K., Bedel R., Ryffel B., Caignard A., Rohrlich P.S., Pivot X., Tiberghien P., Zitvogel L., Strominger J.L., and Borg C. 2008. Dendritic cell and natural killer cell cross-talk: a pivotal role of CX3CL1 in NK cytoskeleton organization and activation. *Blood* 112:4420-4424.
- Panina-Bordignon P., Papi A., Mariani M., Di Lucia P., Casoni G., Bellettato C., Buonsanti C., Miotto D., Mapp C., Villa A., Arrigoni G., Fabbri L.M., and Sinigaglia F. 2001. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 107:1357-1364.
- Papadopoulos E.J., Sassetti C., Saeki H., Yamada N., Kawamura T., Fitzhugh D.J., Saraf M.A., Schall T., Blauvelt A., Rosen S.D., and Hwang S.T. 1999. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 29:2551-2559.
- Pardo J., Aguilo J.I., Anel A., Martin P., Joeckel L., Borner C., Wallich R., Mullbacher A., Froelich C.J., and Simon M.M. 2009. The biology of cytotoxic cell granule exocytosis pathway: granzymes have evolved to induce cell death and inflammation. *Microbes Infect* 11:452-459.
- Pardo J., Perez-Galan P., Gamen S., Marzo I., Monleon I., Kaspar A.A., Susin S.A., Kroemer G., Krensky A.M., Naval J., and Anel A. 2001. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis. *J Immunol* 167:1222-1229.
- Park H.S., Kim S.H., and Park C.S. 2006. The role of novel genes in modifying airway responses in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 6:112-116.
- Park M.K., Amichay D., Love P., Wick E., Liao F., Grinberg A., Rabin R.L., Zhang H.H., Gebeyehu S., Wright T.M., Iwasaki A., Weng Y., DeMartino J.A., Elkins K.L., and Farber J.M. 2002. The CXC chemokine murine monokine induced by IFN-gamma (CXC chemokine ligand 9) is made by APCs, targets lymphocytes including activated B cells, and supports antibody responses to a bacterial pathogen in vivo. *J Immunol* 169:1433-1443.
- Parolini S., Santoro A., Marcenaro E., Luini W., Massardi L., Facchetti F., Communi D., Parmentier M., Majorana A., Sironi M., Tabellini G., Moretta A., and Sozzani S. 2007. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood* 109:3625-3632.
- Pease J.E. 2006. Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets* 7:3-12.
- Pena S.V., Hanson D.A., Carr B.A., Goralski T.J., and Krensky A.M. 1997. Processing, subcellular localization, and function of 519 (granulysin), a human late T cell activation molecule with homology to small, lytic, granule proteins. *J Immunol* 158:2680-2688.
- Pende D., Castriconi R., Romagnani P., Spaggiari G.M., Marcenaro S., Dondero A., Lazzeri E., Lasagni L., Martini S., Rivera P., Capobianco A., Moretta L., Moretta A., and Bottino C. 2006. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107:2030-2036.
- Pende D., Parolini S., Pessino A., Sivori S., Augugliaro R., Morelli L., Marcenaro E., Accame L., Malaspina A., Biassoni R., Bottino C., Moretta L., and Moretta A. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516.
- Peritt D., Robertson S., Gri G., Showe L., Aste-Amezaga M., and Trinchieri G. 1998. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 161:5821-5824.
- Pernis A., Gupta S., Gollob K.J., Garfein E., Coffman R.L., Schindler C., and Rothman P. 1995. Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science* 269:245-247.
- Pessino A., Sivori S., Bottino C., Malaspina A., Morelli L., Moretta L., Biassoni R., and Moretta A. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188:953-960.
- Peters P.J., Borst J., Oorschot V., Fukuda M., Krahenbuhl O., Tschopp J., Slot J.W., and Geuze H.J. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173:1099-1109.

- Pham-Thi N., de Blic J., Le Bourgeois M., Dy M., Scheinmann P., and Leite-de-Moraes M.C. 2006. Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 117:217-218.
- Phillips J.H., Le A.M., and Lanier L.L. 1984. Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens. *J Exp Med* 159:993-1008.
- Piccioli D., Sbrana S., Melandri E., and Valiante N.M. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195:335-341.
- Pilaro A.M., Sayers T.J., McCormick K.L., Reynolds C.W., and Wiltrout R.H. 1990. An improved in vitro assay to quantitate chemotaxis of rat peripheral blood large granular lymphocytes (LGL). *J Immunol Methods* 135:213-223.
- Pilette C., Francis J.N., Till S.J., and Durham S.R. 2004. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur Respir J* 23:876-884.
- Piliponsky A.M., Gleich G.J., Bar I., and Levi-Schaffer F. 2002. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. *Mol Immunol* 38:1369.
- Piliponsky A.M., Pickholtz D., Gleich G.J., and Levi-Schaffer F. 2001. Human eosinophils induce histamine release from antigen-activated rat peritoneal mast cells: a possible role for mast cells in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol* 107:993-1000.
- Pinkoski M.J., Waterhouse N.J., Heibin J.A., Wolf B.B., Kuwana T., Goldstein J.C., Newmeyer D.D., Bleackley R.C., and Green D.R. 2001. Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 276:12060-12067.
- Plougastel B., Jones T., and Trowsdale J. 1996. Genomic structure, chromosome location, and alternative splicing of the human NKG2A gene. *Immunogenetics* 44:286-291.
- Plougastel B., and Trowsdale J. 1997. Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes. *Eur J Immunol* 27:2835-2839.
- Plummeridge M.J., Armstrong L., Birchall M.A., and Millar A.B. 2000. Reduced production of interleukin 12 by interferon gamma primed alveolar macrophages from atopic asthmatic subjects. *Thorax* 55:842-847.
- Pogge von Strandmann E., Simhadri V.R., von Tresckow B., Sasse S., Reiners K.S., Hansen H.P., Rothe A., Boll B., Simhadri V.L., Borchmann P., McKinnon P.J., Hallek M., and Engert A. 2007. Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the Nkp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27:965-974.
- Pohajdak B., Gomez J., Orr F.W., Khalil N., Talgoy M., and Greenberg A.H. 1986. Chemotaxis of large granular lymphocytes. *J Immunol* 136:278-284.
- Ponath P.D., Qin S., Ringler D.J., Clark-Lewis I., Wang J., Kassam N., Smith H., Shi X., Gonzalo J.A., Newman W., Gutierrez-Ramos J.C., and Mackay C.R. 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* 97:604-612.
- Pons F., Freund V., Kuissu H., Mathieu E., Olgart C., and Frossard N. 2001. Nerve growth factor secretion by human lung epithelial A549 cells in pro- and anti-inflammatory conditions. *Eur J Pharmacol* 428:365-369.
- Ponte M., Cantoni C., Biassoni R., Tradori-Cappai A., Bentivoglio G., Vitale C., Bertone S., Moretta A., Moretta L., and Mingari M.C. 1999. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5674-5679.
- Pope S.M., Brandt E.B., Mishra A., Hogan S.P., Zimmermann N., Matthaei K.I., Foster P.S., and Rothenberg M.E. 2001. IL-13 induces eosinophil recruitment into the lung by an IL-5- and eotaxin-dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol* 108:594-601.
- Pope S.M., Fulkerson P.C., Blanchard C., Akei H.S., Nikolaidis N.M., Zimmermann N., Molkentin J.D., and Rothenberg M.E. 2005. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. *J Biol Chem* 280:13952-13961.

- Pouliot P., Turmel V., Gelinas E., Laviolette M., and Bissonnette E.Y. 2005. Interleukin-4 production by human alveolar macrophages. *Clin Exp Allergy* 35:804-810.
- Presky D.H., Yang H., Minetti L.J., Chua A.O., Nabavi N., Wu C.Y., Gately M.K., and Gubler U. 1996. A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14002-14007.
- Price K.S., Friend D.S., Mellor E.A., De Jesus N., Watts G.F., and Boyce J.A. 2003. CC chemokine receptor 3 mobilizes to the surface of human mast cells and potentiates immunoglobulin E-dependent generation of interleukin 13. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:420-427.
- Prod'homme V., Griffin C., Aicheler R.J., Wang E.C., McSharry B.P., Rickards C.R., Stanton R.J., Borysiewicz L.K., Lopez-Botet M., Wilkinson G.W., and Tomasec P. 2007. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol* 178:4473-4481.
- Prussin C., and Metcalfe D.D. 2006. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117:S450-456.
- Pype J.L., Dupont L.J., Menten P., Van Coillie E., Opdenakker G., Van Damme J., Chung K.F., Demedts M.G., and Verleden G.M. 1999. Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:528-536.

Q

- Qiu Z., Fujimura M., Kurashima K., Nakao S., and Mukaida N. 2004. Enhanced airway inflammation and decreased subepithelial fibrosis in interleukin 6-deficient mice following chronic exposure to aerosolized antigen. *Clin Exp Allergy* 34:1321-1328.
- Qu C., Edwards E.W., Tacke F., Angeli V., Llodra J., Sanchez-Schmitz G., Garin A., Haque N.S., Peters W., van Rooijen N., Sanchez-Torres C., Bromberg J., Charo I.F., Jung S., Lira S.A., and Randolph G.J. 2004. Role of CCR8 and other chemokine pathways in the migration of monocyte-derived dendritic cells to lymph nodes. *J Exp Med* 200:1231-1241.

R

- Rabinovich B., Li J., Wolfson M., Lawrence W., Beers C., Chalupny J., Hurren R., Greenfield B., Miller R., and Cosman D. 2006. NKG2D splice variants: a reexamination of adaptor molecule associations. *Immunogenetics* 58:81-88.
- Radosavljevic M., Cuillerier B., Wilson M.J., Clement O., Wicker S., Gilfillan S., Beck S., Trowsdale J., and Bahram S. 2002. A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79:114-123.
- Rajagopalan S., Fu J., and Long E.O. 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol* 167:1877-1881.
- Randolph D.A., Carruthers C.J., Szabo S.J., Murphy K.M., and Chaplin D.D. 1999. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 162:2375-2383.
- Randolph D.A., Stephens R., Carruthers C.J., and Chaplin D.D. 1999. Cooperation between Th1 and Th2 cells in a murine model of eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 104:1021-1029.
- Rankin J.A. 1989. The contribution of alveolar macrophages to hyperreactive airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 83:722-729.
- Ranson T., Vosshenrich C.A., Corcuff E., Richard O., Muller W., and Di Santo J.P. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 101:4887-4893.

- Raulet D.H., and Vance R.E. 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6:520-531.
- Ravensberg A.J., Ricciardolo F.L., van Schadewijk A., Rabe K.F., Sterk P.J., Hiemstra P.S., and Mauad T. 2005. Eotaxin-2 and eotaxin-3 expression is associated with persistent eosinophilic bronchial inflammation in patients with asthma after allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 115:779-785.
- Read S., Malmstrom V., and Powrie F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192:295-302.
- Read S., Mauze S., Asseman C., Bean A., Coffman R., and Powrie F. 1998. CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur J Immunol* 28:3435-3447.
- Rees M.D., McNiven T.N., and Davies M.J. 2007. Degradation of extracellular matrix and its components by hypobromous acid. *Biochem J* 401:587-596.
- Rendon-Mitchell B., Ochani M., Li J., Han J., Wang H., Yang H., Susarla S., Czura C., Mitchell R.A., Chen G., Sama A.E., Tracey K.J., and Wang H. 2003. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol* 170:3890-3897.
- Rengarajan J., Mowen K.A., McBride K.D., Smith E.D., Singh H., and Glimcher L.H. 2002. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression. *J Exp Med* 195:1003-1012.
- Reynolds C., Barkans J., Clark P., Kariyawasam H., Altmann D., Kay B., and Boyton R. 2009. Natural killer T cells in bronchial biopsies from human allergen challenge model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 124:860-862; author reply 862.
- Rimoldi M., Chieppa M., Larghi P., Vulcano M., Allavena P., and Rescigno M. 2005. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood* 106:2818-2826.
- Riteau B., Barber D.F., and Long E.O. 2003. Vav1 phosphorylation is induced by beta2 integrin engagement on natural killer cells upstream of actin cytoskeleton and lipid raft reorganization. *J Exp Med* 198:469-474.
- Robinson B.W., Pinkston P., and Crystal R.G. 1984. Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent. *J Clin Invest* 74:942-950.
- Robinson D., Hamid Q., Bentley A., Ying S., Kay A.B., and Durham S.R. 1993. Activation of CD4+ T cells, increased TH2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92:313-324.
- Robinson D., Shibuya K., Mui A., Zonin F., Murphy E., Sana T., Hartley S.B., Menon S., Kastelein R., Bazan F., and O'Garra A. 1997. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 7:571-581.
- Robinson D.S., Ying S., Bentley A.M., Meng Q., North J., Durham S.R., Kay A.B., and Hamid Q. 1993. Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92:397-403.
- Robson N.C., Phillips D.J., McAlpine T., Shin A., Svobodova S., Toy T., Pillay V., Kirkpatrick N., Zanker D., Wilson K., Helling I., Wei H., Chen W., Cebon J., and Maraskovsky E. 2008. Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood* 111:2733-2743.
- Robson N.C., Wei H., McAlpine T., Kirkpatrick N., Cebon J., and Maraskovsky E. 2009. Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood* 113:3218-3225.
- Rochester C.L., Ackerman S.J., Zheng T., and Elias J.A. 1996. Eosinophil-fibroblast interactions. Granule major basic protein interacts with IL-1 and transforming growth factor-beta in the stimulation of lung fibroblast IL-6-type cytokine production. *J Immunol* 156:4449-4456.
- Rogers P.R., Song J., Gramaglia I., Killeen N., and Croft M. 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15:445-455.

- Rogge L., Barberis-Maino L., Biffi M., Passini N., Presky D.H., Gubler U., and Sinigaglia F. 1997. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185:825-831.
- Rojas-Ramos E., Avalos A.F., Perez-Fernandez L., Cuevas-Schacht F., Valencia-Maqueda E., and Teran L.M. 2003. Role of the chemokines RANTES, monocyte chemoattractant proteins-3 and -4, and eotaxins-1 and -2 in childhood asthma. *Eur Respir J* 22:310-316.
- Romagnani C., Della Chiesa M., Kohler S., Moewes B., Radbruch A., Moretta L., Moretta A., and Thiel A. 2005. Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells. *Eur J Immunol* 35:2452-2458.
- Romagnani S. 2004. Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113:395-400.
- Roncarolo M.G., Bigler M., Haanen J.B., Yssel H., Bacchetta R., de Vries J.E., and Spits H. 1991. Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J Immunol* 147:781-787.
- Roncarolo M.G., Gregori S., Battaglia M., Bacchetta R., Fleischhauer K., and Levings M.K. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
- Rosen D.B., Araki M., Hamerman J.A., Chen T., Yamamura T., and Lanier L.L. 2004. A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D. *J Immunol* 173:2470-2478.
- Rosen H., and Goetzl E.J. 2005. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5:560-570.
- Rosenberg H.F., Phipps S., and Foster P.S. 2007. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119:1303-1310; quiz 1311-1302.
- Rosmaraki E.E., Douagi I., Roth C., Colucci F., Cumano A., and Di Santo J.P. 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* 31:1900-1909.
- Rossi A.G., Haslett C., Hirani N., Greening A.P., Rahman I., Metz C.N., Bucala R., and Donnelly S.C. 1998. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. *J Clin Invest* 101:2869-2874.
- Rossi D.L., Vicari A.P., Franz-Bacon K., McClanahan T.K., and Zlotnik A. 1997. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. *J Immunol* 158:1033-1036.
- Rot A., and von Andrian U.H. 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 22:891-928.
- Rothenberg M.E., and Hogan S.P. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174.
- Rothenberg M.E., MacLean J.A., Pearlman E., Luster A.D., and Leder P. 1997. Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 185:785-790.
- Rothenberg M.E., Owen W.F., Jr., Silberstein D.S., Woods J., Soberman R.J., Austen K.F., and Stevens R.L. 1988. Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3. *J Clin Invest* 81:1986-1992.
- Roy S., Barnes P.F., Garg A., Wu S., Cosman D., and Vankayalapati R. 2008. NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen. *J Immunol* 180:1729-1736.

S

- Saito S., Kasahara T., Sakakura S., Enomoto M., Umekage H., Harada N., Morii T., Nishikawa K., Narita N., and Ichijo M. 1994. Interleukin-8 production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Biochem Biophys Res Commun* 200:378-383.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., and Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a

- single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Sakahira H., Enari M., and Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
- Salazar-Mather T.P., Hamilton T.A., and Biron C.A. 2000. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J Clin Invest* 105:985-993.
- Sallusto F., Lanzavecchia A., and Mackay C.R. 1998. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19:568-574.
- Sallusto F., Lenig D., Mackay C.R., and Lanzavecchia A. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187:875-883.
- Sallusto F., Mackay C.R., and Lanzavecchia A. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005-2007.
- Sallusto F., Palermo B., Lenig D., Miettinen M., Matikainen S., Julkunen I., Forster R., Burgstahler R., Lipp M., and Lanzavecchia A. 1999. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29:1617-1625.
- Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., and Bluestone J.A. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
- Samaridis J., and Colonna M. 1997. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 27:660-665.
- Samson S.I., Richard O., Tavian M., Ranson T., Vosshenrich C.A., Colucci F., Buer J., Grosveld F., Godin I., and Di Santo J.P. 2003. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19:701-711.
- Sanderson C.J. 1992. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood* 79:3101-3109.
- Sanos S.L., Bui V.L., Mortha A., Oberle K., Heners C., Johner C., and Diefenbach A. 2009. RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 10:83-91.
- Santarasci V., Maggi E., Capone M., Frosali F., Querci V., De Palma R., Liotta F., Cosmi L., Maggi E., Romagnani S., and Annunziato F. 2009. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur J Immunol* 39:207-215.
- Santourlidis S., Trompeter H.I., Weinhold S., Eisermann B., Meyer K.L., Wernet P., and Uhrberg M. 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 169:4253-4261.
- Sato K., Hida S., Takayanagi H., Yokochi T., Kayagaki N., Takeda K., Yagita H., Okumura K., Tanaka N., Taniguchi T., and Ogasawara K. 2001. Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta. *Eur J Immunol* 31:3138-3146.
- Satoh-Takayama N., Dumoutier L., Lesjean-Pottier S., Ribeiro V.S., Mandelboim O., Renauld J.C., Vosshenrich C.A., and Di Santo J.P. 2009. The natural cytotoxicity receptor NKp46 is dispensable for IL-22-mediated innate intestinal immune defense against *Citrobacter rodentium*. *J Immunol* 183:6579-6587.
- Satoh-Takayama N., Vosshenrich C.A., Lesjean-Pottier S., Sawa S., Lochner M., Rattis F., Mention J.J., Thiam K., Cerf-Bensussan N., Mandelboim O., Eberl G., and Di Santo J.P. 2008. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 29:958-970.
- Sawaki J., Tsutsui H., Hayashi N., Yasuda K., Akira S., Tanizawa T., and Nakanishi K. 2007. Type 1 cytokine/chemokine production by mouse NK cells following activation of their TLR/MyD88-mediated pathways. *Int Immunol* 19:311-320.
- Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.M., Kramer P.H., and Peter M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17:1675-1687.

- Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., and Cassatella M.A. 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195-203.
- Scapini P., Laudanna C., Pinardi C., Allavena P., Mantovani A., Sozzani S., and Cassatella M.A. 2001. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* 31:1981-1988.
- Scharton-Kersten T., Afonso L.C., Wysocka M., Trinchieri G., and Scott P. 1995. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 154:5320-5330.
- Scheicher M.E., Teixeira M.M., Cunha F.Q., Teixeira A.L., Jr., Filho J.T., and Vianna E.O. 2007. Eotaxin-2 in sputum cell culture to evaluate asthma inflammation. *Eur Respir J* 29:489-495.
- Schleimer R.P., Sterbinsky S.A., Kaiser J., Bickel C.A., Klunk D.A., Tomioka K., Newman W., Luscinikas F.W., Gimbrone M.A., Jr., McIntyre B.W., and et al. 1992. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol* 148:1086-1092.
- Schmidt K.N., Leung B., Kwong M., Zarembek K.A., Satyal S., Navas T.A., Wang F., and Godowski P.J. 2004. APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. *J Immunol* 172:138-143.
- Schmitt E., Van Brandwijk R., Van Snick J., Siebold B., and Rude E. 1989. TCGF III/P40 is produced by naive murine CD4+ T cells but is not a general T cell growth factor. *Eur J Immunol* 19:2167-2170.
- Schmitz J., Owyang A., Oldham E., Song Y., Murphy E., McClanahan T.K., Zurawski G., Moshrefi M., Qin J., Li X., Gorman D.M., Bazan J.F., and Kastelein R.A. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
- Schnyder-Candrian S., Togbe D., Couillin I., Mercier I., Brombacher F., Quesniaux V., Fossiez F., Ryffel B., and Schnyder B. 2006. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 203:2715-2725.
- Schrambach S., Ardizzone M., Leymarie V., Sibilia J., and Bahram S. 2007. In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* 2:e518.
- Schraufstatter I., Takamori H., Sikora L., Sriramarao P., and DiScipio R.G. 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.
- Schroeder J.T. 2009. Basophils beyond effector cells of allergic inflammation. *Adv Immunol* 101:123-161.
- Schuh J.M., Power C.A., Proudfoot A.E., Kunkel S.L., Lukacs N.W., and Hogaboam C.M. 2002. Airway hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4^{-/-} mice. *FASEB J* 16:1313-1315.
- Schutyser E., Struyf S., Wuyts A., Put W., Geboes K., Grillet B., Opdenakker G., and Van Damme J. 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.
- Scordamaglia F., Balsamo M., Scordamaglia A., Moretta A., Mingari M.C., Canonica G.W., Moretta L., and Vitale M. 2008. Perturbations of natural killer cell regulatory functions in respiratory allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 121:479-485.
- Seaman W.E., Blackman M.A., Gindhart T.D., Roubinian J.R., Loeb J.M., and Talal N. 1978. beta-Estradiol reduces natural killer cells in mice. *J Immunol* 121:2193-2198.
- Sebastiani S., Allavena P., Albanesi C., Nasorri F., Bianchi G., Traidl C., Sozzani S., Girolomoni G., and Cavani A. 2001. Chemokine receptor expression and function in CD4+ T lymphocytes with regulatory activity. *J Immunol* 166:996-1002.
- Secrist H., Chelen C.J., Wen Y., Marshall J.D., and Umetsu D.T. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *J Exp Med* 178:2123-2130.

- Seder R.A., and Paul W.E. 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12:635-673.
- Sehmi R., Dorman S., Baatjes A., Watson R., Foley R., Ying S., Robinson D.S., Kay A.B., O'Byrne P.M., and Denburg J.A. 2003. Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology* 109:536-546.
- Sekiya T., Miyamasu M., Imanishi M., Yamada H., Nakajima T., Yamaguchi M., Fujisawa T., Pawankar R., Sano Y., Ohta K., Ishii A., Morita Y., Yamamoto K., Matsushima K., Yoshie O., and Hirai K. 2000. Inducible expression of a Th2-type CC chemokine thymus- and activation-regulated chemokine by human bronchial epithelial cells. *J Immunol* 165:2205-2213.
- Sel S., Wegmann M., Dicke T., Sel S., Henke W., Yildirim A.O., Renz H., and Garn H. 2008. Effective prevention and therapy of experimental allergic asthma using a GATA-3-specific DNzyme. *J Allergy Clin Immunol* 121:910-916 e915.
- Semino C., Angelini G., Poggi A., and Rubartelli A. 2005. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 106:609-616.
- Semino C., Ceccarelli J., Lotti L.V., Torrisi M.R., Angelini G., and Rubartelli A. 2007. The maturation potential of NK cell clones toward autologous dendritic cells correlates with HMGB1 secretion. *J Leukoc Biol* 81:92-99.
- Sergejeva S., Ivanov S., Lotvall J., and Linden A. 2005. Interleukin-17 as a recruitment and survival factor for airway macrophages in allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:248-253.
- Shalit M., Sekhsaria S., and Malech H.L. 1995. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cell Immunol* 160:50-57.
- Shen H.H., Xu F., Zhang G.S., Wang S.B., and Xu W.H. 2006. CCR3 monoclonal antibody inhibits airway eosinophilic inflammation and mucus overproduction in a mouse model of asthma. *Acta Pharmacol Sin* 27:1594-1599.
- Shevach E.M. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J Exp Med* 193:F41-46.
- Shi H.Z. 2004. Eosinophils function as antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 76:520-527.
- Shi H.Z., Humbles A., Gerard C., Jin Z., and Weller P.F. 2000. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest* 105:945-953.
- Shi H.Z., Xiao C.Q., Li C.Q., Mo X.Y., Yang Q.L., Leng J., and Chen Y.Q. 2004. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. *Allergy* 59:428-435.
- Shi H.Z., Xiao C.Q., Zhong D., Qin S.M., Liu Y., Liang G.R., Xu H., Chen Y.Q., Long X.M., and Xie Z.F. 1998. Effect of inhaled interleukin-5 on airway hyperreactivity and eosinophilia in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 157:204-209.
- Shilling H.G., McQueen K.L., Cheng N.W., Shizuru J.A., Negrin R.S., and Parham P. 2003. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 101:3730-3740.
- Shilling H.G., Young N., Guethlein L.A., Cheng N.W., Gardiner C.M., Tyan D., and Parham P. 2002. Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol* 169:239-247.
- Shimoda K., van Deursen J., Sangster M.Y., Sarawar S.R., Carson R.T., Tripp R.A., Chu C., Quelle F.W., Nosaka T., Vignali D.A., Doherty P.C., Grosveld G., Paul W.E., and Ihle J.N. 1996. Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 380:630-633.
- Simhadri V.R., Reiners K.S., Hansen H.P., Topolar D., Simhadri V.L., Nohroudi K., Kufer T.A., Engert A., and Pogge von Strandmann E. 2008. Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE* 3:e3377.
- Simon A.K., Jones E., Richards H., Wright K., Betts G., Godkin A., Screaton G., and Gallimore A. 2007. Regulatory T cells inhibit Fas ligand-induced innate and adaptive tumour immunity. *Eur J Immunol* 37:758-767.

- Simson L., and Foster P.S. 2000. Chemokine and cytokine cooperativity: eosinophil migration in the asthmatic response. *Immunol Cell Biol* 78:415-422.
- Sin A.Z., Roche E.M., Togias A., Lichtenstein L.M., and Schroeder J.T. 2001. Nerve growth factor or IL-3 induces more IL-13 production from basophils of allergic subjects than from basophils of nonallergic subjects. *J Allergy Clin Immunol* 108:387-393.
- Sin B., Misirligil Z., Aybay C., Gurbuz L., and Imir T. 1996. Effect of allergen specific immunotherapy (IT) on natural killer cell activity (NK), IgE, IFN-gamma levels and clinical response in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 6:341-347.
- Sivori S., Cantoni C., Parolini S., Marcenaro E., Conte R., Moretta L., and Moretta A. 2003. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol* 33:3439-3447.
- Sivori S., Falco M., Carlomagno S., Romeo E., Moretta L., and Moretta A. 2007. Heterogeneity of TLR3 mRNA transcripts and responsiveness to poly (I:C) in human NK cells derived from different donors. *Int Immunol* 19:1341-1348.
- Sivori S., Falco M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Vitale M., Moretta L., and Moretta A. 2004. CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10116-10121.
- Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R., and Martin S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144:281-292.
- Smit J.J., and Lukacs N.W. 2006. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 533:277-288.
- Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iizuka K., Furukawa H., Beckman D.L., Pingel J.T., Scalzo A.A., Fremont D.H., and Yokoyama W.M. 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8826-8831.
- Smith K.M., Wu J., Bakker A.B., Phillips J.H., and Lanier L.L. 1998. Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *J Immunol* 161:7-10.
- Smithgall M.D., Comeau M.R., Yoon B.R., Kaufman D., Armitage R., and Smith D.E. 2008. IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20:1019-1030.
- Smits H.H., van Beelen A.J., Hessle C., Westland R., de Jong E., Soeteman E., Wold A., Wierenga E.A., and Kapsenberg M.L. 2004. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol* 34:1371-1380.
- Smyth M.J., Cretney E., Kelly J.M., Westwood J.A., Street S.E., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S.L., Degli-Esposti M.A., and Hayakawa Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42:501-510.
- Smyth M.J., Cretney E., Takeda K., Wiltrot R.H., Sedger L.M., Kayagaki N., Yagita H., and Okumura K. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193:661-670.
- Smyth M.J., Teng M.W., Swann J., Kyparissoudis K., Godfrey D.I., and Hayakawa Y. 2006. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 176:1582-1587.
- Sokol C.L., Barton G.M., Farr A.G., and Medzhitov R. 2007. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*.
- Somersalo K., Carpen O., and Saksela E. 1994. Stimulated natural killer cells secrete factors with chemotactic activity, including NAP-1/IL-8, which supports VLA-4- and VLA-5-mediated migration of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24:2957-2965.

- Sonderegger I., Iezzi G., Maier R., Schmitz N., Kurrer M., and Kopf M. 2008. GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med* 205:2281-2294.
- Sonderegger I., Kisielow J., Meier R., King C., and Kopf M. 2008. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* 38:1833-1838.
- Song C., Luo L., Lei Z., Li B., Liang Z., Liu G., Li D., Zhang G., Huang B., and Feng Z.H. 2008. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181:6117-6124.
- Sornasse T., Larenas P.V., Davis K.A., de Vries J.E., and Yssel H. 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 184:473-483.
- Soumelis V., Reche P.A., Kanzler H., Yuan W., Edward G., Homey B., Gilliet M., Ho S., Antonenko S., Lauerma A., Smith K., Gorman D., Zurawski S., Abrams J., Menon S., McClanahan T., de Waal-Malefyt R.D., Bazan F., Kastelein R.A., and Liu Y.J. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3:673-680.
- Sousa A.R., Lane S.J., Nakhosteen J.A., Lee T.H., and Poston R.N. 1996. Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1061-1066.
- Spinozzi F., and Porcelli S.A. 2007. Recognition of lipids from pollens by CD1-restricted T cells. *Immunol Allergy Clin North Am* 27:79-92.
- St-Laurent J., Turmel V., Boulet L.P., and Bissonnette E. 2009. Alveolar macrophage subpopulations in bronchoalveolar lavage and induced sputum of asthmatic and control subjects. *J Asthma* 46:1-8.
- Steinle A., Li P., Morris D.L., Groh V., Lanier L.L., Strong R.K., and Spies T. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53:279-287.
- Stellato C., Matsukura S., Fal A., White J., Beck L.A., Proud D., and Schleimer R.P. 1999. Differential regulation of epithelial-derived C-C chemokine expression by IL-4 and the glucocorticoid budesonide. *J Immunol* 163:5624-5632.
- Stewart C.A., Laugier-Anfossi F., Vely F., Saulquin X., Riedmuller J., Tisserant A., Gauthier L., Romagne F., Ferracci G., Arosa F.A., Moretta A., Sun P.D., Ugolini S., and Vivier E. 2005. Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13224-13229.
- Stock P., Lombardi V., Kohlrantz V., and Akbari O. 2009. Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. *J Immunol* 182:5116-5122.
- Struyf S., Schutyser E., Gouwy M., Gijssbers K., Proost P., Benoit Y., Opdenakker G., Van Damme J., and Laureys G. 2003. PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 163:2065-2075.
- Sugawara S., Uehara A., Nochi T., Yamaguchi T., Ueda H., Sugiyama A., Hanzawa K., Kumagai K., Okamura H., and Takada H. 2001. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol* 167:6568-6575.
- Sun Y.C., Zhou Q.T., and Yao W.Z. 2005. Sputum interleukin-17 is increased and associated with airway neutrophilia in patients with severe asthma. *Chin Med J (Engl)* 118:953-956.
- Sundstedt A., O'Neill E.J., Nicolson K.S., and Wraith D.C. 2003. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 170:1240-1248.
- Sung S.S., Fu S.M., Rose C.E., Jr., Gaskin F., Ju S.T., and Beaty S.R. 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176:2161-2172.
- Suto A., Nakajima H., Kagami S.I., Suzuki K., Saito Y., and Iwamoto I. 2001. Role of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in T helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 164:680-687.

- Sutton V.R., Davis J.E., Cancilla M., Johnstone R.W., Ruefli A.A., Sedelies K., Browne K.A., and Trapani J.A. 2000. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 192:1403-1414.
- Suzukawa M., Iikura M., Koketsu R., Nagase H., Tamura C., Komiya A., Nakae S., Matsushima K., Ohta K., Yamamoto K., and Yamaguchi M. 2008. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* 181:5981-5989.
- Suzukawa M., Koketsu R., Iikura M., Nakae S., Matsumoto K., Nagase H., Saito H., Matsushima K., Ohta K., Yamamoto K., and Yamaguchi M. 2008. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 88:1245-1253.
- Suzuki N., Suzuki T., and Engleman E.G. 1991. Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1451-1461.
- Swain S.L., Weinberg A.D., English M., and Huston G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145:3796-3806.
- Sylvin H., Dahlback M., Van Der Ploeg I., and Alving K. 2002. The tryptase inhibitor APC-366 reduces the acute airway response to allergen in pigs sensitized to *Ascaris suum*. *Clin Exp Allergy* 32:967-971.
- Szabo S.J., Dighe A.S., Gubler U., and Murphy K.M. 1997. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185:817-824.
- Szabo S.J., Kim S.T., Costa G.L., Zhang X., Fathman C.G., and Glimcher L.H. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-669.

T

- Taha R., Hamid Q., Cameron L., and Olivenstein R. 2003. T helper type 2 cytokine receptors and associated transcription factors GATA-3, c-MAF, and signal transducer and activator of transcription factor-6 in induced sputum of atopic asthmatic patients. *Chest* 123:2074-2082.
- Taha R.A., Minshall E.M., Miotto D., Shimbara A., Luster A., Hogg J.C., and Hamid Q.A. 1999. Eotaxin and monocyte chemoattractant protein-4 mRNA expression in small airways of asthmatic and nonasthmatic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 103:476-483.
- Taieb J., Chaput N., Menard C., Apetoh L., Ullrich E., Bonmort M., Pequignot M., Casares N., Terme M., Flament C., Opolon P., Lecluse Y., Metivier D., Tomasello E., Vivier E., Ghiringhelli F., Martin F., Klatzmann D., Poynard T., Tursz T., Raposo G., Yagita H., Ryffel B., Kroemer G., and Zitvogel L. 2006. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 12:214-219.
- Takafuji S., Tadokoro K., Ito K., and Dahinden C.A. 1994. Degranulation from human eosinophils stimulated with C3a and C5a. *Int Arch Allergy Immunol* 104 Suppl 1:27-29.
- Takafuji S., Tadokoro K., Ito K., and Nakagawa T. 1998. Release of granule proteins from human eosinophils stimulated with mast-cell mediators. *Allergy* 53:951-956.
- Takeda K., Cretney E., Hayakawa Y., Ota T., Akiba H., Ogasawara K., Yagita H., Kinoshita K., Okumura K., and Smyth M.J. 2005. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105:2082-2089.
- Takeda K., Hamelmann E., Joetham A., Shultz L.D., Larsen G.L., Irvin C.G., and Gelfand E.W. 1997. Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. *J Exp Med* 186:449-454.
- Takeda K., Hayakawa Y., Smyth M.J., Kayagaki N., Yamaguchi N., Kakuta S., Iwakura Y., Yagita H., and Okumura K. 2001. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7:94-100.
- Takeda K., Tanaka T., Shi W., Matsumoto M., Minami M., Kashiwamura S., Nakanishi K., Yoshida N., Kishimoto T., and Akira S. 1996. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 380:627-630.

- Tamachi T., Maezawa Y., Ikeda K., Kagami S., Hatano M., Seto Y., Suto A., Suzuki K., Watanabe N., Saito Y., Tokuhisa T., Iwamoto I., and Nakajima H. 2006. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol* 118:606-614.
- Tanaka H., Demeure C.E., Rubio M., Delespesse G., and Sarfati M. 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* 192:405-412.
- Tang C., Inman M.D., van Rooijen N., Yang P., Shen H., Matsumoto K., and O'Byrne P.M. 2001. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 166:1471-1481.
- Tang Q., Henriksen K.J., Boden E.K., Tooley A.J., Ye J., Subudhi S.K., Zheng X.X., Strom T.B., and Bluestone J.A. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- Tang W., Geba G.P., Zheng T., Ray P., Homer R.J., Kuhn C., 3rd, Flavell R.A., and Elias J.A. 1996. Targeted expression of IL-11 in the murine airway causes lymphocytic inflammation, bronchial remodeling, and airways obstruction. *J Clin Invest* 98:2845-2853.
- Tangye S.G., Ferguson A., Avery D.T., Ma C.S., and Hodgkin P.D. 2002. Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol* 169:4298-4306.
- Tasaki Y., Fukuda S., Iio M., Miura R., Imai T., Sugano S., Yoshie O., Hughes A.L., and Nomiyama H. 1999. Chemokine PARC gene (SCYA18) generated by fusion of two MIP-1alpha/LD78alpha-like genes. *Genomics* 55:353-357.
- Tassi I., Le Friec G., Gilfillan S., Takai T., Yokoyama W.M., and Colonna M. 2009. DAP10 associates with Ly49 receptors but contributes minimally to their expression and function in vivo. *Eur J Immunol* 39:1129-1135.
- Taub D.D., Ortaldo J.R., Turcovski-Corrales S.M., Key M.L., Longo D.L., and Murphy W.J. 1996. Beta chemokines costimulate lymphocyte cytolysis, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol* 59:81-89.
- Taub D.D., Sayers T.J., Carter C.R., and Ortaldo J.R. 1995. Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytolysis. *J Immunol* 155:3877-3888.
- Taube C., Duez C., Cui Z.H., Takeda K., Rha Y.H., Park J.W., Balhorn A., Donaldson D.D., Dakhama A., and Gelfand E.W. 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 169:6482-6489.
- Taube C., Nick J.A., Siegmund B., Duez C., Takeda K., Rha Y.H., Park J.W., Joetham A., Poch K., Dakhama A., Dinarello C.A., and Gelfand E.W. 2004. Inhibition of early airway neutrophilia does not affect development of airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30:837-843.
- Terada N., Maesako K., Hamano N., Ikeda T., Sai M., Yamashita T., Fukuda S., and Konno A. 1996. RANTES production in nasal epithelial cells and endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 98:S230-237.
- Terada N., Nomura T., Kim W.J., Otsuka Y., Takahashi R., Kishi H., Yamashita T., Sugawara N., Fukuda S., Ikeda-Ito T., and Konno A. 2001. Expression of C-C chemokine TARC in human nasal mucosa and its regulation by cytokines. *Clin Exp Allergy* 31:1923-1931.
- Teran L.M., Mochizuki M., Bartels J., Valencia E.L., Nakajima T., Hirai K., and Schroder J.M. 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* 20:777-786.
- Terashima A., Watarai H., Inoue S., Sekine E., Nakagawa R., Hase K., Iwamura C., Nakajima H., Nakayama T., and Taniguchi M. 2008. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med* 205:2727-2733.
- Terme M., Chaput N., Combadiere B., Ma A., Ohteki T., and Zitvogel L. 2008. Regulatory T cells control dendritic cell/NK cell cross-talk in lymph nodes at the steady state by inhibiting CD4+ self-reactive T cells. *J Immunol* 180:4679-4686.

- Theilgaard-Monch K., Porse B.T., and Borregaard N. 2006. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr Opin Immunol* 18:54-60.
- Thierfelder W.E., van Deursen J.M., Yamamoto K., Tripp R.A., Sarawar S.R., Carson R.T., Sangster M.Y., Vignali D.A., Doherty P.C., Grosveld G.C., and Ihle J.N. 1996. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 382:171-174.
- Thieu V.T., Yu Q., Chang H.C., Yeh N., Nguyen E.T., Sehra S., and Kaplan M.H. 2008. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. *Immunity* 29:679-690.
- Thomas D.A., Du C., Xu M., Wang X., and Ley T.J. 2000. DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12:621-632.
- Thomas M.S., Kunkel S.L., and Lukacs N.W. 2002. Differential role of IFN-gamma-inducible protein 10 kDa in a cockroach antigen-induced model of allergic airway hyperreactivity: systemic versus local effects. *J Immunol* 169:7045-7053.
- Thomas M.S., Kunkel S.L., and Lukacs N.W. 2004. Regulation of cockroach antigen-induced allergic airway hyperreactivity by the CXCR3 ligand CXCL9. *J Immunol* 173:615-623.
- Thornhill M.H., Kyan-Aung U., and Haskard D.O. 1990. IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J Immunol* 144:3060-3065.
- Timmer T., de Vries E.G., and de Jong S. 2002. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol* 196:125-134.
- Timonen T., and Stenius-Aarniala B. 1985. Natural killer cell activity in asthma. *Clin Exp Immunol* 59:85-90.
- Tkaczyk C., Okayama Y., Woolhiser M.R., Hagaman D.D., Gilfillan A.M., and Metcalfe D.D. 2002. Activation of human mast cells through the high affinity IgG receptor. *Mol Immunol* 38:1289-1293.
- Tomassini M., Tsicopoulos A., Tai P.C., Gruart V., Tonnel A.B., Prin L., Capron A., and Capron M. 1991. Release of granule proteins by eosinophils from allergic and nonallergic patients with eosinophilia on immunoglobulin-dependent activation. *J Allergy Clin Immunol* 88:365-375.
- Tomescu C., Chehimi J., Maino V.C., and Montaner L.J. 2009. Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation. *J Leukoc Biol* 85:871-876.
- Tominaga K., Yoshimoto T., Torigoe K., Kurimoto M., Matsui K., Hada T., Okamura H., and Nakanishi K. 2000. IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells. *Int Immunol* 12:151-160.
- Toomey J.A., Gays F., Foster D., and Brooks C.G. 2003. Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro. *J Leukoc Biol* 74:233-242.
- Topham N.J., and Hewitt E.W. 2009. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 128:7-15.
- Toru H., Ra C., Nonoyama S., Suzuki K., Yata J., and Nakahata T. 1996. Induction of the high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) on human mast cells by IL-4. *Int Immunol* 8:1367-1373.
- Trinchieri G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47:187-376.
- Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
- Trinchieri G., Pflanz S., and Kastelein R.A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641-644.
- Trinchieri G., and Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 7:179-190.
- Trundley A., and Moffett A. 2004. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 63:1-12.
- Tsicopoulos A., Shimbara A., de Nadai P., Aldewachi O., Lamblin C., Lassalle P., Walls A.F., Senechal S., Levitt R.C., Darras J., Hamid Q., and Wallaert B. 2004. Involvement of IL-9 in the bronchial phenotype of patients with nasal polyposis. *J Allergy Clin Immunol* 113:462-469.
- Tsujimoto H., Uchida T., Efron P.A., Scumpia P.O., Verma A., Matsumoto T., Tschoeke S.K., Ungaro R.F., Ono S., Seki S., Clare-Salzler M.J., Baker H.V., Mochizuki H., Ramphal R., and Moldawer

- L.L. 2005. Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *J Leukoc Biol* 78:888-897.
- Tsujimura Y., Obata K., Mukai K., Shindou H., Yoshida M., Nishikado H., Kawano Y., Minegishi Y., Shimizu T., and Karasuyama H. 2008. Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 28:581-589.
- Tsutsui H., Kayagaki N., Kuida K., Nakano H., Hayashi N., Takeda K., Matsui K., Kashiwamura S., Hada T., Akira S., Yagita H., Okamura H., and Nakanishi K. 1999. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 11:359-367.
- Tuder R.M., and Yun J.H. 2008. Vascular endothelial growth factor of the lung: friend or foe. *Curr Opin Pharmacol* 8:255-260.

U

- Ugucioni M., Mackay C.R., Ochensberger B., Loetscher P., Rhis S., LaRosa G.J., Rao P., Ponath P.D., Baggiolini M., and Dahinden C.A. 1997. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* 100:1137-1143.
- Underwood D.C., Osborn R.R., Kotzer C.J., Adams J.L., Lee J.C., Webb E.F., Carpenter D.C., Bochnowicz S., Thomas H.C., Hay D.W., and Griswold D.E. 2000. SB 239063, a potent p38 MAP kinase inhibitor, reduces inflammatory cytokine production, airways eosinophil infiltration, and persistence. *J Pharmacol Exp Ther* 293:281-288.
- Upham J.W., Denburg J.A., and O'Byrne P.M. 2002. Rapid response of circulating myeloid dendritic cells to inhaled allergen in asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 32:818-823.
- Uyttenhove C., Simpson R.J., and Van Snick J. 1988. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6934-6938.

V

- Vadas P., Gold M., Perelman B., Liss G.M., Lack G., Blyth T., Simons F.E., Simons K.J., Cass D., and Yeung J. 2008. Platelet-activating factor, PAF acetylhydrolase, and severe anaphylaxis. *N Engl J Med* 358:28-35.
- Valiante N.M., Phillips J.H., Lanier L.L., and Parham P. 1996. Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC-gamma signaling complex in human natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 184:2243-2250.
- Valiante N.M., Uhrberg M., Shilling H.G., Lienert-Weidenbach K., Arnett K.L., D'Andrea A., Phillips J.H., Lanier L.L., and Parham P. 1997. Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity* 7:739-751.
- van der Meer A., Lukassen H.G., van Lierop M.J., Wijnands F., Mosselman S., Braat D.D., and Joosten I. 2004. Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells. *Mol Hum Reprod* 10:189-195.
- Van Hove C.L., Maes T., Joos G.F., and Tournoy K.G. 2007. Prolonged inhaled allergen exposure can induce persistent tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:573-584.
- van Rijt L.S., Jung S., Kleinjan A., Vos N., Willart M., Duez C., Hoogsteden H.C., and Lambrecht B.N. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201:981-991.
- van Rijt L.S., Prins J.B., Leenen P.J., Thielemans K., de Vries V.C., Hoogsteden H.C., and Lambrecht B.N. 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* 100:3663-3671.
- van Rijt L.S., Vos N., Hijdra D., de Vries V.C., Hoogsteden H.C., and Lambrecht B.N. 2003. Airway eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T cells. *J Immunol* 171:3372-3378.
- Vance R.E., Kraft J.R., Altman J.D., Jensen P.E., and Raulet D.H. 1998. Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 188:1841-1848.
- Varney V.A., Hamid Q.A., Gaga M., Ying S., Jacobson M., Frew A.J., Kay A.B., and Durham S.R. 1993. Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses. *J Clin Invest* 92:644-651.
- Veldhoen M., Hocking R.J., Atkins C.J., Locksley R.M., and Stockinger B. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
- Vella A., Teague T.K., Ihle J., Kappler J., and Marrack P. 1997. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *J Exp Med* 186:325-330.
- Venge P., Bystrom J., Carlson M., Hakansson L., Karawaczyk M., Peterson C., Seveus L., and Trulsson A. 1999. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* 29:1172-1186.
- Vercelli D., Jabara H.H., Lee B.W., Woodland N., Geha R.S., and Leung D.Y. 1988. Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon R2/CD23 on normal human monocytes. *J Exp Med* 167:1406-1416.
- Vermaelen K., and Pauwels R. 2005. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 172:530-551.
- Vermeer P.D., Harson R., Einwalter L.A., Moninger T., and Zabner J. 2003. Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28:286-295.
- Vieira P.L., Christensen J.R., Minaee S., O'Neill E.J., Barrat F.J., Boonstra A., Barthlott T., Stockinger B., Wraith D.C., and O'Garra A. 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986-5993.
- Vijayanand P., Seumois G., Pickard C., Powell R.M., Angco G., Sammut D., Gadola S.D., Friedmann P.S., and Djukanovic R. 2007. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 356:1410-1422.
- Virchow J.C., Jr., Walker C., Hafner D., Kortsik C., Werner P., Matthys H., and Kroegel C. 1995. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151:960-968.
- Virchow J.C., Julius P., Lommatzsch M., Luttmann W., Renz H., and Braun A. 1998. Neurotrophins are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation. *Am J Respir Crit Care Med* 158:2002-2005.
- Vissers J.L., Hartgers F.C., Lindhout E., Teunissen M.B., Figdor C.G., and Adema G.J. 2001. Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol* 69:785-793.
- Vitale C., Chiossone L., Morreale G., Lanino E., Cottalasso F., Moretti S., Dini G., Moretta L., and Mingari M.C. 2004. Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Immunol* 34:455-460.
- Vitale M., Bottino C., Sivori S., Sanseverino L., Castriconi R., Marcenaro E., Augugliaro R., Moretta L., and Moretta A. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2072.

- Vitale M., Della Chiesa M., Carlomagno S., Pende D., Arico M., Moretta L., and Moretta A. 2005. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 106:566-571.
- Vivier E., Sorrell J.M., Ackerly M., Robertson M.J., Rasmussen R.A., Levine H., and Anderson P. 1993. Developmental regulation of a mucinlike glycoprotein selectively expressed on natural killer cells. *J Exp Med* 178:2023-2033.
- Volpe E., Servant N., Zollinger R., Bogiatzi S.I., Hupe P., Barillot E., and Soumelis V. 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* 9:650-657.
- Vossen M.T., Matmati M., Hertoghs K.M., Baars P.A., Gent M.R., Leclercq G., Hamann J., Kuijpers T.W., and van Lier R.A. 2008. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol* 180:3739-3745.
- Vosshenrich C.A., Garcia-Ojeda M.E., Samson-Villeger S.I., Pasqualetto V., Enault L., Richard-Le Goff O., Corcuff E., Guy-Grand D., Rocha B., Cumano A., Rogge L., Ezine S., and Di Santo J.P. 2006. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 7:1217-1224.
- Vosshenrich C.A., Lesjean-Pottier S., Hasan M., Richard-Le Goff O., Corcuff E., Mandelboim O., and Di Santo J.P. 2007. CD11cIb220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 204:2569-2578.
- Vosshenrich C.A., Ranson T., Samson S.I., Corcuff E., Colucci F., Rosmaraki E.E., and Di Santo J.P. 2005. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol* 174:1213-1221.
- Vulcano M., Struyf S., Scapini P., Cassatella M., Bernasconi S., Bonecchi R., Calleri A., Penna G., Adorini L., Luini W., Mantovani A., Van Damme J., and Sozzani S. 2003. Unique regulation of CCL18 production by maturing dendritic cells. *J Immunol* 170:3843-3849.

W

- Wagner C.S., Ljunggren H.G., and Achour A. 2008. Immune modulation by the human cytomegalovirus-encoded molecule UL18, a mystery yet to be solved. *J Immunol* 180:19-24.
- Wahl S.M., Hunt D.A., Wakefield L.M., McCartney-Francis N., Wahl L.M., Roberts A.B., and Sporn M.B. 1987. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5788-5792.
- Wakashin H., Hirose K., Maezawa Y., Kagami S., Suto A., Watanabe N., Saito Y., Hatano M., Tokuhisa T., Iwakura Y., Puccetti P., Iwamoto I., and Nakajima H. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1023-1032.
- Wald O., Weiss I.D., Wald H., Shoham H., Bar-Shavit Y., Beider K., Galun E., Weiss L., Flaishon L., Shachar I., Nagler A., Lu B., Gerard C., Gao J.L., Mishani E., Farber J., and Peled A. 2006. IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs. *J Immunol* 176:4716-4729.
- Walker C., Checkel J., Cammisuli S., Leibson P.J., and Gleich G.J. 1998. IL-5 production by NK cells contributes to eosinophil infiltration in a mouse model of allergic inflammation. *J Immunol* 161:1962-1969.
- Walker C., Kaegi M.K., Braun P., and Blaser K. 1991. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 88:935-942.

- Walter D.M., McIntire J.J., Berry G., McKenzie A.N., Donaldson D.D., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. 2001. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 167:4668-4675.
- Walter D.M., Wong C.P., DeKruyff R.H., Berry G.J., Levy S., and Umetsu D.T. 2001. IL-18 gene transfer by adenovirus prevents the development of and reverses established allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 166:6392-6398.
- Walzer T., Blery M., Chaix J., Fuseri N., Chasson L., Robbins S.H., Jaeger S., Andre P., Gauthier L., Daniel L., Chemin K., Morel Y., Dalod M., Imbert J., Pierres M., Moretta A., Romagne F., and Vivier E. 2007. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3384-3389.
- Walzer T., Chiossone L., Chaix J., Calver A., Carozzo C., Garrigue-Antar L., Jacques Y., Baratin M., Tomasello E., and Vivier E. 2007. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* 8:1337-1344.
- Walzer T., Dalod M., Robbins S.H., Zitvogel L., and Vivier E. 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106:2252-2258.
- Wan Y.Y., and Flavell R.A. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
- Wang C.C., Fu C.L., Yang Y.H., Lo Y.C., Wang L.C., Chuang Y.H., Chang D.M., and Chiang B.L. 2006. Adenovirus expressing interleukin-1 receptor antagonist alleviates allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Gene Ther* 13:1414-1421.
- Wang J., Homer R.J., Chen Q., and Elias J.A. 2000. Endogenous and exogenous IL-6 inhibit aeroallergen-induced Th2 inflammation. *J Immunol* 165:4051-4061.
- Wang J., Homer R.J., Hong L., Cohn L., Lee C.G., Jung S., and Elias J.A. 2000. IL-11 selectively inhibits aeroallergen-induced pulmonary eosinophilia and Th2 cytokine production. *J Immunol* 165:2222-2231.
- Wang K.S., Frank D.A., and Ritz J. 2000. Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* 95:3183-3190.
- Wang S.Y., Yang M., Xu X.P., Qiu G.F., Ma J., Wang S.J., Huang X.X., and Xu H.X. 2008. Intranasal delivery of T-bet modulates the profile of helper T cell immune responses in experimental asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* 18:357-365.
- Wang Y.H., Angkasekwinai P., Lu N., Voo K.S., Arima K., Hanabuchi S., Hippe A., Corrigan C.J., Dong C., Homey B., Yao Z., Ying S., Huston D.P., and Liu Y.J. 2007. IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 204:1837-1847.
- Wardlaw A.J., Dunnette S., Gleich G.J., Collins J.V., and Kay A.B. 1988. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 137:62-69.
- Wardlaw A.J., Hay H., Cromwell O., Collins J.V., and Kay A.B. 1989. Leukotrienes, LTC4 and LTB4, in bronchoalveolar lavage in bronchial asthma and other respiratory diseases. *J Allergy Clin Immunol* 84:19-26.
- Wardlaw A.J., Moqbel R., Cromwell O., and Kay A.B. 1986. Platelet-activating factor. A potent chemotactic and chemokinetic factor for human eosinophils. *J Clin Invest* 78:1701-1706.
- Warren H.S., Jones A.L., Freeman C., Bettadapura J., and Parish C.R. 2005. Evidence that the cellular ligand for the human NK cell activation receptor NKp30 is not a heparan sulfate glycosaminoglycan. *J Immunol* 175:207-212.
- Waterhouse N.J., Sedelies K.A., Browne K.A., Wowk M.E., Newbold A., Sutton V.R., Clarke C.J., Oliaro J., Lindemann R.K., Bird P.I., Johnstone R.W., and Trapani J.A. 2005. A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280:4476-4482.
- Watt S.V., Andrews D.M., Takeda K., Smyth M.J., and Hayakawa Y. 2008. IFN-gamma-dependent recruitment of mature CD27(high) NK cells to lymph nodes primed by dendritic cells. *J Immunol* 181:5323-5330.

- Watts T.H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23:23-68.
- Wehrmann W., Reinhold U., Kukel S., Franke N., Uerlich M., and Kreysel H.W. 1990. Selective alterations in natural killer cell subsets in patients with atopic dermatitis. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92:318-322.
- Wei H., Zhang J., Xiao W., Feng J., Sun R., and Tian Z. 2005. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J Allergy Clin Immunol* 115:841-847.
- Wei J., Duramad O., Perng O.A., Reiner S.L., Liu Y.J., and Qin F.X. 2007. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18169-18174.
- Wenzel S.E., Schwartz L.B., Langmack E.L., Halliday J.L., Trudeau J.B., Gibbs R.L., and Chu H.W. 1999. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 160:1001-1008.
- Weskamp G., Ford J.W., Sturgill J., Martin S., Docherty A.J., Swendeman S., Broadway N., Hartmann D., Saftig P., Umland S., Sehara-Fujisawa A., Black R.A., Ludwig A., Becherer J.D., Conrad D.H., and Blobel C.P. 2006. ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol* 7:1293-1298.
- Westgaard I.H., Berg S.F., Orstavik S., Fossum S., and Dissen E. 1998. Identification of a human member of the Ly-49 multigene family. *Eur J Immunol* 28:1839-1846.
- White M.V. 1990. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 86:599-605.
- White S.R., Fischer B.M., Marroquin B.A., and Stern R. 2008. Interleukin-1beta mediates human airway epithelial cell migration via NF-kappaB. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295:L1018-1027.
- Widney D.P., Hu Y., Foreman-Wykert A.K., Bui K.C., Nguyen T.T., Lu B., Gerard C., Miller J.F., and Smith J.B. 2005. CXCR3 and its ligands participate in the host response to Bordetella bronchiseptica infection of the mouse respiratory tract but are not required for clearance of bacteria from the lung. *Infect Immun* 73:485-493.
- Wikstrom M.E., and Stumbles P.A. 2007. Mouse respiratory tract dendritic cell subsets and the immunological fate of inhaled antigens. *Immunol Cell Biol* 85:182-188.
- Wild J.S., Sigounas A., Sur N., Siddiqui M.S., Alam R., Kurimoto M., and Sur S. 2000. IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol* 164:2701-2710.
- Williams C.M., and Galli S.J. 2000. Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* 192:455-462.
- Williams J., Johnson S., Mascali J.J., Smith H., Rosenwasser L.J., and Borish L. 1992. Regulation of low affinity IgE receptor (CD23) expression on mononuclear phagocytes in normal and asthmatic subjects. *J Immunol* 149:2823-2829.
- Williams N.S., Moore T.A., Schatzle J.D., Puzanov I.J., Sivakumar P.V., Zlotnik A., Bennett M., and Kumar V. 1997. Generation of lytic natural killer 1.1+, Ly-49- cells from multipotential murine bone marrow progenitors in a stroma-free culture: definition of cytokine requirements and developmental intermediates. *J Exp Med* 186:1609-1614.
- Wills-Karp M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17:255-281.
- Wills-Karp M., Luyimbazi J., Xu X., Schofield B., Neben T.Y., Karp C.L., and Donaldson D.D. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282:2258-2261.
- Wilson J.L., Heffler L.C., Charo J., Scheynius A., Bejarano M.T., and Ljunggren H.G. 1999. Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J Immunol* 163:6365-6370.
- Wilson N.J., Boniface K., Chan J.R., McKenzie B.S., Blumenschein W.M., Mattson J.D., Basham B., Smith K., Chen T., Morel F., Lecron J.C., Kastelein R.A., Cua D.J., McClanahan T.K., Bowman

- E.P., and de Waal Malefyt R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8:950-957.
- Winchester B.G. 2001. Lysosomal membrane proteins. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A:11-19.
- Winter C.C., and Long E.O. 1997. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol* 158:4026-4028.
- Woerly G., Roger N., Loiseau S., and Capron M. 1999. Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *Int Arch Allergy Immunol* 118:95-97.
- Woerly G., Roger N., Loiseau S., Dombrowicz D., Capron A., and Capron M. 1999. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin a complexes. *J Exp Med* 190:487-495.
- Wong C.K., Ho C.Y., Ko F.W., Chan C.H., Ho A.S., Hui D.S., and Lam C.W. 2001. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clin Exp Immunol* 125:177-183.
- Wu C.Y., Demeure C., Kiniwa M., Gately M., and Delespesse G. 1993. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol* 151:1938-1949.
- Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., and Phillips J.H. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
- Wu K., Bi Y., Sun K., and Wang C. 2007. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell Mol Immunol* 4:269-275.

X

- Xiao T., Fujita H., Saeki H., Mitsui H., Sugaya M., Tada Y., Kakinuma T., Torii H., Nakamura K., Asahina A., and Tamaki K. 2003. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) produced by mouse epidermal Langerhans cells is upregulated by TNF-alpha and IL-4 and downregulated by IFN-gamma. *Cytokine* 23:126-132.
- Xu L., and Rothman P. 1994. IFN-gamma represses epsilon germline transcription and subsequently down-regulates switch recombination to epsilon. *Int Immunol* 6:515-521.

Y

- Yabe T., McSherry C., Bach F.H., Fisch P., Schall R.P., Sondel P.M., and Houchins J.P. 1993. A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins. *Immunogenetics* 37:455-460.
- Yago T., Tsukuda M., Fukushima H., Yamaoka H., Kurata-Miura K., Nishi T., and Minami M. 1998. IL-12 promotes the adhesion of NK cells to endothelial selectins under flow conditions. *J Immunol* 161:1140-1145.
- Yamaguchi M., Sayama K., Yano K., Lantz C.S., Noben-Trauth N., Ra C., Costa J.J., and Galli S.J. 1999. IgE enhances Fc epsilon receptor I expression and IgE-dependent release of histamine and lipid mediators from human umbilical cord blood-derived mast cells: synergistic effect of IL-4 and IgE on human mast cell Fc epsilon receptor I expression and mediator release. *J Immunol* 162:5455-5465.
- Yamamoto H., Sedgwick J.B., Vrtis R.F., and Busse W.W. 2000. The effect of transendothelial migration on eosinophil function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:379-388.
- Yamane H., Zhu J., and Paul W.E. 2005. Independent roles for IL-2 and GATA-3 in stimulating naive CD4+ T cells to generate a Th2-inducing cytokine environment. *J Exp Med* 202:793-804.
- Yamashita U., and Kuroda E. 2002. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol* 22:105-114.

- Yang J., Murphy T.L., Ouyang W., and Murphy K.M. 1999. Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur J Immunol* 29:548-555.
- Yang J., Zhu H., Murphy T.L., Ouyang W., and Murphy K.M. 2001. IL-18-stimulated GADD45 beta required in cytokine-induced, but not TCR-induced, IFN-gamma production. *Nat Immunol* 2:157-164.
- Yang L., Anderson D.E., Baecher-Allan C., Hastings W.D., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K., and Hafler D.A. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.
- Yang M., Hogan S.P., Mahalingam S., Pope S.M., Zimmermann N., Fulkerson P., Dent L.A., Young I.G., Matthaei K.I., Rothenberg M.E., and Foster P.S. 2003. Eotaxin-2 and IL-5 cooperate in the lung to regulate IL-13 production and airway eosinophilia and hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 112:935-943.
- Yang X.O., Pappu B.P., Nurieva R., Akimzhanov A., Kang H.S., Chung Y., Ma L., Shah B., Panopoulos A.D., Schluns K.S., Watowich S.S., Tian Q., Jetten A.M., and Dong C. 2008. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* 28:29-39.
- Yang Y., Bin W., Aksoy M.O., and Kelsen S.G. 2004. Regulation of interleukin-1beta and interleukin-1beta inhibitor release by human airway epithelial cells. *Eur Respir J* 24:360-366.
- Yang Y., Loy J., Ryseck R.P., Carrasco D., and Bravo R. 1998. Antigen-induced eosinophilic lung inflammation develops in mice deficient in chemokine eotaxin. *Blood* 92:3912-3923.
- Ying S., Humbert M., Barkans J., Corrigan C.J., Pfister R., Menz G., Larche M., Robinson D.S., Durham S.R., and Kay A.B. 1997. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 158:3539-3544.
- Ying S., Meng Q., Zeibecoglou K., Robinson D.S., Macfarlane A., Humbert M., and Kay A.B. 1999. Eosinophil chemotactic chemokines (eotaxin, eotaxin-2, RANTES, monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), and MCP-4), and C-C chemokine receptor 3 expression in bronchial biopsies from atopic and nonatopic (Intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 163:6321-6329.
- Yokota Y., Mansouri A., Mori S., Sugawara S., Adachi S., Nishikawa S., and Gruss P. 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature* 397:702-706.
- Yokoyama A., Kohno N., Fujino S., Hamada H., Inoue Y., Fujioka S., Ishida S., and Hiwada K. 1995. Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1354-1358.
- Yokoyama W.M., and Kim S. 2006. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* 24:249-257.
- Yokoyama W.M., and Kim S. 2006. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214:143-154.
- Yokoyama W.M., and Plougastel B.F. 2003. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* 3:304-316.
- Yoneda O., Imai T., Goda S., Inoue H., Yamauchi A., Okazaki T., Imai H., Yoshie O., Bloom E.T., Domae N., and Umehara H. 2000. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 164:4055-4062.
- Yoshida M., Leigh R., Matsumoto K., Wattie J., Ellis R., O'Byrne P.M., and Inman M.D. 2002. Effect of interferon-gamma on allergic airway responses in interferon-gamma-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med* 166:451-456.
- Yoshimoto T., Okamura H., Tagawa Y.I., Iwakura Y., and Nakanishi K. 1997. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3948-3953.

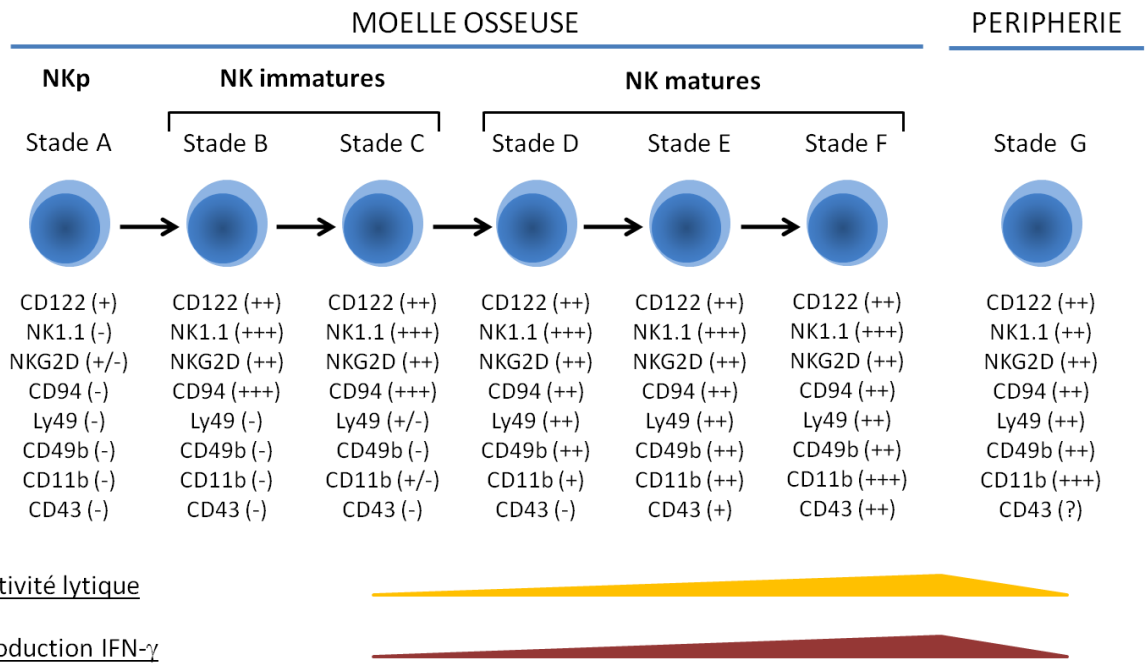
- Yoshimoto T., Tsutsui H., Tominaga K., Hoshino K., Okamura H., Akira S., Paul W.E., and Nakanishi K. 1999. IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13962-13966.
- Yu H., Fehniger T.A., Fuchshuber P., Thiel K.S., Vivier E., Carson W.E., and Caligiuri M.A. 1998. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood* 92:3647-3657.
- Yu J., Wei M., Mao H., Zhang J., Hughes T., Mitsui T., Park I.K., Hwang C., Liu S., Marcucci G., Trotta R., Benson D.M., Jr., and Caligiuri M.A. 2009. CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets. *J Immunol* 183:4968-4974.
- Yusa S., Catina T.L., and Campbell K.S. 2002. SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells. *J Immunol* 168:5047-5057.

Z

- Zagai U., Dadfar E., Lundahl J., Venge P., and Skold C.M. 2007. Eosinophil cationic protein stimulates TGF-beta1 release by human lung fibroblasts in vitro. *Inflammation* 30:153-160.
- Zagai U., Lundahl J., Klominek J., Venge P., and Skold C.M. 2009. Eosinophil cationic protein stimulates migration of human lung fibroblasts in vitro. *Scand J Immunol* 69:381-386.
- Zamai L., Ahmad M., Bennett I.M., Azzoni L., Alnemri E.S., and Perussia B. 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188:2375-2380.
- Zhang A.L., Colmenero P., Purath U., Teixeira de Matos C., Hueber W., Klareskog L., Tarner I.H., Engleman E.G., and Soderstrom K. 2007. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood* 110:2484-2493.
- Zhang D., Beresford P.J., Greenberg A.H., and Lieberman J. 2001. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5746-5751.
- Zhang D., Pasternack M.S., Beresford P.J., Wagner L., Greenberg A.H., and Lieberman J. 2001. Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem* 276:3683-3690.
- Zhang D.H., Cohn L., Ray P., Bottomly K., and Ray A. 1997. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272:21597-21603.
- Zhang H., Zhong C., Shi L., Guo Y., and Fan Z. 2009. Granulysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to Necroptosis. *J Immunol* 182:6993-7000.
- Zhang S., Lukacs N.W., Lawless V.A., Kunkel S.L., and Kaplan M.H. 2000. Cutting edge: differential expression of chemokines in Th1 and Th2 cells is dependent on Stat6 but not Stat4. *J Immunol* 165:10-14.
- Zhao T., Zhang H., Guo Y., and Fan Z. 2007. Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. *J Biol Chem* 282:12104-12111.
- Zhao T., Zhang H., Guo Y., Zhang Q., Hua G., Lu H., Hou Q., Liu H., and Fan Z. 2007. Granzyme K cleaves the nucleosome assembly protein SET to induce single-stranded DNA nicks of target cells. *Cell Death Differ* 14:489-499.
- Zheng T., Nathanson M.H., and Elias J.A. 1994. Histamine augments cytokine-stimulated IL-11 production by human lung fibroblasts. *J Immunol* 153:4742-4752.
- Zheng W., and Flavell R.A. 1997. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89:587-596.

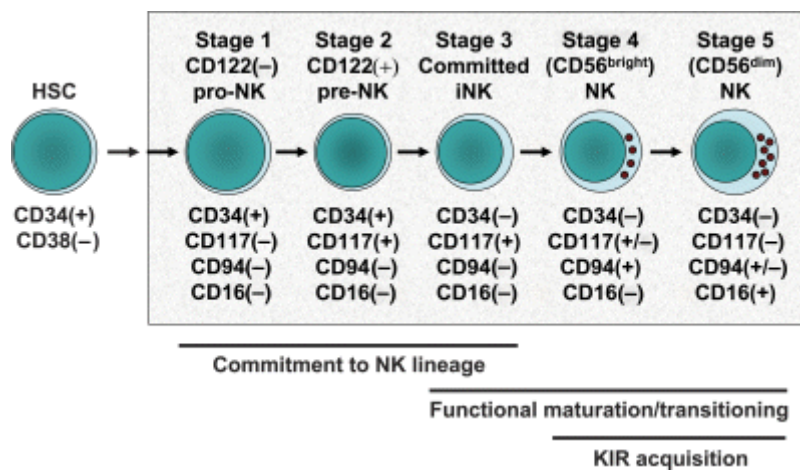
- Zheutlin L.M., Ackerman S.J., Gleich G.J., and Thomas L.L. 1984. Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J Immunol* 133:2180-2185.
- Zhou B., Comeau M.R., De Smedt T., Liggitt H.D., Dahl M.E., Lewis D.B., Gyarmati D., Aye T., Campbell D.J., and Ziegler S.F. 2005. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6:1047-1053.
- Zhou L., Ivanov, II, Spolski R., Min R., Shenderov K., Egawa T., Levy D.E., Leonard W.J., and Littman D.R. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8:967-974.
- Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov, II, Min R., Victora G.D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y.P., Rudensky A.Y., Ziegler S.F., and Littman D.R. 2008. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature* 453:236-240.
- Zhou R., Wei H., and Tian Z. 2007. NK3-like NK cells are involved in protective effect of polyinosinic-polycytidylic acid on type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 178:2141-2147.
- Zhu J., Cote-Sierra J., Guo L., and Paul W.E. 2003. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 19:739-748.
- Zhu J., Guo L., Min B., Watson C.J., Hu-Li J., Young H.A., Tschlis P.N., and Paul W.E. 2002. Growth factor independent-1 induced by IL-4 regulates Th2 cell proliferation. *Immunity* 16:733-744.
- Zhu J., Guo L., Watson C.J., Hu-Li J., and Paul W.E. 2001. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 166:7276-7281.
- Zhu J., Jankovic D., Grinberg A., Guo L., and Paul W.E. 2006. Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:18214-18219.
- Zhu J., Min B., Hu-Li J., Watson C.J., Grinberg A., Wang Q., Killeen N., Urban J.F., Jr., Guo L., and Paul W.E. 2004. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 5:1157-1165.
- Zhu J., and Paul W.E. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112:1557-1569.
- Zhu P., Martinvalet D., Chowdhury D., Zhang D., Schlesinger A., and Lieberman J. 2009. The cytotoxic T lymphocyte protease granzyme A cleaves and inactivates poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase-1. *Blood* 114:1205-1216.
- Zhu P., Zhang D., Chowdhury D., Martinvalet D., Keefe D., Shi L., and Lieberman J. 2006. Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. *EMBO Rep* 7:431-437.
- Zhu Z., Homer R.J., Wang Z., Chen Q., Geba G.P., Wang J., Zhang Y., and Elias J.A. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest* 103:779-788.
- Zingoni A., Sornasse T., Cocks B.G., Tanaka Y., Santoni A., and Lanier L.L. 2004. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol* 173:3716-3724.
- Zingoni A., Sornasse T., Cocks B.G., Tanaka Y., Santoni A., and Lanier L.L. 2005. NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol* 42:451-454.
- Zou H., Henzel W.J., Liu X., Lutschg A., and Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.
- Zou Y., Chen T., Han M., Wang H., Yan W., Song G., Wu Z., Wang X., Zhu C., Luo X., and Ning Q. 2010. Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver failure. *J Immunol* 184:466-475.
- Zurier R.B. 1976. Prostaglandin release from human polymorphonuclear leukocytes. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res* 2:815-818.

FIGURES



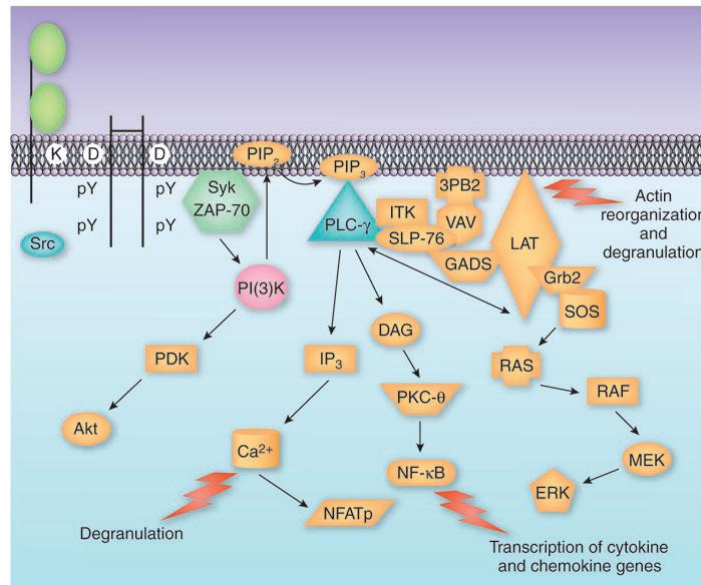
D'après Di Santo JP *et al*, Immunological Reviews, 2006

Figure 1: Modèle de développement des cellules NK murines dans la moelle osseuse. En fonction de l'expression des marqueurs de surface, le développement des cellules NK est modélisé en 6 stades (A-F). Après activation, les cellules NK périphériques pourraient modifier leur phénotype et leur fonction (Stade G).



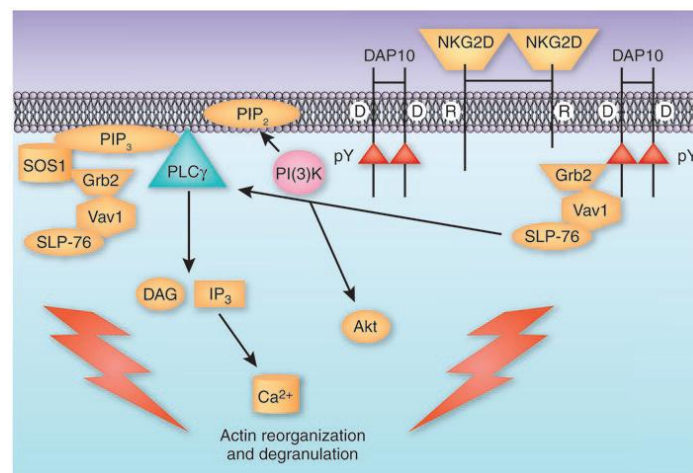
D'après Freud AG *et al*, Immunological Reviews, 2006

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



D'après Lanier LL, Nature Immunology, 2008

Figure 3: Transduction du signal via les séquences ITAM et conséquences fonctionnelles sur les cellules NK. Suite à l'activation du récepteur, les motifs ITAM (Y: résidus tyrosine à l'intérieur des domaines ITAM) sont phosphorylés probablement par des kinases de la famille Src. Syk et/ou ZAP-70 (à la fois exprimées par les cellules NK murines et humaines) sont recrutées au niveau des ITAM phosphorylés, initiant ainsi la cascade de signalisation décrite. Ces voies de signalisation sont hypothétiques et sont le résultat d'une synthèse de différentes études réalisées sur les cellules NK humaines et murines. L'activation des récepteurs contenant des motifs ITAM ou étant associés à des molécules adaptatrices portant ces motifs aboutit à la dégranulation des cellules NK mais également à la transcription de gènes codant des cytokines et des chimiokines.



D'après Lanier LL, Nature Immunology, 2008

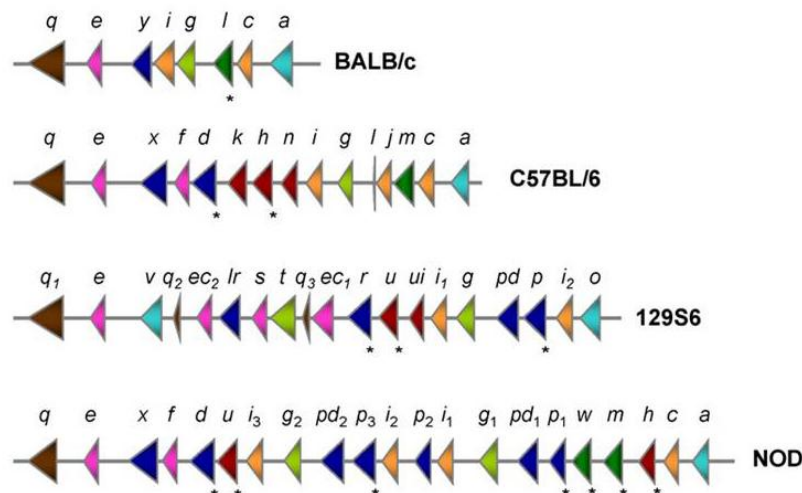
Figure 4: Transduction du signal via la molécule adaptatrice DAP10 et conséquences fonctionnelles sur les cellules NK. Le récepteur NKG2D ne contient pas d'ITAM et est associé à la molécule adaptatrice DAP10 contenant un motif YINM dans son domaine cytoplasmique. Après engagement du récepteur, ce motif est phosphorylé et recrute la PI(3)K et le complexe Grb2-Vav1-SLP76, induisant alors la cascade de signalisation décrite qui aboutit à la dégranulation de la cellule NK.

Stimuli/treatment	Cells/cell line	Ligands	Reference
RA	F9 embryonic carcinoma	rae-1	Nomura <i>et al.</i> (1996)
RA	Hepatocellular carcinoma tissue and cell lines	RAE-1 α MIC-A/B	Unpublished observations Jinushi <i>et al.</i> (2003b)
TLR ligands	Macrophages	RAE-1 α - ϵ	Hamerman <i>et al.</i> (2004)
LPS	Macrophages	ULBP1/2/3	Nedvetzki <i>et al.</i> (2007)
LPS	B cells (BALB/c)	NKG2D mouse ligands	Diefenbach <i>et al.</i> (2000)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Macrophages	RAE-1	Rausch <i>et al.</i> (2006)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Airway epithelial cell, macrophages	RAE-1, ULBP2	Borchers <i>et al.</i> (2006)
Influenza A, Sendai infection	Macrophages	MIC-A	Siren <i>et al.</i> (2004)
<i>Escherichia coli</i>	Epithelial cell lines	MIC-A	Tieng <i>et al.</i> (2002)
Super antigen, antigens	T cells	MIC-A, ULBP1/2/3	Cerboni <i>et al.</i> (2007)
HIV	T cells	ULBP1/2/3	Ward <i>et al.</i> (2007)
α CD3/CD28/PMA	T cells	MIC-A	Molinero <i>et al.</i> (2002)
ConA, APC, PMA	T cells	NKG2D mouse ligands	Diefenbach <i>et al.</i> (2000); Rabinovich <i>et al.</i> (2003)
EBV infection	B cells in lytic cycle	ULBP1	Pappworth <i>et al.</i> (2007)
IFN- α	DC	MIC-A/B	Jinushi <i>et al.</i> (2003a)
Differentiation	Myeloid progenitors	ULBP1 ULBP2/3	Nowbakht <i>et al.</i> (2005) Guilloton <i>et al.</i> (2005)
Heat shock	Epithelial cells	MIC-A/B	Groh <i>et al.</i> (1996)
E1A (serotype 5)	Human, mouse tumor cells, primary baby mouse kidney fibroblasts	RAE-1, MIC and ULBPs	Routes <i>et al.</i> (2005)
BCR/ABL	Leukemic, hematopoietic CD34 ⁺	MIC	Boissel <i>et al.</i> (2006)
DNA damage	Human and mouse fibroblasts	RAE-1, ULBP1/2/3, MIC-A	Gasser <i>et al.</i> (2005)
JunB/AP-1	Mouse embryonic fibroblasts, endothelioma cells	RAE-1 ϵ , MULT-1	Nausch <i>et al.</i> (2006)
HDAC	AML hepatoma cells	MIC-A/B, ULBP1 MIC-A/B	Armeanu <i>et al.</i> (2005); Diermayr <i>et al.</i> (2007)

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; APC, antigen-presenting cell; ConA, concavalin A; EBV, Epstein-Barr virus; HDAC, histone deacetylase; LPS, lipopolysaccharide; MIC, MHC class I-chain-related protein; RAE-1, retinoic acid early inducible-1 protein; TLR, toll-like receptor; ULBP, UL16-binding protein.

D'après Nausch N *et al.*, Oncogene, 2008

Tableau 1: Régulation de l'expression des ligands du récepteur activateur NKG2D.



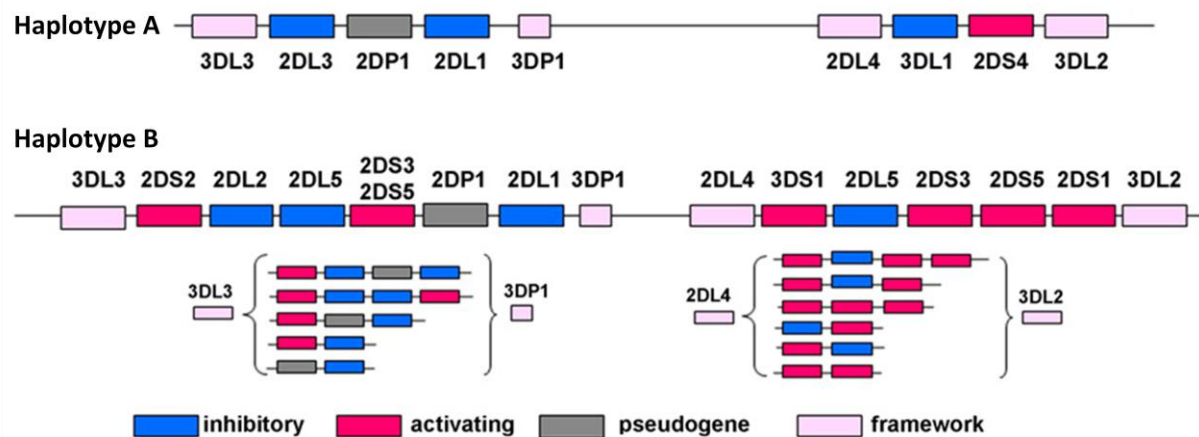
D'après Carlyle JR *et al.*, Seminars in Immunology, 2008

Figure 5: Comparaison du cluster Ly49 entre quatre lignées de souris. Les gènes codant les récepteurs activateurs Ly49 sont notés avec un astérisque (*).

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

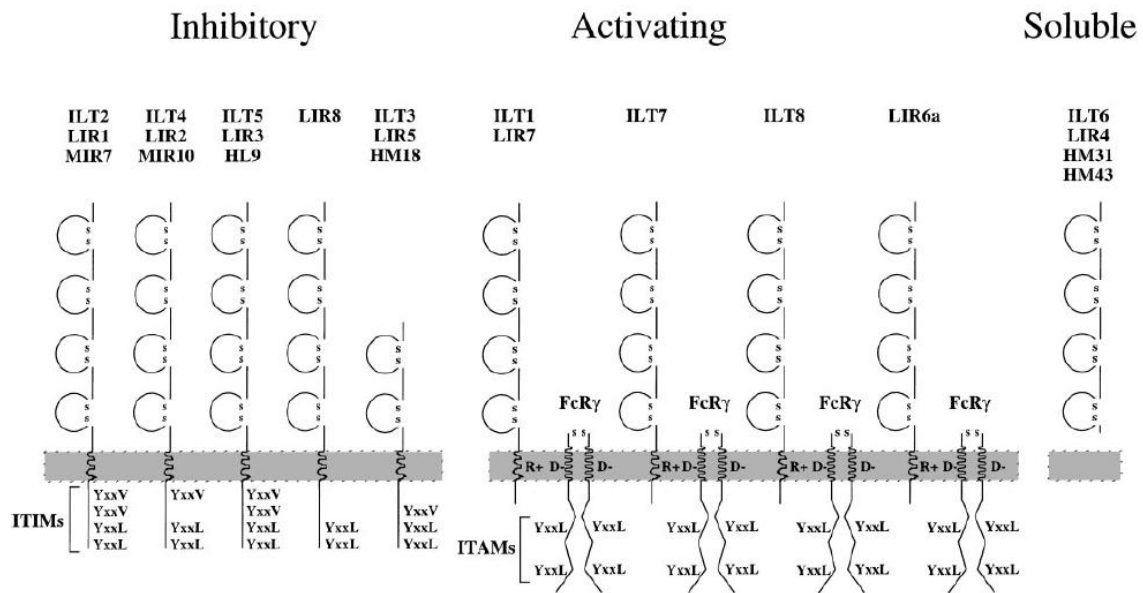
D'après Moretta A *et al*, Immunological Reviews, 2008

Tableau 2: Principales caractéristiques des KIR humains.



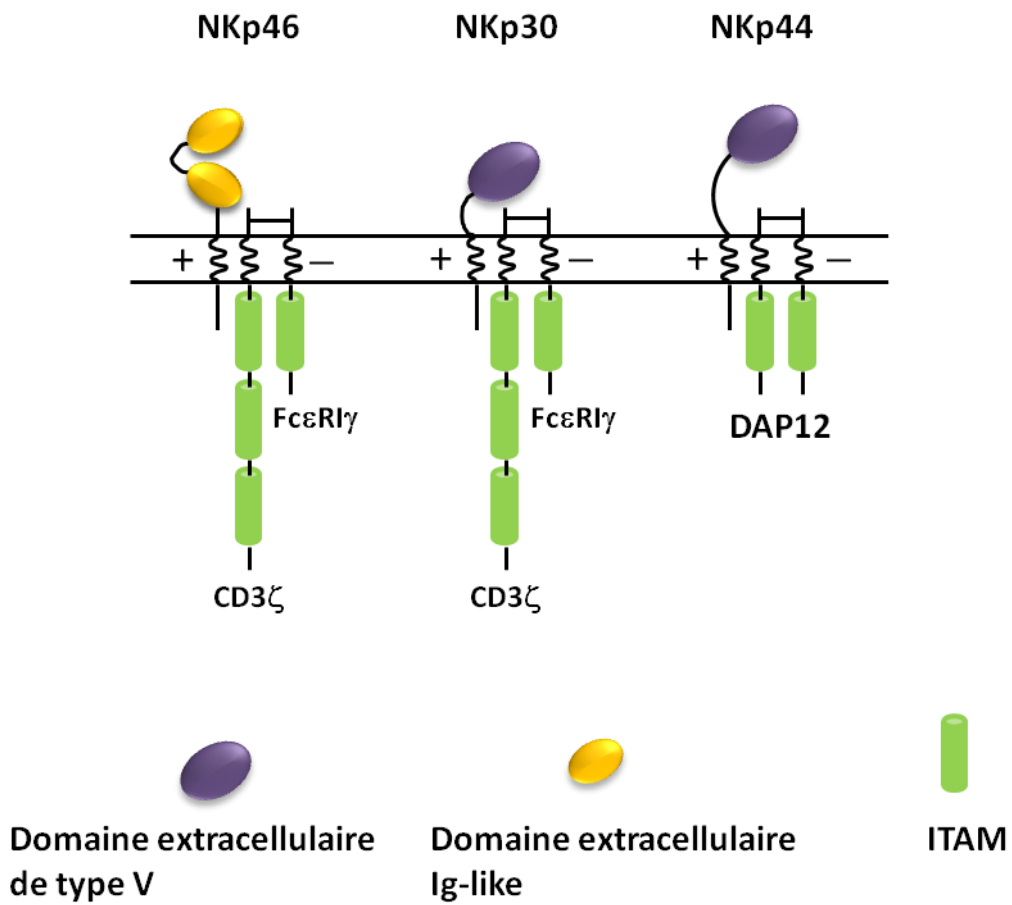
D'après Kulkarni S *et al*, Seminars in Immunology, 2008

Figure 6: Les haplotypes KIR. Les haplotypes KIR A et B varient au niveau de leur contenu génique. L'haplotype A, uniforme en terme de contenu génique, est composé de 5 gènes inhibiteurs (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2 et KIR3DL3), un gène activateur (KIR2DS4) et du gène KIR2DL4. Malgré l'uniformité du contenu génique, les haplotypes A peuvent contenir des variants nuls de KIR2DS4 (KIR1D) et KIR2DL4 dont les protéines ne sont pas exprimées à la surface cellulaire. Les haplotypes B sont, quant à eux, caractérisés par un nombre variable de gènes (représentés entre crochets). Les gènes cadre (rose clair) sont présents sur tous les haplotypes.



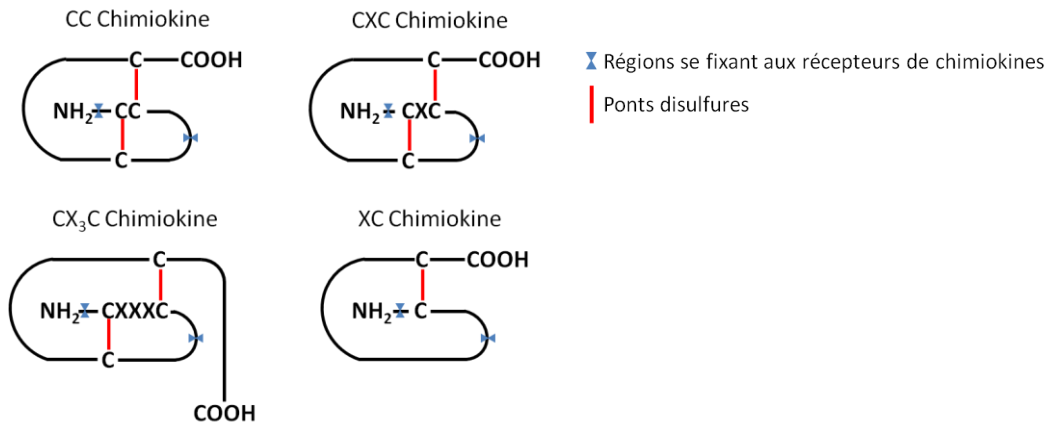
D'après Colonna M *et al*, Journal of Leukocyte Biology, 1999

Figure 7: La famille des récepteurs MIR/LIR/ILT. En fonction de leurs domaines cytoplasmiques et transmembranaires, ces récepteurs sont classés en trois groupes : les récepteurs inhibiteurs contenant dans les domaines cytoplasmiques des motifs ITIM, les récepteurs activateurs associés au FcR γ comportant des motifs ITAM et le récepteur soluble ne contenant aucun domaine cytoplasmique et transmembranaire.



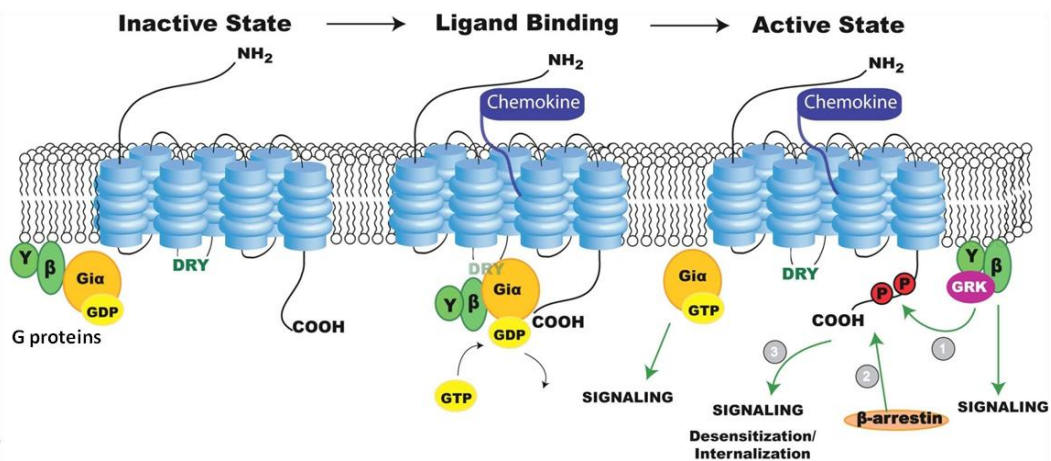
D'après Moretta A *et al*, EMBO Journal, 2004

Figure 8: Structure des NCR. Les polypeptides de signalisation qui sont associés aux différents NCR sont également cités.



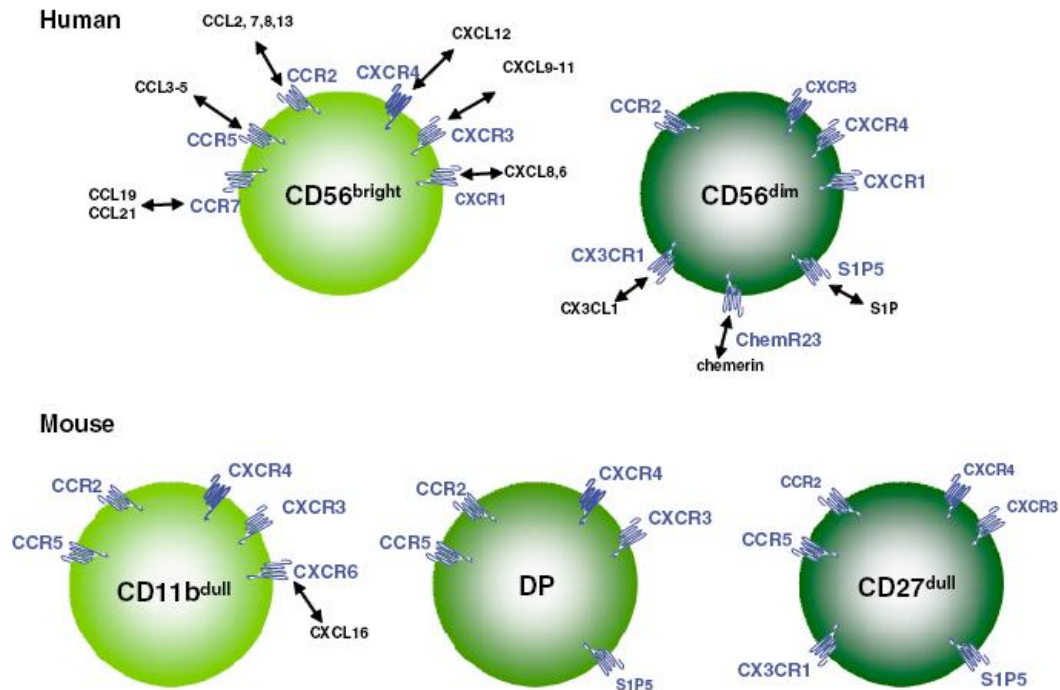
D'après Townson DH *et al*, Reproductive Biology and Endocrinology, 2003

Figure 9: Représentation schématique des quatre familles de chimiokines. L'ensemble des chimiokines présentent une structure tridimensionnelle relativement conservée. Cette structure est maintenue par la présence de ponts disulfures formés à partir d'une ou de deux paires de résidus cystéine présents dans la région NH₂-terminale de la protéine. En fonction du nombre de cystéine (C) dans la région N-terminale et du nombre d'acides aminés non conservés (X) s'intercalant entre ces cystéines, les chimiokines sont réparties en quatre groupes : les CC, les CXC, les CX₃C et les XC chimiokines. Les régions fixant les récepteurs de chimiokines sont également représentées.



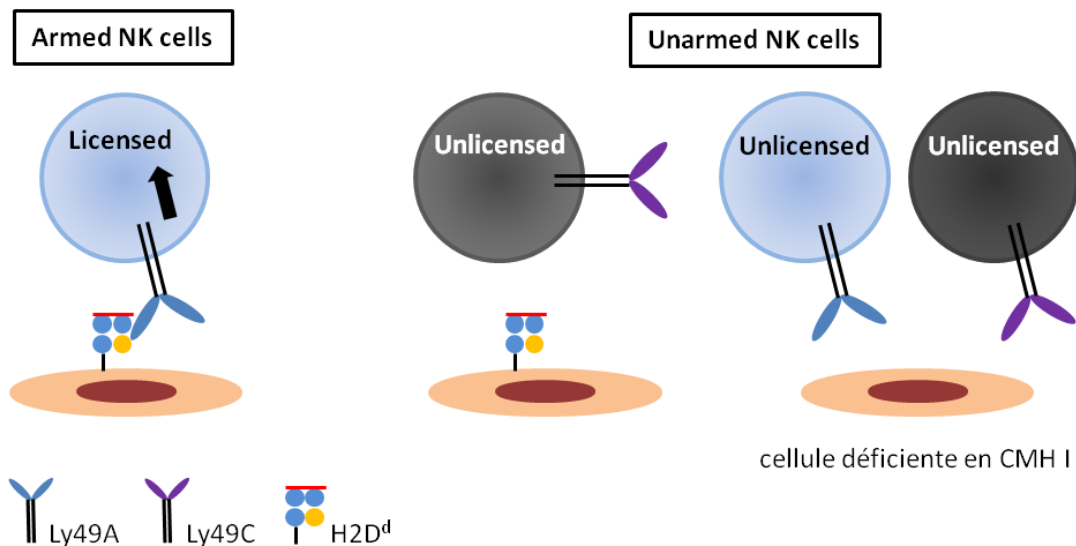
D'après O'Hayre M *et al*, Biochemical Journal, 2008

Figure 10: Structure et activation des récepteurs aux chimiokines. Les récepteurs aux chimiokines sont composés d'une région N-terminale extracellulaire riche en acides aminés acides, d'une région C-terminale intracellulaire riche en sérine et thréonine formant des sites de phosphorylation et de sept domaines transmembranaires en hélice α . Dans l'état inactif, le récepteur aux chimiokines n'est pas couplé aux protéines G hétérotrimériques (α , β , γ) dont la sous-unité $G\alpha$ fixe le GDP. Après fixation d'une chimiokine à son récepteur, la DRY box et d'autres motifs sont accessibles aux protéines G, permettant ainsi leur fixation et leur activation. La sous-unité $G\alpha$ interagit directement avec la région C-terminale du récepteur et avec la sous-unité $G\beta$, ce qui forme un complexe serré avec la sous-unité $G\gamma$. Le GDP se dissocie de la sous-unité $G\alpha$ et est remplacé par le GTP. Le complexe $G\alpha$ -GTP se dissocie du récepteur et des sous-unités $G\beta\gamma$. Les complexes $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$ activent alors des effecteurs en aval, conduisant à la réponse physiologique. Des stimuli continus impliquent la désensibilisation et l'internalisation du récepteur aux chimiokines. La partie C-terminale du récepteur est alors phosphorylée, fixant ainsi les β arrestines ce qui empêche l'interaction ultérieure entre les protéines G et le récepteur aux chimiokines et entraîne son internalisation via des puits recouverts de clathrine. L'endocytose du récepteur conduit soit à sa dégradation lysosomale, soit à son recyclage à la surface cellulaire et à sa resensibilisation. Outre leur implication dans l'internalisation du récepteur, les β arrestines peuvent activer des voies telles qu'AKT, PI3K, MAPK et NF- κ B, conduisant à une variété de réponses cellulaires.



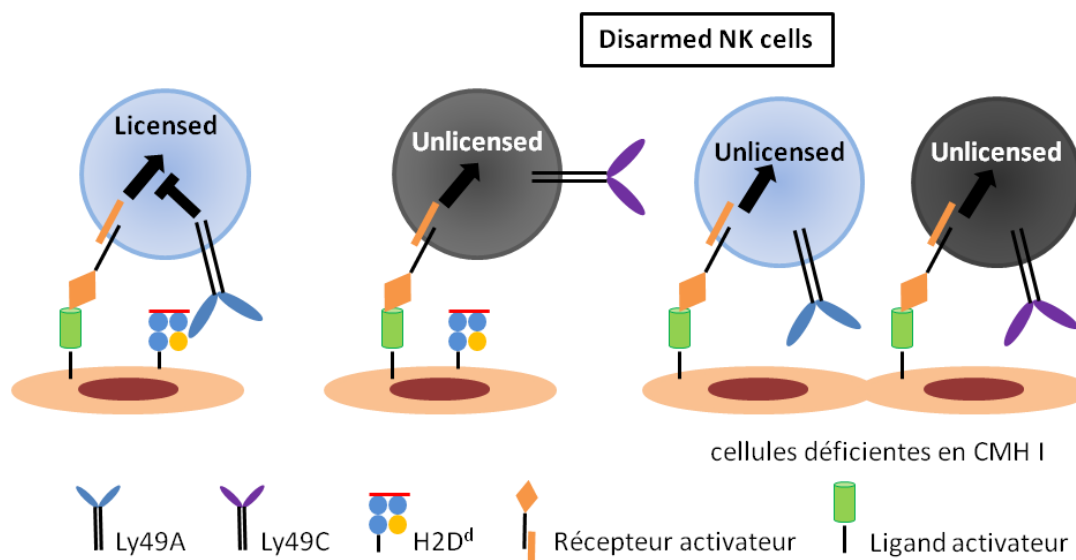
D'après Grégoire C *et al*, Immunological Reviews, 2007

Figure 11: Expression des récepteurs aux chimiokines par les sous-populations de cellules NK humaines et murines. L'expression de ces récepteurs est basée soit sur le niveau d'expression de la protéine déterminée par cytométrie en flux, soit sur les taux d'ARN obtenus par microarray.



Adapté de Jonsson AH *et al*, *Advances in Immunology*, 2009

Figure 12: Le modèle « arming » comme mécanisme de tolérance du Soi par les cellules NK. Dans ce modèle, l'interaction entre un récepteur inhibiteur présent à la surface de la cellule NK (par exemple le Ly49A) et son ligand exprimé à la surface d'une cellule normale (dans ce cas la molécule de CMH I H2-D^d) résulte en une cellule NK « armed » ou « licensed ». En revanche, l'absence d'interaction due soit à l'expression d'un récepteur inhibiteur inapproprié à la surface des cellules NK (par exemple le Ly49C dans ce cas) soit à une déficience de CMH I conduit à des cellules NK « unarmed » ou « unlicensed ».



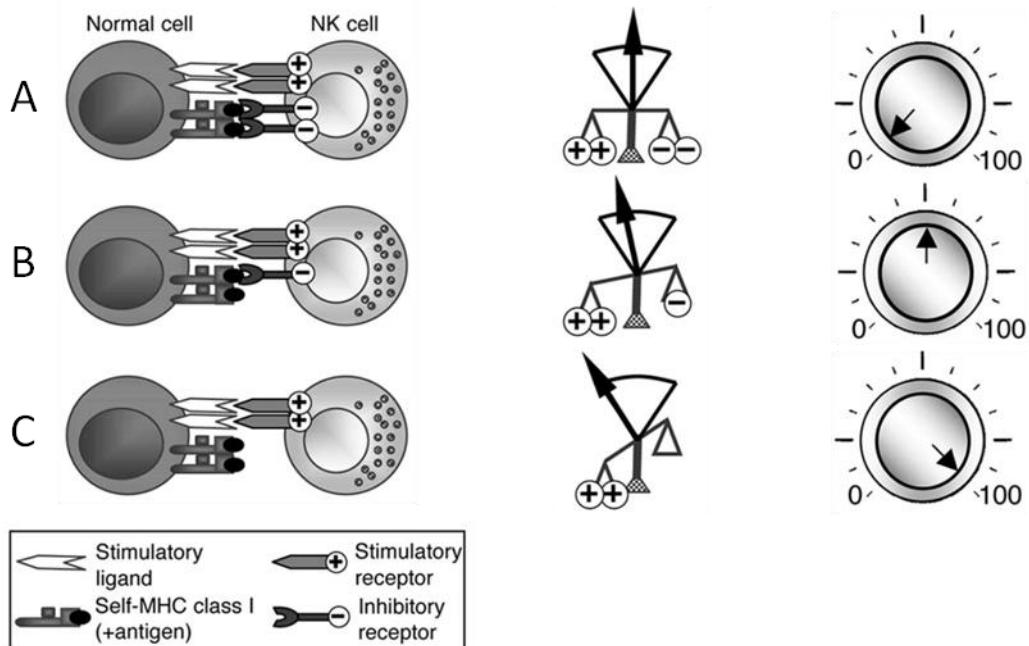
Adapté de Jonsson AH *et al*, *Advances in Immunology*, 2009

Figure 13: Le modèle de « disarming » comme mécanisme de tolérance du Soi par les cellules NK. Dans ce modèle, la cellule NK interagit avec la cellule normale via à la fois les récepteurs inhibiteurs (dans cet exemple Ly49A et son ligand H2D^d) et activateurs, permettant ainsi leur « licensing ». En revanche, la cellule NK interagissant soit avec une cellule normale, soit avec une cellule déficiente en CMH I via uniquement les récepteurs activateurs devient « disarmed » et donc hyporéactive.

Rencontre d'une cellule NK avec une cellule normale de l'hôte durant le développement in vivo

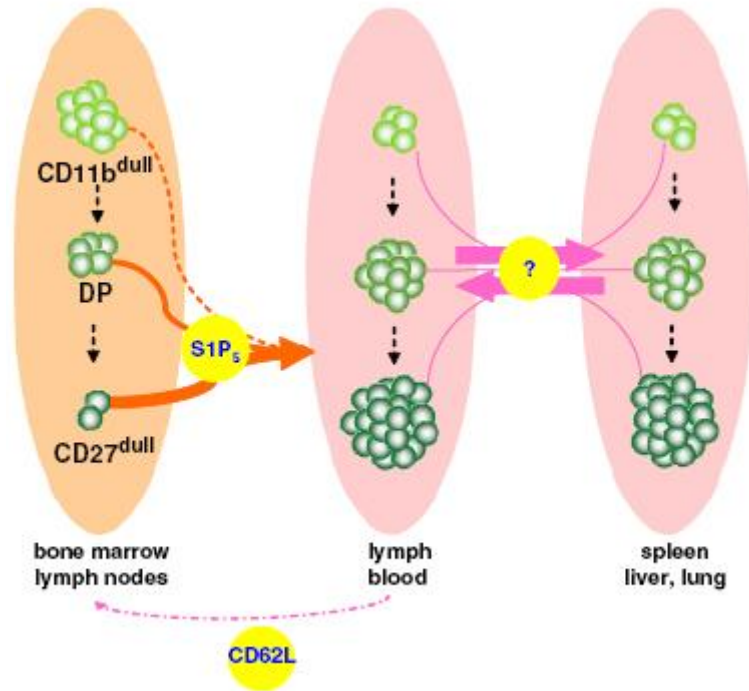
Intégration et somme des signaux reçus par la cellule NK

Seuil d'activation



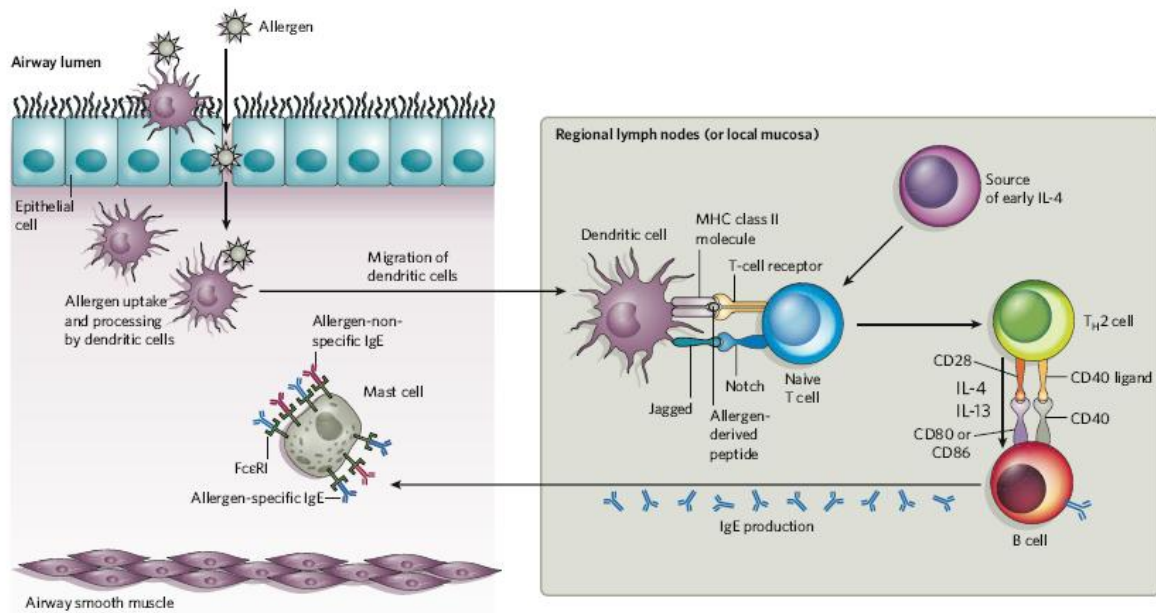
Adapté de Joncker NT *et al*, Journal of Immunology, 2009

Figure 14: Le modèle du rhéostat. Durant le développement, les cellules NK interagissent avec les cellules normales de l'hôte via leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs, intègrent les signaux et en font la somme afin d'établir leur seuil d'activation. Dans cet exemple, deux récepteurs activateurs sont impliqués dans l'interaction entre les cellules NK et les cellules normales de l'hôte. **A** | Lorsque la cellule NK exprime au moins deux récepteurs inhibiteurs pour les molécules de CMH I du Soi, le seuil d'activation est réglé très bas. **B** | Lorsque la cellule NK n'exprime qu'un seul récepteur inhibiteur du CMH I du Soi, la somme des signaux tend vers l'activation mais le réglage fait en sorte que la cellule ne s'active pas, et ce en augmentant le seuil d'activation. **C** | Lorsque la cellule NK manque de tous les récepteurs inhibiteurs pour le CMH I, le seuil d'activation est davantage augmenté permettant ainsi à la cellule NK d'être non réactive en condition basale.



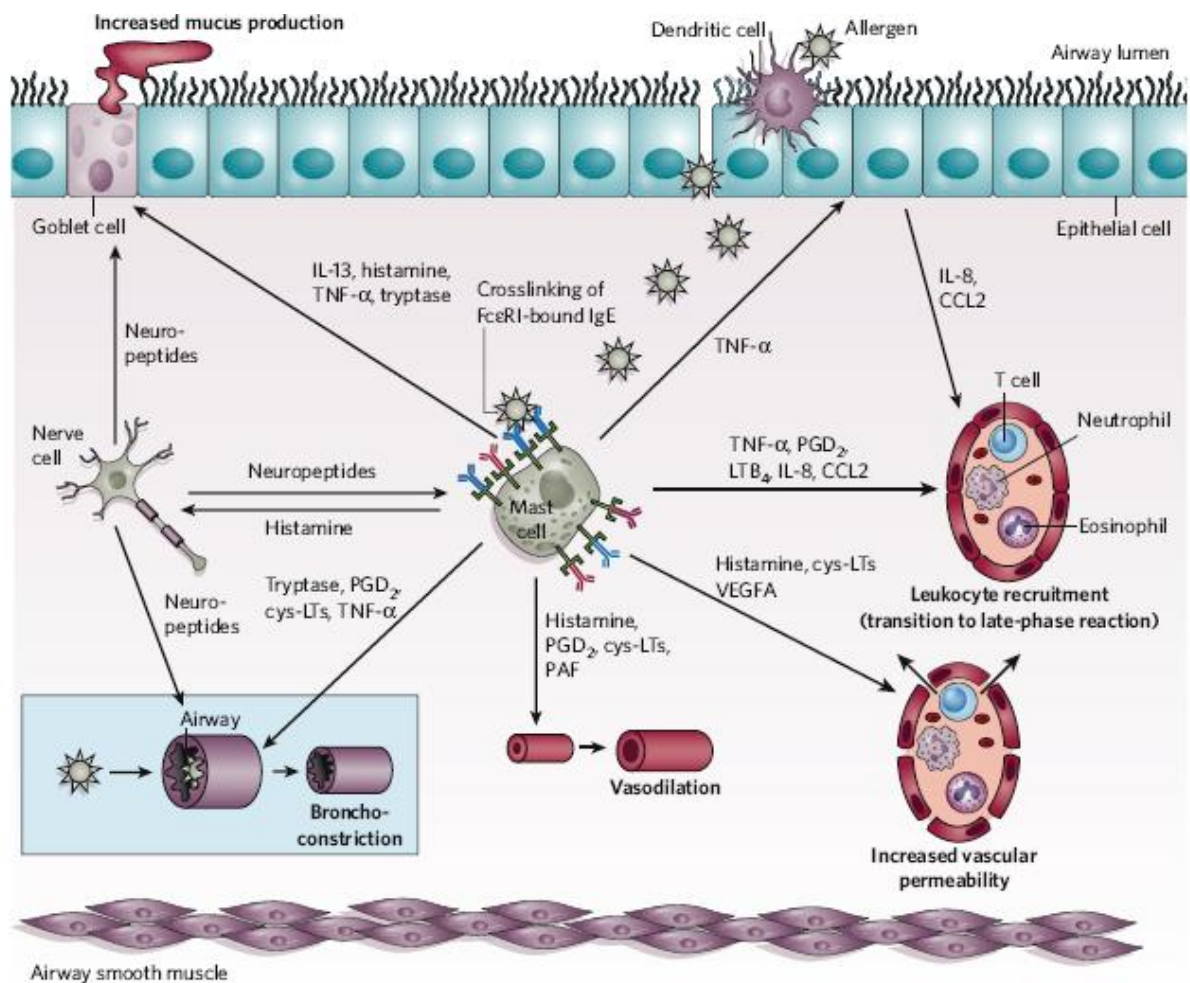
D'après Grégoire C *et al*, Immunological Reviews, 2007

Figure 15: Modèle de circulation des cellules NK en condition basale. Les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse, mais aussi dans d'autres organes tels que les ganglions lymphatiques. Lors de leur maturation, les cellules NK acquièrent progressivement l'expression du S1P₅. Ce récepteur est impliqué dans la sortie des cellules NK de la moelle osseuse et des ganglions lymphatiques, qui se retrouvent alors dans les fluides extracellulaires tels que le sang et la lymphe. Au plus le S1P₅ est exprimé à la surface des cellules NK, au meilleure est leur sortie (représenté par les flèches orange de différentes intensités). Une fois dans le sang périphérique, les cellules NK pourraient retourner dans les ganglions lymphatiques via un mécanisme dépendant du CD62L et dans la moelle osseuse. Elles sont également capables d'atteindre les organes tels que la rate, le foie et les poumons, et ce via des molécules encore inconnues.



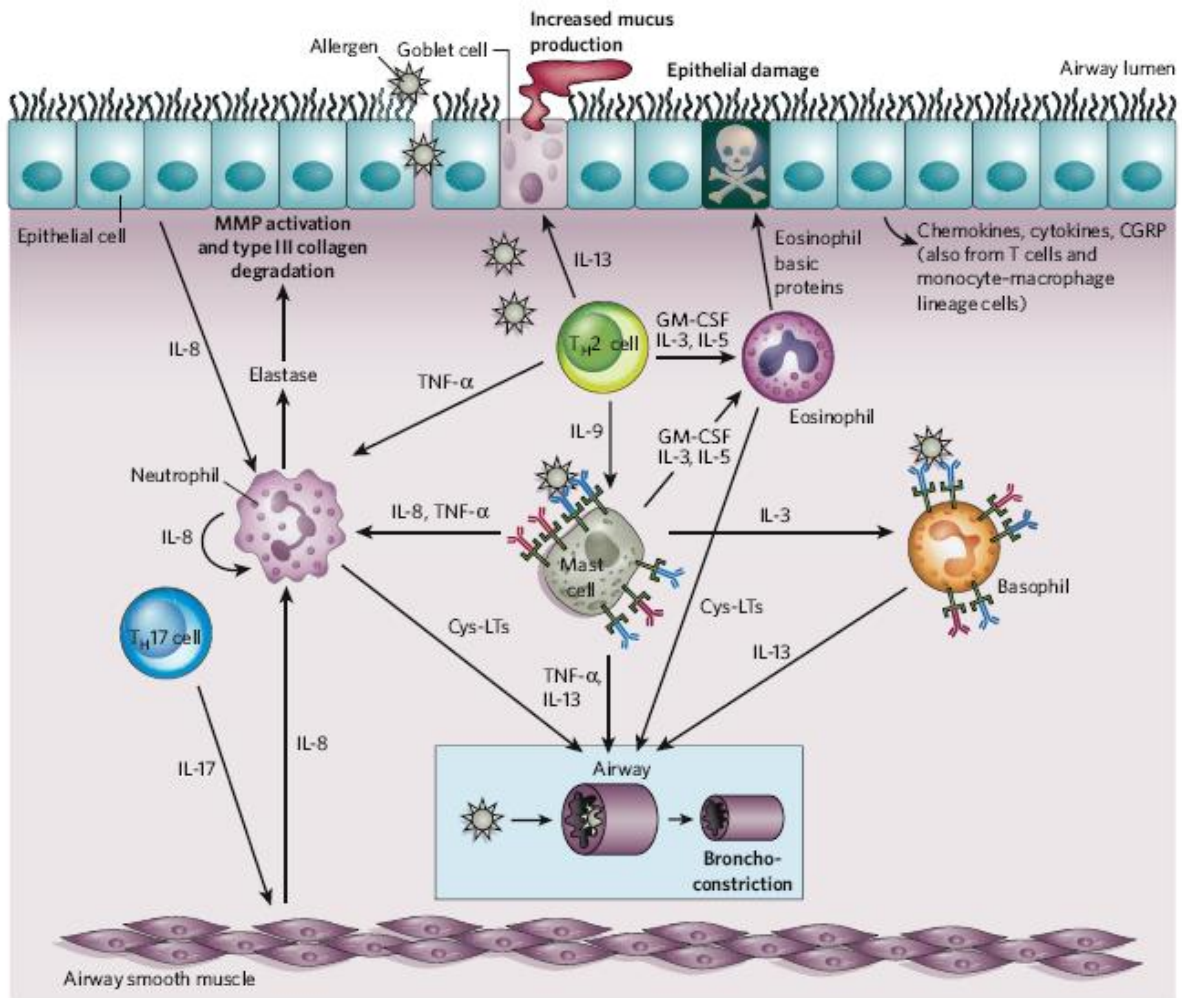
D'après Galli SJ *et al*, Nature, 2008

Figure 16: Phase de sensibilisation aux allergènes. L'allergène peut soit être capté puis apprêté par les DC intraépithéliales qui pénètrent alors dans le tissu pulmonaire, soit pénétrer directement dans la sous-muqueuse où il est capté et apprêté par les DC présentes. Cette pénétration directe ne peut être réalisée que par les allergènes possédant une activité protéase. Cette dernière permet le clivage des jonctions serrées entre les cellules épithéliales. Les DC activées mûrissent et migrent vers les ganglions drainants où elles présentent le complexe CMH II/peptide antigénique aux lymphocytes T naïfs. En présence d'IL-4, les lymphocytes T naïfs se différencient en lymphocytes Th2 produisant entre autre de l'IL-4 et de l'IL-13. En présence de ces deux cytokines, l'interaction entre les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B conduit à la production d'IgE par les lymphocytes B. Ces IgE se diffusent localement puis de façon systémique où ils se fixent sur les mastocytes résidant dans les tissus via le FcεRI (récepteur de forte affinité pour les IgE).



D'après Galli SJ *et al*, Nature, 2008

Figure 17: La réaction immédiate de la phase effectrice. Lors d'un contact ultérieur avec les allergènes, ceux-ci se fixent sur les complexes IgE/FcεRI présents à la surface des mastocytes. Cette fixation induit la dimérisation des récepteurs aux IgE, aboutissant à la libération de médiateurs préformés et néoformés et à l'augmentation de la synthèse de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Les médiateurs rapidement libérés sont responsables de la bronchoconstriction, de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la production de mucus. Les mastocytes contribuent à la transition vers la réaction retardée en initiant le recrutement des cellules inflammatoires.



D'après Galli SJ *et al*, Nature, 2008

Figure 18: La réaction retardée de la phase effectrice. Cette phase apparaît 2 à 6 heures après l'exposition à l'allergène et est caractérisée par une inflammation de la muqueuse et des lésions de l'épithélium induites par un afflux de cellules inflammatoires produisant des substances pro-inflammatoires et des cytokines Th2.

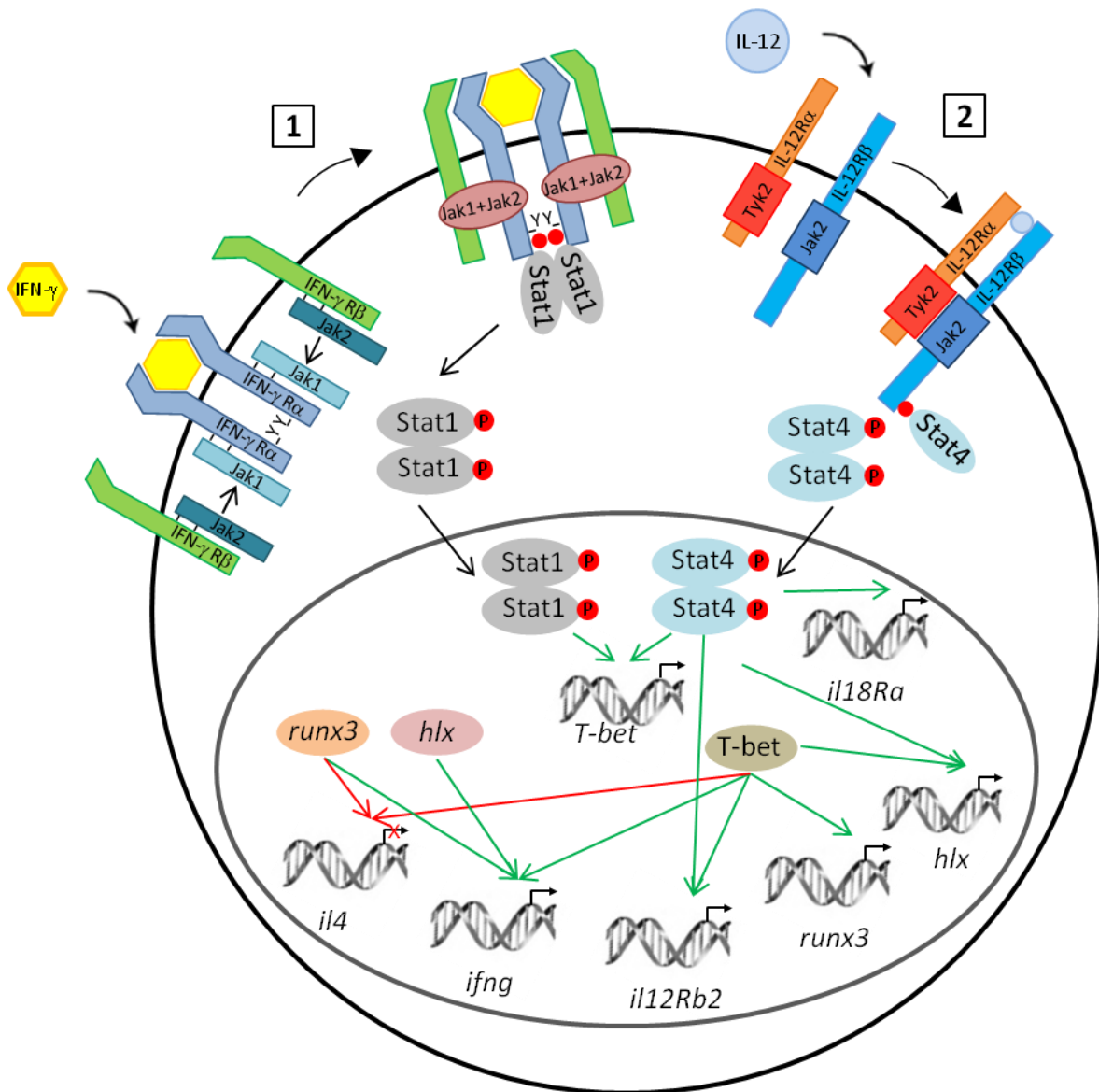


Figure 19: Différenciation du lymphocyte T CD4⁺ naïf en lymphocyte Th1 après l'interaction entre le complexe CMH II/peptide antigénique et le TCR. 1| L'IFN- γ produit par les cellules NK via l'IL-12 sécrétée par les DC activées se fixe aux chaînes α du récepteur de l'IFN- γ . Cette fixation conduit à la formation d'un complexe actif où Jak1 et Jak2 activés phosphorylent Stat1. L'homodimère Stat1 phosphorylé se transloque dans le noyau où il induit l'expression du facteur de transcription T-bet. Ce dernier induit (flèche verte) l'expression de l'IFN- γ , de la chaîne β du récepteur de l'IL-12, de Runx3 et d'Hlx, alors qu'il réprime (flèche rouge) l'expression de l'IL-4 en se fixant sur son silencer. Les facteurs Hlx et Runx3 coopèrent avec T-bet pour l'expression de l'IFN- γ , et Runx3 coopère également avec T-bet pour la répression de l'expression de l'IL-4. **2|** L'expression de l'IL-12R β 2 induite par T-bet à la surface du lymphocyte T CD4⁺ lui permet de répondre directement à l'IL-12 produite par les CPA. L'interaction entre l'IL-12 et son récepteur conduit à la phosphorylation de Stat4. L'homodimère Stat4 phosphorylé se transloque dans le noyau où il induit l'expression de T-bet, d'IL-12R β 2, d'Hlx et de l'IL-18R α . Ainsi, la collaboration entre l'IFN- γ et l'IL-12 permet une différenciation Th1 complète.

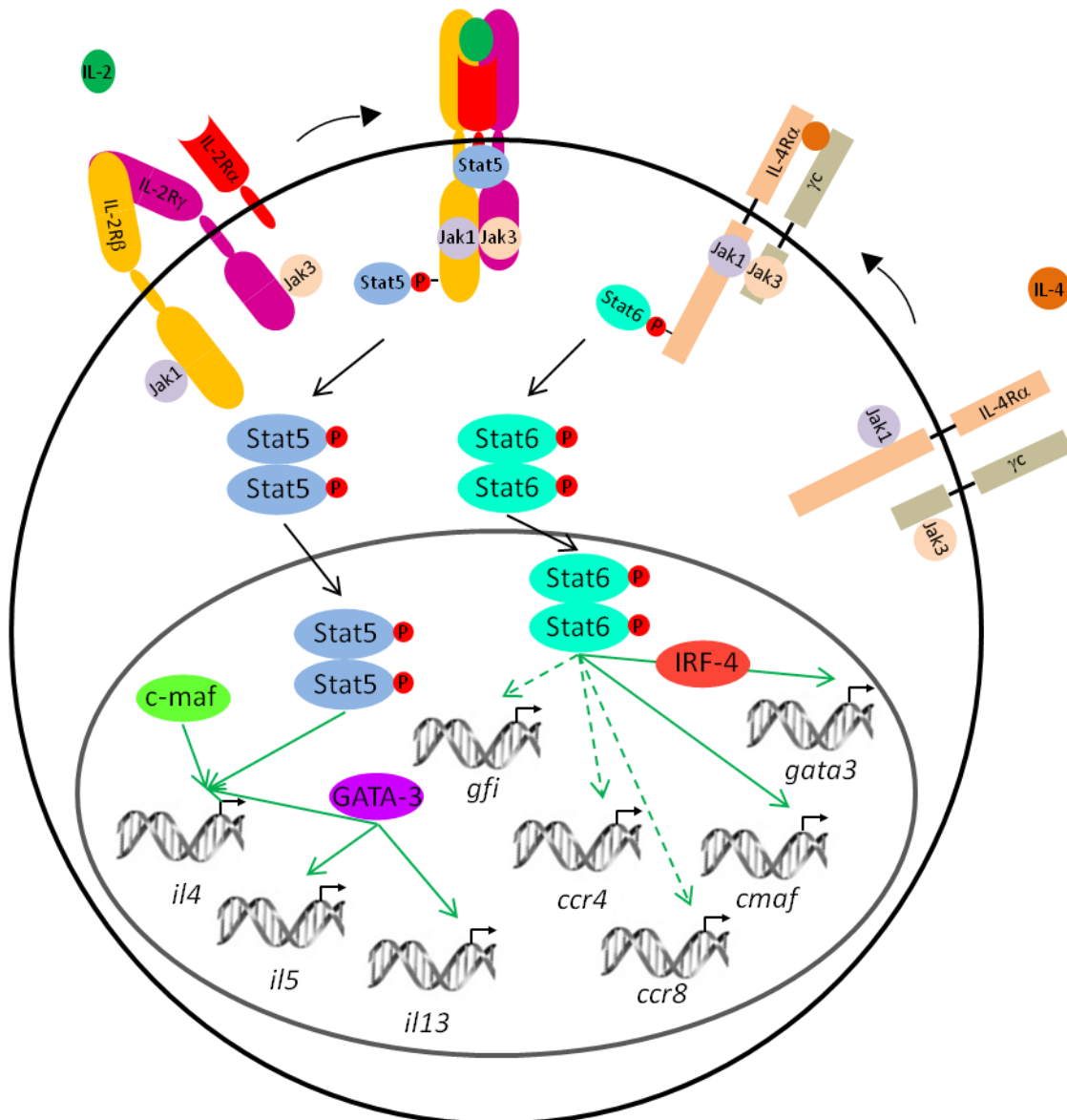
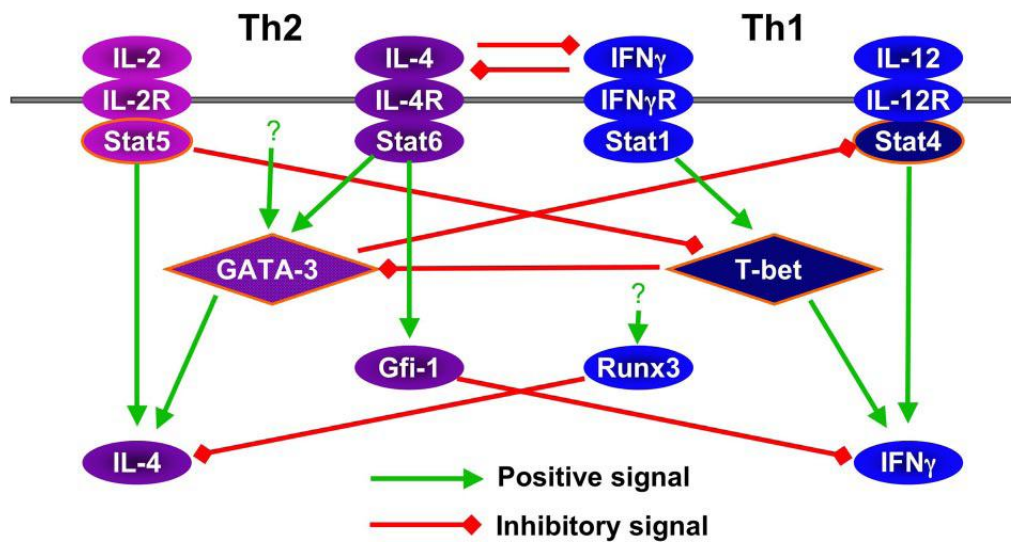
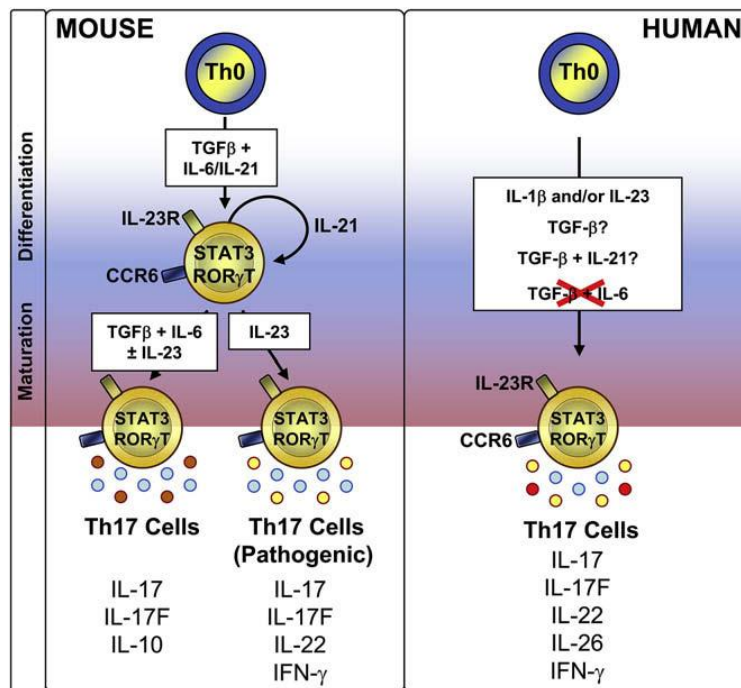


Figure 20: Différenciation du lymphocyte T CD4⁺ naïf en lymphocyte Th2 après l'interaction entre le complexe CMH II/peptide antigénique et le TCR. L'interaction entre l'IL-2 produite par le lymphocyte T CD4⁺ activé via l'engagement de son TCR et son récepteur hétérotrimérique conduit à la formation d'un complexe actif où Jak1 et Jak3 activés phosphorylent Stat5. L'homodimère Stat5 phosphorylé se transloque dans le noyau et il se fixe au second intron du gène de l'*il4* permettant l'accessibilité de ce gène pour d'autres facteurs. L'IL-4 produite soit par le lymphocyte T CD4⁺ lui-même à la suite d'une interaction entre le complexe CMH II/peptide antigénique et le TCR en présence de faibles concentrations d'antigène soit par une source cellulaire exogène se fixe à son récepteur hétérodimérique. Cette fixation conduit à la formation d'un complexe actif où Jak1 et Jak3 activés phosphorylent Stat6. Stat6 induit l'expression des facteurs de transcription GATA-3 et c-maf. GATA-3, dont l'expression semble impliquer IRF-4, se fixe sur les promoteurs des gènes de l'*il5* et de l'*il13* et dans une région (hors promoteur) présente dans le locus de l'*il4*. Stat6 intervient également dans l'expression des récepteurs de chimiokines CCR4 et CCR8. La voie IL-4/Stat6 induit aussi l'expression du répresseur transcriptionnel Gfi essentiel dans la voie de développement Th2. Une expression transitoire de ce facteur est également observée après activation du TCR et permet la prolifération des cellules exprimant fortement GATA-3 tout en empêchant leur apoptose.



D'après Zhu J *et al*, Blood, 2008

Figure 21: La régulation croisée entre les facteurs impliqués dans les voies de différenciation Th1 et Th2. Les interactions IFN- γ /IFN- γ R et IL-12/IL-12R induisent la différenciation Th1 via une cascade de signalisation impliquant par exemple T-bet et Runx3. Ces deux facteurs indispensables à la différenciation Th1 (signaux positifs = flèches vertes) sont capables d'inhiber la différenciation Th2 (flèches rouges). De même, à la suite des interactions IL-2/IL-2R et IL-4/IL-4R, les facteurs impliqués dans la différenciation Th2 inhibent la différenciation Th1.



D'après Louten J et al, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009

Figure 22: Différenciation et maturation des lymphocytes Th17 chez l'homme et chez la souris. Chez la souris, le TGF- β agit de concert avec l'IL-6 ou l'IL-21 pour induire l'activation de STAT3. Cette dernière induit l'expression de ROR γ T et de l'IL-23R, aboutissant ainsi à la différenciation ultérieure des lymphocytes T CD4+ naïfs en lymphocytes Th17. Chez l'homme, l'IL-1 β et l'IL-23 sont des facteurs critiques de l'induction du développement des lymphocytes Th17. L'implication du TGF- β et de la combinaison TGF- β /IL-21 sont quant à elles controversée (?).

Human mast cell mediators that modulate airway remodeling		
Human mast cell mediator	Effect on airway remodeling	References
Tryptase	Proliferation of fibroblasts Collagen synthesis by fibroblasts Proliferation of airway smooth muscle cells Proliferation of airway epithelial cells Proliferation of endothelial cells	<i>J Clin Invest</i> 1977, 99 :1313 <i>J Clin Invest</i> 1977, 99 :1313 [36] <i>J Immunol</i> 1996, 156 :275 <i>J Immunol</i> 1998, 161 :1939
Chymase	Degrade basement membrane components Release of fibronectin and soluble CD44 Reduction of epidermal growth factor-induced smooth muscle cell proliferation	<i>J Biol Chem</i> 2001, 276 :3772 <i>J Immunol</i> 2002, 169 :1014 <i>J Immunol</i> 2002, 169 :1014
Activin A	Proliferation of airway smooth muscle cells	[37]
TNF- α (at low concentration)	Proliferation of airway smooth muscle cells	<i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 1996, 15 :55
Platelet-derived growth factor	Proliferation of airway smooth muscle cells	[40]
Transforming growth factor- β	Proliferation of airway smooth muscle cells Reduction of epidermal growth factor-induced smooth muscle cell proliferation	[41,42] [43]
Amphiregulin	Up-regulation of mucin gene expression in airway epithelial cells Proliferation of human lung fibroblasts	[54] [39]
Plasminogen activator inhibitor-1	Extracellular matrix deposition	<i>J Immunol</i> 1999, 162 :1032 <i>J Immunol</i> 2000, 165 :3154

D'après Okayama Y et al, Current Opinion in Immunology, 2007

Tableau 3: Effet des médiateurs libérés par les mastocytes humains sur le remodelage bronchique.