

Etude de l'implication des cellules iNKT dans l'asthme allergique expérimental

Patricia Hachem

▶ **To cite this version:**

Patricia Hachem. Etude de l'implication des cellules iNKT dans l'asthme allergique expérimental. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2006. Français. NNT : . tel-00084723

HAL Id: tel-00084723

https://theses.hal.science/tel-00084723

Submitted on 10 Jul 2006

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.

UNIVERSITE PARIS 5 RENE DESCARTES

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS 5

Spécialité : Immunologie

par

HACHEM Patricia

Sur le sujet

ETUDE DE L'IMPLICATION DES CELLULES iNKT DANS l'ASTHME ALLERGIQUE EXPERIMENTAL

Soutenue le 14 juin 2006 devant le jury composé de :

Madame le Professeur CHATENOUD Lucienne	**Présidente**
Monsieur le Docteur ERARD François	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur TROTTEIN François	**Rapporteur**
Monsieur le Docteur MECHERI Salah	**Examinateur**
Madame le Docteur LEITE-DE-MORAES Maria	**Directrice de thèse**

A mon papa Joseph

A ma maman Pauline

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Dr Michel DY de m'avoir reçus au sein de son unité CNRS UMR 8147 tout au long de ces années de DEA et de thèse.

Je remercie la présidente de mon jury Mme le Professeur Lucienne CHATENOUD ainsi que les membres du jury, M. le Docteur François ERARD et M. le Docteur François TROTTEIN d'avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que M. le Docteur Salah MECHERI pour être mon examinateur.

Un simple Merci ne suffira pas pour Dr Maria LEITE-DE-MORAES qui m'a soutenu tout au long de cette thèse, qui m'a encouragé pendant les jours orageux et a su me donner la confiance en moi-même. Pour m'avoir donné beaucoup de son temps, ses conseils et sa gentillesse, Merci beaucoup Maria pour tout.

Je remercie Dr Mireille DARDENNE pour l'aide précieuse qu'elle m'a offerte surtout pour la correction du français de mon manuscrit.

Un grand merci pour l'équipe « MLM », Mariette, Marie-Laure, Séverine et Alexandre pour leur aide et leurs conseils. Je voudrais aussi remercier François pour toute l'aide surtout l'aide informatique, qu'il m'a donnée au cours de ces années.

Je voudrai remercier la Société de Pneumologie de Langue Française pour le Prix qu'elle m'a attribué lors de son 8ème congrès qui s'est déroulé à Lille et qui m'a servi d'une bourse pour financer ma deuxième année de thèse. Je voudrais de même remercier la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) et l'Egide pour la bourse qui a permis le financement de la troisième année de ma thèse.

Un grand merci pour Gyslène, Esther et Serge avec qui j'ai passé ces derniers mois. Merci pour votre accueil au sein de la bibliothèque Jean Hamburger-Pierre Royer. Je n'oublierai jamais votre soutien et vos encouragements durant mes moments difficiles.

Je remercie sincèrement Dr André HERBELIN et Dr Elke SCHNEIDER pour leurs conseils et leurs gentillesses.

Merci pour les chercheurs et le personnel de la laverie et de l'animalerie de l'unité.

Je souhaite remercier tous les étudiants, thésards, post-doc et techniciens de l'unité pour la bonne ambiance et surtout Aude, Luiza, Ren, Françoise, Pascaline, Emilie, Anne-France, Joelle ... .

Je remercie Catherine et Fabienne pour leur gentillesse et leur aide tout au long de ces 4 années passées au sein de l'unité UMR 8147.

Je désire remercier énormément mon oncle Philippe et son épouse Alice pour m'avoir recueillit au sein de leur maison pendant ces dernières années et surtout pour l'amour qu'ils m'ont donné et le confort de leur chaleureuse maison.

Je dis un grand merci à tous mes amis qui ont su m'encourager et me faire sentir leur présence à côté de moi malgré la distance qui nous sépare, spécialement Nagi qui a toujours eu confiance en mes capacités, Rindala, Rana, Mireille, Christelle et Sandra, pour leur amitié éternelle. Je voudrais remercier aussi mes amis ici en France qui m'ont supporté ces derniers mois et pour leur encouragement.

Je voudrais dire Merci à tous les membres de ma famille au Liban et mon oncle à Londres qui ont toujours pensé à moi, et surtout à mes grand-mères Rose et Souad. Je voudrais aussi remercier ma nouvelle famille ici en France pour son encouragement et son soutien, merci beaucoup la famille Chabene.

Je ne saurai quoi dire à mes parents et ma petite sœur qui m'ont toujours soutenu, encouragés, et ont souffert de mon éloignement. Je vous aime maman, papa, Stéphanie et j'espère qu'un jour je pourrai vous rendre fier de moi, c'est le seul cadeau que je puisse vous offrir.

A la fin, je réserve plus d'un Merci à l'homme de ma vie qui a su me comprendre et a pu traverser avec moi ces derniers mois très durs. Merci Mounir pour toute l'aide que tu m'as donné pour finir ma thèse surtout tes encouragements et ta présence à mes cotés.

LISTE DES ABREVIATIONS

α-GalCer	:	α-Galactosylcéramide
alum	:	Hydroxyde d'aluminium
β2m	:	β2 microglobuline
CD	:	Cluster of Differentiation
CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	:	Cellule Présentatrice d'Antigène
DN	:	Double Négatif
DP	:	Double Positif
EAE	:	Encephalomyélite autoimmune expérimentale
ECP	:	Eosinophil Cationic Protein
EDN	:	Eosinophil Derived Neurotoxin
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Essay
EPO	:	Eosinophil Peroxidase
FcεRI	:	Récepteur de haute affinité pour les IgE
FcεRII	:	Récepteur de faible affinité pour les IgE
GD3	:	Disialoganglioside
GM-CSF	:	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
h	:	heure
HRB	:	Hyperréactivité Broncho-pulmonaire
HSA	:	Heat Stable Antigen
ICAM	:	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	:	Interféron
Ig	:	Immunoglobuline
iGb3	:	isoglobotrihexosylcéramide
IL-	:	Interleukine
i.n.	:	intra nasale
iNKT	:	invariant Natural Killer T
i.p.	:	intra péritonéale
i.v.	:	intra veineuse
J	:	jour
LFA	:	Leukocyte Fonction Associated Antigen
LLBA	:	Liquide de Lavage Broncho-alvéolaire
LPS	:	Lipopolysaccharide
MBP	:	Major Basic Protein
MCA	:	Méthylcholanthrène
NOD	:	Non Obese Diabetic
OVA	:	Ovalbumine
Rag	:	Recombination Activating Gene
SAP	:	SLAM-associated Protein
s.c.	:	Sous cutané
SCID	:	Severe Combined Immune-Deficient
SLAM	:	Signaling Lymphocytic Activation Molecule
STAT-6	:	Signal Transducer and Activator of Transcription
TCR	:	T cell receptor (récepteur des lymphocytes T)
TGF	:	Transforming Growth Factor
Th	:	T helper (Lymphocyte T auxiliaire)

TNF	:	Tumor Necrosis Factor
Treg	:	Cellule T régulatrice
VCAM	:	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA-4	:	Very late activation antigen-4 (alpha4beta1 integrine)
XLP	:	X-Linked Lymphoprolifrative disease

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 9

I. ASTHME. 10
I.1. Généralités. *10*
I.2. Etiologie de l'asthme. *12*
I.2.1. Facteurs de risque endogènes. 12
I.2.2. Facteurs de risque exogènes. 13
I.3. Hypothèse de l'hygiène. *14*
I.4. Réactions d'asthme précoces et tardives. *16*
I.4.1. Réaction d'asthme précoce. 17
I.4.2. Réaction d'asthme tardive. 18
I.5. Réaction d'asthme chronique. *19*
I.6. Modèles murins utilisés pour mimer la maladie asthmatique humaine. *22*
I.7. Inflammation bronchique. *23*
I.7.1. Les acteurs de l'inflammation pulmonaire 25
I.8. Hyperréactivité Broncho-pulmonaire (HRB). *31*
I.9. Facteurs affectant l'asthme allergique. *33*
I.9.1. Cellules T régulatrices. 34
II. LYMPHOCYTES iNKT (INVARIANT NATURAL KILLER T) 35
II.1. Découverte et identification. *35*
II.2. Phénotype. *38*
II.3. Origine thymique des cellules iNKT. *40*
II.4. Stades de développement. *42*
II.5. Distribution tissulaire et homéostasie. *46*
II.6. Propriétés fonctionnelles des cellules iNKT. *49*
II.6.1. Les ligands. 49
II.6.2. Plasticité fonctionnelle. 52
II.7. Interaction avec différentes cellules. *54*
II.8. Cellules iNKT et pathologies. *57*
II.8.1. Tumeurs 57
II.8.2. Infections 59
II.8.3. Maladies autoimmunes 60

OBJECTIFS **63**

RESULTATS **65**

RESULTATS NON PUBLIES **86**

DISCUSSION ET PERSPECTIVES **93**

ANNEXE **107**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **116**

INTRODUCTION

I. Asthme.

"Most of us are familiar with the consequences of allergic disease. We all know people who are affected by asthma. The cost to public health and the economy are massive and growing, and a major research effort has been underway for many years to understand these diseases. Despite much progress, allergic diseases still present significant puzzles, which hinder the development of effective therapies."

(Campbell and Weiss,

Nature, November 1999, issue no. 6760.)

I.1. Généralités.

Les bases de l'allergie ont évolué lentement, du rhume des foins (*catarrus aestivus*) décrit par John Bostock en 1819 (Bostock, 1819), à la reconnaissance par Charles Blackley en 1873 des grains de pollen comme agent étiologique (Blackley, 1873), en passant par la découverte d'un facteur transférable à partir du sérum par Prausnitz et Küstner en 1921 (Prausnitz and Küstner, 1921) et enfin, à l'identification de ce facteur comme étant une sous classe d'immunoglobuline (immunoglobuline E ou IgE) par les Ishizaka aux Etats-Unis en 1966 (Ishizaka et al., 1966).

Les allergies sont des désordres du système immunitaire. Chez les individus sains, le système immunitaire est en équilibre entre une protection maximale contre les invasions externes ou internes et un minimum de nocivité vis à vis d'événements extérieurs ou intérieurs. Mais dans les maladies allergiques, cette balance délicate est rompue. En 1859,

Henry Hyde Salter fut le premier à décrire l'asthme comme étant une maladie de l'obstruction des voies aériennes (Salter, 1859). En 1960, la notion d'hyperréactivité broncho-pulmonaire s'est ajoutée à cette définition (Salter, 1990). En 1997, le National Heart, Lung and Blood Institut définit l'asthme comme étant «une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes, dans laquelle différents types cellulaires jouent un rôle, en particulier les mastocytes, les éosinophiles et les lymphocytes T. Chez les individus sensibles, cette inflammation déclenche des épisodes de sifflements, de la dyspnée, une oppression thoracique et de la toux particulièrement la nuit et/ou le matin. Ces symptômes sont généralement associés à des obstructions respiratoires variables régressant spontanément ou après traitement. L'inflammation induit également une augmentation de l'hyperréactivité broncho-pulmonaire à différents stimuli » (Hilman, 1997).

L'asthme est une maladie immunologique qui a dramatiquement augmenté ces deux dernières décennies. Dans les pays industrialisés, l'incidence de l'asthme a pratiquement doublé depuis 1980. Ainsi, cette maladie a atteint des proportions épidémiques (Umetsu et al., 2002).

L'asthme est causé par des facteurs environnementaux, comme l'exposition à des allergènes et des infections, chez des individus génétiquement prédisposés. Il est estimé qu'au moins une douzaine de gènes polymorphes régulent l'asthme, contrôlant la réponse inflammatoire, les immunoglobulines E, la production des cytokines et des chimiokines (Cookson, 1999) ainsi que le remaniement des voies aériennes (Van Eerdewegh et al., 2002). Bien que la composition génétique des populations des pays industrialisés n'ait pas significativement changé au cours de ces dernières années, l'environnement des civilisations industrialisées s'est dramatiquement modifié (Umetsu et al., 2002).

Depuis quelques années, il est admis que l'asthme est avant tout une maladie inflammatoire des voies aériennes. Le concept d'inflammation n'est pas nouveau puisqu'il fut découvert au début du siècle lors d'autopsies. Ce concept a été remis au premier plan grâce à l'utilisation de l'endoscopie bronchique permettant la réalisation de lavages broncho-pulmonaires et de biopsies bronchiques (Djukanovic, 1996). Plus récemment, le développement d'outils de biologie moléculaire et d'immunologie a permis d'affiner les analyses et d'étudier les cellules inflammatoires ainsi que les médiateurs impliqués dans le processus inflammatoire. Ces méthodes ont permis ainsi de définir le rôle de l'inflammation dans la pathogenèse de l'asthme ainsi que l'interaction des cellules inflammatoires avec les cellules résidentes des voies aériennes.

I.2. Etiologie de l'asthme.

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

I.2.1. Facteurs de risque endogènes.

Le terrain atopique est le principal facteur causal de l'asthme. L'atopie est une aptitude anormale d'un individu à synthétiser des IgE spécifiques dirigées contre les allergènes naturels entrant en contact avec l'organisme par des voies naturelles. Il s'agit d'allergies à caractère héréditaire diagnostiquées dans les familles (Holgate et al., 2005). Le terrain génétique est un élément essentiel de la maladie asthmatique surtout chez l'enfant. Ainsi considérant que le risque allergique moyen d'un enfant pris au hasard dans

la population est de 20 %, celui d'un enfant ayant un parent allergique sera de 40-45 % et celui d'un enfant né de parents tous deux allergiques approchera les 80-90 % (Gold and Kemp, 2005). Le stress psychologique comme les émotions, les contrariétés, l'anxiété et les tensions, peut être à l'origine du déclenchement d'une crise d'asthme (Chetta et al., 2005). Les hormones affectent le développement de l'asthme allergique. Les études épidémiologiques ont rapporté une prévalence plus élevée de l'asthme chez les garçons pendant l'enfance et chez la femme à l'age adulte (Ninan et al., 1992 ; Zannolli et al., 1997). D'un point de vue clinique, la période prémenstruelle est une période à risque. Il existe un autre pic de prévalence de l'asthme au moment de la ménopause chez la femme. Les oestrogènes et/ou la progestérone peuvent altérer les fonctions pulmonaires et l'asthme (Haggerty et al., 2003).

I.2.2. Facteurs de risque exogènes.

Au cours de ces dernières années, la prévalence de l'asthme a pratiquement doublé dans la plupart des pays industrialisés surtout chez les sujets jeunes (Hartert and Peebles, 2000). Bien que les facteurs génétiques prédisposent à cette maladie, il est peu probable que le caractère génétique soit à l'origine de cette brutale augmentation en moins d'un quart de siècle, ce qui suggère que la cause probable de cette épidémie est liée à l'environnement (Hartert and Peebles, 2000).

Des épisodes majeurs de pollution atmosphérique se sont produits les uns en Europe, les autres aux Etats-Unis, dans des configurations géographiques et des conditions météorologiques et climatiques très similaires (régions fortement industrialisées, saisons hivernales, phénomène d'inversion de températures, brouillards) (O.M.S., 1963). Il est

clair aujourd'hui que l'environnement joue un rôle dans le développement de l'allergie. Plusieurs facteurs environnementaux ont été étudiés à cause de leur impact sur l'asthme (Marshall, 2004). Il existe deux types de pollution atmosphérique : la pollution naturelle qui est reliée directement aux phénomènes naturels comme les éruptions volcaniques et les incendies de forêts, et la pollution anthropique qui est due aux activités humaines comme la production d'énergie (chauffage des locaux, fabrication d'électricité, industries, incinération des déchets), la pollution due aux voitures et le tabagisme (Marshall, 2004).

I.3. Hypothèse de l'hygiène.

L'hypothèse qui a reçu la plus grande attention pour expliquer l'augmentation des prévalences de l'asthme est « l'hypothèse de l'hygiène ». Cette hypothèse suggère que l'amélioration de l'hygiène dans les sociétés, avec le progrès manifeste des mesures de santé publique et l'utilisation des vaccins et des antibiotiques, ont réduit l'incidence des infections qui stimulent la production des cytokines antagonistes du développement de la réponse immune de type Th2, conduisant ainsi à l'augmentation de l'incidence des maladies atopiques (Strachan, 1989).

En effet, dans la société moderne, les enfants sont élevés dans des petites familles, et sont moins fréquemment exposés aux infections que ceux qui vivent dans des familles nombreuses. La réduction de l'atopie a été associée à un nombre élevé de frères et sœurs plus âgés (Ramset and Celedon, 2005), à l'entrée précoce dans les crèches, à l'utilisation réduite d'antibiotiques ainsi qu'à l'exposition fréquente à un environnement rural (Racila and Kline, 2005).

Les premières investigations se sont concentrées sur les effets des manifestations immunes de type Th1 (infections bactériennes, par exemple), connus pour contre réguler les réponses Th2 associées à l'allergène. L'infection avec plusieurs pathogènes comme *Mycobacteria tuberculosi* ou les virus respiratoires, peut induire des réponses de type Th1 et limiter les réponses Th2, importantes pour l'asthme (Umetsu et al., 2002). Cependant, plusieurs études dans différents pays n'ont montré aucune association entre les infections mycobactériennes et/ou l'immunisation avec BCG (Bacille Calmette-Guérin) (Ramsey and Celedon, 2005).

L'augmentation de l'incidence de l'allergie est associée à une réduction de la prévalence de la colonisation du tractus gastrointestinal chez les enfants infectés avec des souches bactériennes commensales comme bifidobactérie et lactobacillus (Bjorksten et al., 1999). De même, l'exposition à lactobacillus pendant la période néonatale semble protéger contre le développement de l'atopie (Kalliomaki et al., 2001). Des expériences chez les souris ont montré que la colonisation bactérienne de l'intestin est essentielle pour la maturation des réponses immunes de type Th1, et l'induction de la tolérance orale (Ramsey and Celedon, 2005). L'administration d'antibiotiques chez des souris jeunes conduit à des altérations de la flore intestinale et à une diminution des réponses immunes de type Th1 qui peuvent être évitables par l'administration de probiotiques (Sudo et al., 2002). Bien que l'effet à long terme de l'administration d'antibiotiques sur la flore intestinale des jeunes enfants ne soit pas encore bien connue, il a été postulé que l'administration d'antibiotiques en bas âge conduit à des altérations de la flore intestinale et à une augmentation du risque d'atopie et d'asthme chez les enfants (Ramsey and Celedon, 2005). Cependant, aucune étude épidémiologique publiée jusqu'à maintenant ne montre une association entre l'utilisation des antibiotiques durant l'enfance et l'immunisation aux allergènes comme le

rhume des foins (Bremner et al., 2003) et l'asthme (Celedon et al., 2004). Ce n'est pas surprenant d'avoir de tels résultats car l'asthme comprend des phénotypes atopiques et non-atopiques et une grande proportion de cas d'asthme n'est pas diagnostiquée durant l'enfance. Puisque la plupart des individus avec une atopie ne développent pas d'asthme et puisqu'une proportion d'individus développant l'asthme n'est pas atopique, les facteurs qui peuvent protéger contre le développement de l'immunisation allergénique peuvent ne pas avoir de relations avec l'asthme. De plus, des expositions qui peuvent être protectrices contre l'asthme chez des individus à bas risque, peuvent ne pas être protectrices et même nuisibles chez des individus à haut risque de développer l'asthme (Ramsey and Celedon, 2005).

Il est vrai que les facteurs de risques endogènes et exogènes sont en partie responsables de l'augmentation des maladies atopiques et de l'asthme, cependant il ne faut pas oublier l'hypothèse de l'hygiène qui suggère que l'augmentation des maladies Th2 est liée à la diminution des maladies Th1 et ceci en raison de notre mode de vie moderne. Toutefois, cette théorie ne peut être la réponse unique pour expliquer l'augmentation des maladies allergiques.

I.4. Réactions d'asthme précoces et tardives.

L'asthme allergique est caractérisé par une hypersensibilité à des allergènes avec augmentation du titre des IgE sériques. Chez un sujet sensibilisé, « individu présentant une augmentation d'IgE spécifiques contre l'allergène exogène inhalé lors d'un contact précédent (immunisation allergénique) », une nouvelle inhalation de cet antigène provoque

successivement deux types de réactions bronchiques : la réaction précoce et la réaction tardive (Figure 1).

I.4.1. Réaction d'asthme précoce.

La réaction précoce ou immédiate se manifeste par une diminution des débits expiratoires et l'apparition des symptômes asthmatiques comme la dyspnée, la sensation d'oppression thoracique et la toux. Ces symptômes apparaissent dès la première heure après exposition à l'allergène. Cette réaction immédiate est principalement due à une contraction des muscles lisses bronchiques et à un œdème de la muqueuse en réponse à des médiateurs d'origine essentiellement mastocytaire (Redington and Howarth, 1994). Ces derniers comprennent des médiateurs préformés contenus dans les granules (histamine, peroxydase, facteurs chimiotactiques et protéases neutres) et néo-formés (superoxyde, cytokines, facteur d'activation des plaquettes (PAF), leucotriènes (LT) et prostaglandines (PG)). Les médiateurs préformés sont responsables du bronchospasme qui est accompagné de vasodilatation, de perméabilisation vasculaire et de l'augmentation des sécrétions glandulaires. Les médiateurs néo-formés participent aux mêmes mécanismes que les médiateurs préformés, mais ils ont aussi une activité proinflammatoire préparant le microenvironnement à la réaction tardive (Horwitz et al., 1995). Cette réaction s'estompe habituellement en moins d'une heure.

I.4.2. Réaction d'asthme tardive.

Par la suite, certains sujets peuvent présenter une deuxième réaction asthmatique appelée tardive. Elle apparaît trois à huit heures après l'inhalation de l'allergène (O'Byrne et al., 1987). Elle s'accompagne d'une inflammation bronchique caractérisée par une augmentation du nombre de lymphocytes et d'éosinophiles mise en évidence par l'analyse du liquide de lavage bronchoalvéolaire (Frew et al., 1990 ; Resnick et al., 1993). Certaines cytokines agissent sur l'endothélium et l'épithélium bronchiques et augmentent la synthèse des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-I) qui mobilisent les éosinophiles vers les poumons. Ces éosinophiles relâchent leurs granulations riches en protéines cytotoxiques comme les MBP (Major Basic Protein), l'EPO (Eosinophil Peroxidase), l'EDN (eosinophil-derived neurotoxin) et l'ECP (Eosinophil Cationic Protein). Les cytokines sécrétées par les lymphocytes pourraient expliquer l'apparition de l'inflammation chronique. Chez les asthmatiques qui présentent une réaction tardive, il existe des corrélations variables mais significatives entre l'intensité de cette réaction et l'amplitude de la réaction immédiate, la quantité d'allergène inhalée, la réactivité immunologique du sujet à cet allergène et la réactivité non allergique de ses voies aériennes (Dubé and Boulet, 1996). Il semble que tout asthmatique peut avoir une réaction tardive s'il inhale des quantités suffisantes d'allergène, en utilisant un broncho-dilatateur à courte durée d'action avant et pendant la provocation antigénique pour inhiber la réaction immédiate (Twentyman et al., 1991).

.

I.5. Réaction d'asthme chronique.

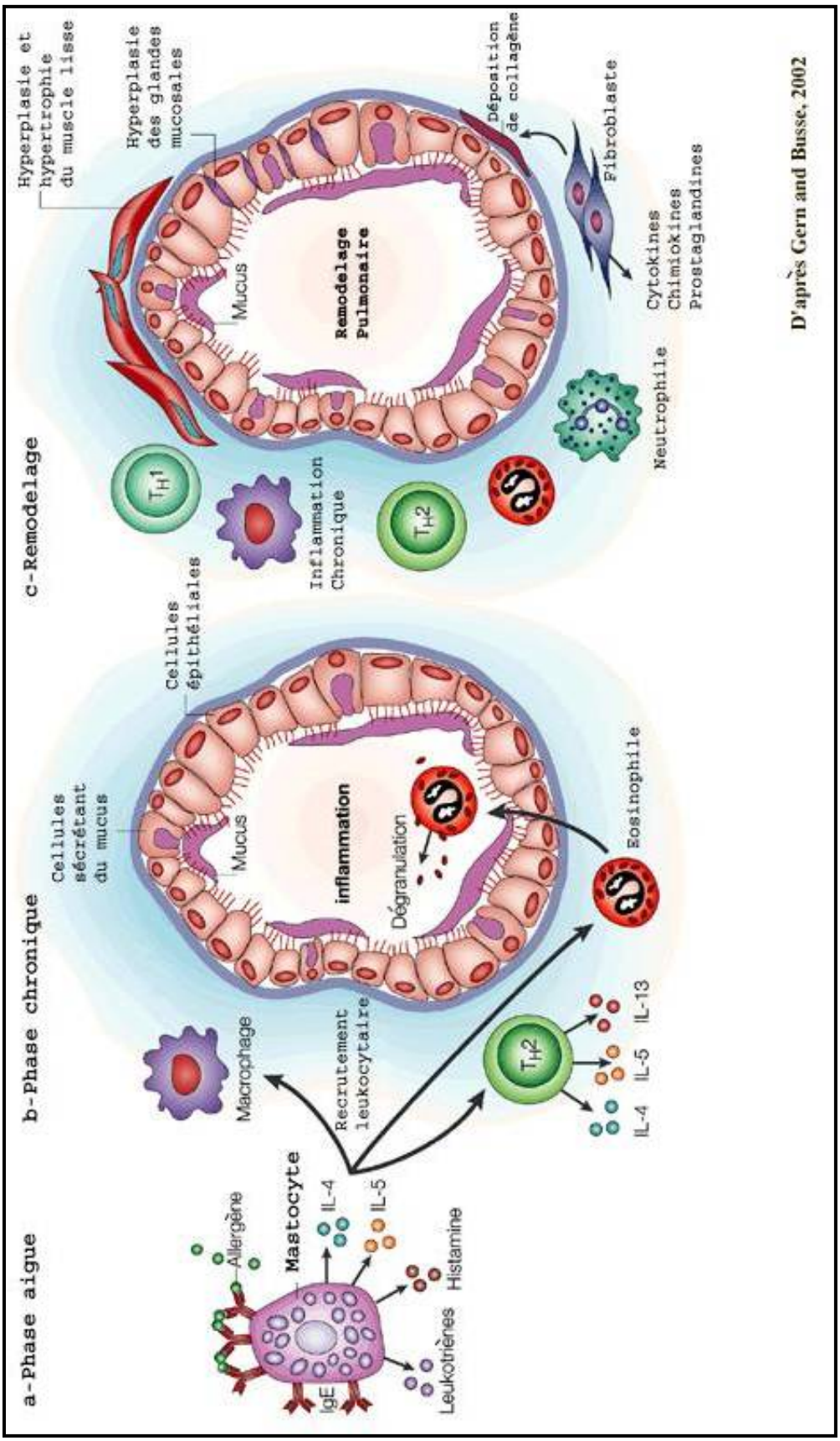
Les réactions d'asthme précoces et tardives qui se développent quelques heures après l'inhalation de l'antigène, sont suivies d'une réaction chronique (Figure 1) qui dure et se développe pendant des années. Cette réaction engendre des lésions au niveau des poumons, ce qui induit le remodelage de cet organe. Les modifications structurales bronchiques survenues chez les patients asthmatiques en réponse à une inflammation persistante incluent une hyperplasie et une hypertrophie du muscle lisse bronchique, une fibrose sous-épithéliale, une hyperproduction de mucus et une desquamation épithéliale. La première étude quantitative du remodelage des poumons, réalisée par Huber et Koessler en 1922, a montré sur des coupes transversales que la paroi des voies respiratoires et du muscle lisse était plus épaisse chez les patients décédés d'asthme que chez les patients décédés d'autres causes (Huber et Koessler, 1922).

Les changements structuraux observés dans l'asthme sont secondaires à l'inflammation. Les fibroblastes sub-épithéliaux peuvent être transformés en myofibroblastes et myocytes en réponse au TGF-β sécrété par l'épithélium endommagé (Zhang et al., 1999). La fibrose est liée à une accumulation de fibres de collagène de type I, III, et V et de fibronectine (Redington, 2000 ; Maddox and Schwartz, 2002) résultant d'une hyperplasie des fibroblastes qui se transforment en myofibroblastes à l'origine de la synthèse des fibres de collagène accumulées en excès dans la matrice extracellulaire (Brewster et al., 1990). Les cellules du muscle lisse pulmonaire et les fibroblastes répondent à une large gamme de stimuli inflammatoires mitogéniques et mécaniques grâce au grand nombre de récepteurs de surface (James, 2005).

Les décès dans l'asthme surviennent à la suite d'une occlusion des voies aériennes conduisant à une asphyxie. Une partie de cette occlusion est due au mucus. La production excessive de mucus provient de la prolifération des cellules mucipares et d'une hyperplasie des glandes séromuqueuses. L'hypersécrétion de mucus réduit la tension de surface et augmente la probabilité de formation de bouchons de mucus dans la lumière bronchique (Fahy, 2001).

La desquamation épithéliale correspond à la destruction et à l'élimination des cellules épithéliales différenciées, sans affecter les cellules basales. Elle résulte des effets des médiateurs inflammatoires, comme les protéines cytotoxiques libérées à partir des granulations éosinophiles, les radicaux oxygénés libres et les protéases libérées par les cellules inflammatoires. Dans les expectorations et les LLBA (liquides de lavages broncho-alvéolaires) de sujets asthmatiques, des amas de cellules épithéliales formant une structure particulière, le « corps de Créola », ont été retrouvés (Fahy, 2001).

Figure 1 : Phases de l'asthme allergique.



I.6. Modèles murins utilisés pour mimer la maladie asthmatique humaine.

Afin d'aboutir à des diagnostics plus précis ou éventuellement prévenir, voire guérir l'asthme allergique, il est primordial d'étudier les mécanismes immuno-régulateurs impliqués dans cette maladie. Cependant, pour des raisons évidentes, ces études sont très difficiles et compliquées à réaliser chez l'homme. Actuellement, les souris sont les espèces les plus largement utilisées dans les recherches sur l'asthme allergique expérimental et cette utilisation a débuté vers les années 90. La similitude entre l'asthme allergique humain et l'asthme allergique expérimental murin ainsi que la disponibilité du matériel immunologique, la disponibilité de souches de souris transgéniques ou déficientes pour des cytokines, leurs récepteurs ou un type cellulaire donné, ont favorisé l'utilisation de ces animaux dans les modèles expérimentaux. Le modèle murin d'inflammation allergique présente plusieurs caractéristiques de la maladie clinique. Les souris allergiques présentent des réponses immédiates et tardives ainsi que des IgE spécifiques de l'antigène, un recrutement éosinophilique et une hyperréactivité broncho-pulmonaire. Les modèles murins peuvent être utilisés pour étudier différents aspects du remodelage pulmonaire, caractéristique de la réaction chronique. Plusieurs cytokines, chimiokines et leurs récepteurs impliqués dans la maladie humaine, jouent également un rôle dans le modèle murin. Les outils existant pour les étudier favorisent d'autant plus l'utilisation du modèle murin.

Le modèle plus couramment utilisé consiste à faire une immunisation systémique de souris BALB/c ou C57BL/6 par l'antigène expérimental, l'ovalbumine (OVA), couplé à l'adjuvant. Cette procédure induit une augmentation des quantités d'IgE spécifiques

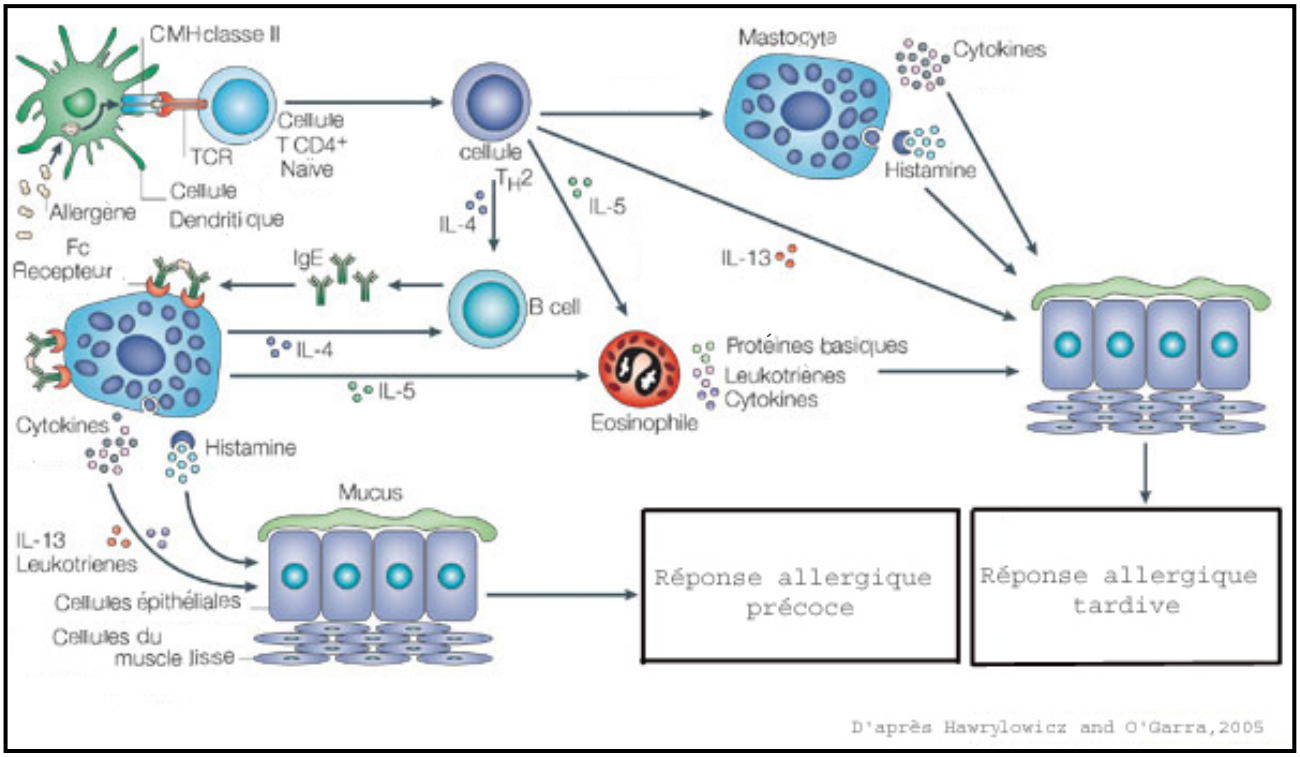
d'OVA dans le sérum, entité typique de l'immunisation et caractéristique de l'atopie humaine. Quelques jours plus tard, les souris sont à nouveau stimulées avec l'antigène sous forme d'aérosol. Cette étape est cruciale pour déclencher l'infiltration des éosinophiles dans les voies aériennes ainsi que l'hyperréactivité pulmonaire. Ce protocole peut varier selon les symptômes recherchés. Il peut être court, de quelques semaines, et induire une réponse aigue ou à l'inverse plus long, avec des immunisations répétées, et induire un asthme chronique caractérisé par le dépôt de collagène et le remodelage du tissu pulmonaire.

I.7. Inflammation bronchique.

Les réactions immunes observées au cours de l'asthme allergique expérimental sont résumées comme suit : lorsque l'allergène et son adjuvant pénètrent pour la première fois dans l'organisme, il est dégradé et présenté à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), notamment les cellules dendritiques. Ces dernières le présentent aux lymphocytes T $CD4^+$ naïfs qui se différencieront en lymphocytes T $CD4^+$ Th2. Ces lymphocytes activent les lymphocytes B qui sécrètent des immunoglobulines (Ig) de type E spécifiques pour l'allergène. Cette réaction est connue sous le nom d'immunisation. La deuxième rencontre avec l'allergène (nous appelerons cette étape de « challenge ») par les voies aériennes, déclanche une cascade d'événements aboutissant à l'inflammation pulmonaire. En effet, l'allergène se fixe aux IgE présentes à la surface des mastocytes induisant leur dégranulation et la libération de leurs contenus intracellulaires comme l'histamine, les leucotriènes et d'autres médiateurs de l'allergie qui induisent la perméabilité et la contraction du muscle lisse ainsi que la production de mucus dans les poumons. Les polynucléaires éosinophiles sont recrutés massivement vers le site de

l'inflammation. L'interleukine IL-5, l'éotaxine et les molécules d'adhésion vont faciliter ce recrutement. Les éosinophiles libèrent des médiateurs de l'allergie notamment les protéines basiques. Tout ce cocktail de cellules inflammatoires, de cytokines, de médiateurs allergiques, provoque des lésions au niveau du muscle bronchique et induit les symptômes de l'inflammation bronchique de l'asthme notamment l'HRB (hyperréactivité broncho-pulmonaire) (Figure 2). Les mécanismes impliqués dans cette inflammation bronchique et la HRB seront détaillés ci-dessous.

Figure 2 : Inflammation pulmonaire.



I.7.1. Les acteurs de l'inflammation pulmonaire

La peau et les muqueuses sont continuellement exposées aux antigènes étrangers. Les cellules dendritiques représentent une proportion significative de cellules tapissant ces barrières (De Heer et al., 2005) et elles sont distribuées tout au long des différents compartiments pulmonaires (Sertl et al., 1986 ; Suda et al., 1998). La capture de l'allergène induit la maturation de ces cellules qui acquièrent un phénotype de CPA professionnelles (Van Rijt and Lambrecht, 2005). Après la capture, les cellules dendritiques dégradent l'antigène en petits peptides immunogéniques. Ces peptides sont chargés sur les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I (CMH I) ou II (CMH II) et transportés de la muqueuse vers les ganglions lymphatiques drainant les poumons où les CPA les présentent aux lymphocytes T (Van Rijt and Lambrecht, 2005). Les cellules effectrices T migrent ensuite vers les sites inflammatoires où elles pourront être encore une fois stimulées par les cellules dendritiques (Lambrecht et Hammad, 2003). L'interaction entre les cellules T $CD4^+$ et les cellules dendritiques matures est importante pour le déclanchement de la réaction inflammatoire puisqu'elle engendre la sécrétion de cytokines qui exacerbent l'inflammation bronchique.

Le rôle essentiel des cellules T effectrices de type Th2 a été suggéré grâce à la présence massive de cellules T produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 dans les poumons des patients et des souris asthmatiques. Cette hypothèse à été confirmé par des données montrant que les animaux dépourvus de cellules T de type Th2 comme les souris déficientes ou déplétées en cellules T $CD4^+$ (Chapoval et al., 2001 ; Komai et al., 2003), ou les souris déficientes pour le facteur de transcription STAT-6 (Kuperman et al., 1998), ne développent pas d'inflammation allergique pulmonaire après immunisation et challenge.

D'autre part, les souris déficientes en facteur de transcription T-bet (qui ne développent pas de réponse de type Th1), développent spontanément une inflammation éosinophilique pulmonaire (Finotto et al., 2002).

Plusieurs données de la littérature confortent le rôle des lymphocytes Th2 dans la progression de l'asthme. En effet, l'administration de cellules $CD4^+$ Th2 spécifiques de l'OVA provenant de souris transgéniques ou de souris immunisées, à des souris naïves, est capable de transférer le développement de l'éosinophilie pulmonaire et l'HRB, après challenge par le même antigène (Cohn et al., 1998 ; Hogan et al., 1998). De plus, le rôle des cellules et des cytokines de type Th2 au cours du challenge a été mis en évidence par des travaux utilisant des souris transgéniques exprimant un mutant pour GATA-3, facteur de transcription important pour la différentiation des cellules Th2. En effet, l'administration, avant le challenge, d'un nucléotide antisens pour GATA-3 à des souris immunisées, inhibe la réponse Th2 et par conséquent l'inflammation pulmonaire et l'HRB (Finotto et al., 2001).

Les lymphocytes Th2 orchestrent toute une série de réponses immunes qui aggravent les symptômes de l'asthme. En effet, les lymphocytes Th2, via leur production des cytokines, ont un rôle primordial dans la commutation isotypique des lymphocytes B qui synthètisent des IgE spécifiques d'allergènes. Ces IgE déclenchent une cascade de réponses via leur capacité à se fixer sur des récepteurs FcεRI de haute affinité présents à la surface des mastocytes et des basophiles.

Les mastocytes sont parmi les premières cellules impliquées dans la réaction asthmatique in situ. Ils sont présents tout au long de l'arbre respiratoire, principalement

localisés dans la paroi, les glandes et la lumière bronchique et prédominent dans la sous-muqueuse (Tillie-Leblond et al., 2004). Les mastocytes possèdent à leur surface des récepteurs de forte et de faible affinités aux IgE. Après activation par le pontage de ces récepteurs, les mastocytes dégranulent et libèrent leurs médiateurs. Cette libération survient quelques minutes après l'inhalation de l'antigène. Les mastocytes contiennent des médiateurs préformés stockés dans leurs granules cytoplasmiques, comme l'histamine, la sérotonine, la chymase et la tryptase (Enerback, 1997). Ces médiateurs préformés participent à la réaction immédiate en induisant la contraction du muscle lisse et en exerçant un effet toxique direct sur les cellules épithéliales (Bousquet et al., 2000). Toutefois, ces cellules participent également à la réaction asthmatique tardive grâce à l'élaboration de cytokines (Metcalfe et al., 1997) comme l'IL-4, l'IL-5, et l'IL-13 qui affecteraient l'activation et l'attraction des éosinophiles (Van Rijt and Lambrecht, 2001). Les mastocytes sont aussi capables de synthétiser des médiateurs appelés médiateurs néoformés comme les leukotriènes et les prostaglandines et leur libération entraîne une bronchoconstriction, un œdème des voies aériennes et une hypersécrétion de mucus (Tillie-Leblond et al., 2004). Ces médiateurs libérés participent au remodelage de la paroi bronchique.

Les basophiles présentent des caractéristiques communes avec les mastocytes et sont considérés comme des acteurs potentiels dans la maladie asthmatique. Leur activation est dépendante des IgE qui induisent leur dégranulation, la libération de médiateurs préformés et la synthèse de médiateurs néoformés (MacGlashan et al., 1994). Ces cellules sont elles aussi une source l'histamine et libèrent un nombre varié de cytokines dont l'IL-4 et l'IL-13 (MacGlashan et al., 1994 ; Dy and Schneider, 2004).

Les neutrophiles et les macrophages participent également à la réaction inflammatoire. Ils libèrent des médiateurs inflammatoires et des cytokines qui peuvent être à l'origine de la dégradation de l'épithélium respiratoire et servent de facteurs chimiotactiques pour d'autres cellules inflammatoires bronchiques (Tillie-Leblond et al., 2004). Les macrophages pulmonaires produiraient aussi de l'éotaxine-2 (Pope et al., 2005). Cependant, le rôle des macrophages n'est pas primordial pour l'inflammation bronchique puisque le transfert adoptif de macrophages chez des souris déplétées en cellules $CD11c^+$ n'est pas capable de restaurer la réponse inflammatoire induite par l'OVA (Van Rijt et al., 2005).

L'éosinophilie est une des principales caractéristiques de l'inflammation bronchique allergique. Ces cellules sont à l'origine des lésions épithéliales bronchiques et de l'obstruction respiratoire, en raison de leur capacité à libérer une panoplie de granules cytotoxiques comme la MBP (Major Basic Proteine), l'ECP (Eosinophil Cationic Protein), l'EPO (Eosinophil Peroxidase), et l'EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin), capables d'induire des lésions et des dysfonctions tissulaires (Gleich and Adolphson, 1986).

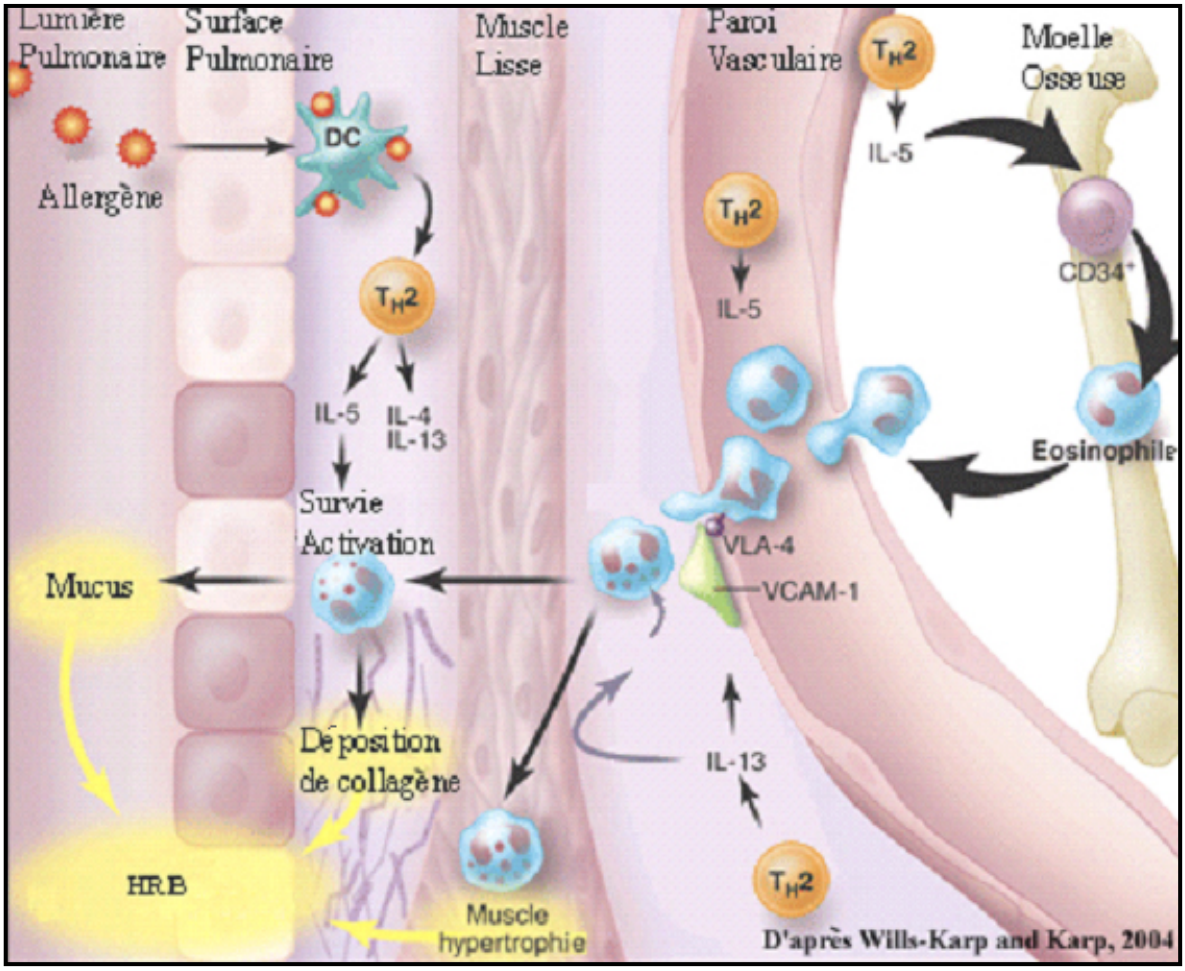
Les éosinophiles sont produits dans la moelle osseuse à partir d'un précurseur dérivé du progéniteur des granulocytes/monocytes. Ces progéniteurs portent l'IL-5Rα et en présence d'IL-5, se différencient en éosinophiles (Iwasaki et al., 2005). Trois cytokines, l'IL-3, l'IL-5 et le GM-CSF sont particulièrement importantes dans la régulation du développement des éosinophiles. Le rôle critique de l'IL-5 dans la production des éosinophiles a été démontré par des travaux utilisant des souris génétiquement manipulées. En effet, la surproduction d'IL-5 chez les souris transgéniques induit une éosinophilie intense (Mishra et al., 2002), et la délétion du gène de l'IL-5 ou le traitement par l'anti-IL-

5 conduit à une réduction des éosinophiles dans les poumons de souris (Foster et al., 2001 ; Mattes et al., 2002).

D'autres molécules, comme les facteurs de transcription GATA (Mc Nagny and Graf, 2002) sont tout aussi importantes pour le développement des éosinophiles. Les souris déficientes en GATA-1 n'ont pas d'éosinophiles et la surexpression de GATA-1 ou GATA-2 stimule, dans les essais in vitro, la formation de colonies d'éosinophiles au dépend des colonies de granulocytes/monocytes (Hirasawa et al., 2002).

Le recrutement et l'accumulation des éosinophiles dans le site inflammatoire requièrent la coopération de plusieurs substances. Sous l'influence de différents stimuli, les éosinophiles migrent du sang vers le site inflammatoire par diapédèse (Figure 3). Pour cela, ils adhèrent à la paroi de l'endothélium vasculaire et la traversent pour s'accumuler dans les tissus. Cette migration met en jeu une série de cytokines en particulier l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 produites par les cellules endothéliales et les cellules Th2, des chimiokines comme RANTES, l'éotaxine (Rothenberg and Hogan, 2006), et d'autres molécules nouvellement identifiées comme la chitinase (AMCase : Acidic Mammalian Chitinase) (Zhu et al., 2004).

Figure 3 : Eosinophilie.



L'IL-5 et l'éotaxine sont spécialement impliquées dans la régulation de la circulation des éosinophiles. L'IL-5 régule la maturation, la différentiation, l'activation et la survie des éosinophiles et fournit des signaux essentiels pour l'expansion et la mobilisation de la moelle osseuse vers les poumons, après exposition allergénique (Collins et al., 1995). L'activité spécifique des éotaxines (éotoxine-1 et éotoxine-2) passe par leur récepteur CCR3 exprimé à la surface des éosinophiles (Pope et al., 2005). L'éotaxine a été découverte initialement chez les cochons d'Inde dans le cadre de recherches ayant pour but

d'identifier les molécules responsables de l'accumulation des éosinophiles dans les poumons. (Jose et al., 1994). Le rôle de l'éotaxine dans l'inflammation éosinophilique a été montré chez des souris déficientes en éotaxine-2 chez lesquelles le nombre d'éosinophiles est diminué dans le LLBA et chez des souris doubles déficientes en éotaxine-1 et éotaxine-2 chez lesquelles cette diminution est encore plus marquée. Ces résultats sont identiques chez les souris déficientes en récepteur CCR3 (Pope et al., 2005).

Les éosinophiles expriment des molécules d'adhésion dont les intégrines α4 et β7, la famille des molécules CD18 (β2-intégrine), et la molécule VLA-4 (β1-intégrine). La famille CD18 inclut LFA-1 et Mac-1 qui interagissent avec les cellules endothéliales via la molécule ICAM. VLA-4 interagit avec l'endothélium via la molécule VCAM-1. Ces intégrines jouent un rôle dans la circulation des éosinophiles durant l'inflammation (Rothenberg and Hogan, 2006). Les métabolites dérivant de l'acide arachidonique comme la leucotriène LTB4, la cysteinyl leucotriène LTC4 et la prostaglandine PGD2 sont importantes pour l'accumulation et le recrutement des éosinophiles dans différents modèles inflammatoires. Les souris ayant une délétion du récepteur LTB4 présentent une diminution du nombre d'éosinophiles dans les poumons (Tager et al., 2000).

I.8. Hyperréactivité Broncho-pulmonaire (HRB).

L'ensemble des cytokines sécrétées, des médiateurs relargués et des cellules recrutées vers les poumons induisent des lésions au niveau du tissu musculaire bronchique provoquant ainsi l'Hyperréactivité Broncho-pulmonaire (HRB) caractéristique de l'asthme allergique.

L'HRB est une réponse bronchoconstrictive exagérée à la suite de l'exposition à un stimulus physique ou chimique auquel un sujet normal ne réagirait pas. L'HRB est responsable des symptômes associés à l'asthme tels que la toux, la dyspnée, les sifflements et l'oppression thoracique. L'obstruction bronchique variable, qui caractérise l'asthme, est en étroite association avec I'HRB bien que les composantes du phénomène inflammatoire tels que l'oedème et les sécrétions bronchiques semblent également y contribuer. En laboratoire, on mesure l'HRB à l'aide de test de provocation à la métacholine, agent cholinergique qui induit une bronchoconstriction par son effet direct sur les récepteurs muscariniques. L'HRB correspond à une augmentation de la réponse contractile des voies aériennes à différents stimuli (Hargreave et al., 1986).

Plusieurs travaux ont suggéré que l'éotaxine et l'IL-5 coopèrent pour augmenter le recrutement des éosinophiles vers les poumons et l'HRB. Toutefois, des études récentes montrent que l'inhibition de l'action de l'IL-5 supprime l'éosinophilie pulmonaire en réponse à l'antigène inhalé, mais cet effet ne s'accompagne pas de réduction de l'HBR (Boyce and Aisten, 2005).

Pour mieux comprendre le rôle des éosinophiles dans la maladie asthmatique, deux lignés de souris déficientes en éosinophiles ont été développées. Les souris PHIL (Lee et al., 2004) sont déplétées en éosinophiles en ciblant l'expression de la chaîne de la toxine A de la diphtérie sous contrôle du promoteur EPO (Eosinophil peroxidase promoter). Elles sont protégées de l'HRB et de l'accumulation de mucus dans un modèle d'asthme expérimental. En revanche, les souris Δdbl-GATA (Humbles et al., 2004) déplétées en site d'attachement de GATA sur le promoteur GATA-1, ce qui conduit à la suppression de la lignée éosinophilique, sont protégées contre les composantes du remodelage du poumon

mais pas de l'HRB. Cette divergence de résultats concernant l'HRB est difficile à expliquer, cependant les souris Δdb1-GATA présentent encore des éosinophiles dans le tissu pulmonaire. Une autre explication possible serait la différence de fond génétique (C57BL/6 pour PHIL et BALB/c pour Δbdl-GATA). Cependant ceci ne peut pas tout expliquer puisqu'une équipe utilisant elle aussi la souche BALB/c a trouvé une diminution de l'HRB chez les souris déficientes en IL-5 et éotaxine (Mattes et al., 2002). Les résultats trouvés chez les souris PHIL correspondent à des travaux déjà publiés où la déplétion en éosinophiles conduit à une diminution de l'HRB (Justice et al., 2003). Ainsi, il existe un consensus sur le rôle des éosinophiles dans l'inflammation bronchique, cependant leur implication dans l'HRB reste encore à déterminer.

Si l'implication des éosinophiles dans l'HRB est encore controversée, des données récentes désignent l'IL-13 comme facteur primordial pour le développement de cette hyperréactivité. En effet, l'inhibition de l'IL-13 durant le challenge inhibe le développement de l'HBR (Grunig et al., 1998). De même, des études sur des souris déficientes en IL-13 ou traitées par des anticorps bloquants anti-IL-13 montrent une diminution de l'HBR (Walter, 2001). De plus, le transfert adoptif de cellules Th2 spécifiques de OVA provenant de souris déficientes en IL-13, ne provoque pas l'HBR chez les souris SCID, bien que ces cellules Th2 produisent des quantités élevées d'IL-4 et d'IL-5 (Walter et al., 2001).

I.9. Facteurs affectant l'asthme allergique.

Comme décrit auparavant, plusieurs facteurs sont impliqués dans l'exacerbation de la maladie pulmonaire et plusieurs cellules et médiateurs coopèrent pour induire l'asthme

allergique. Cependant, certaines populations cellulaires, comme les cellules T régulatrices peuvent inhiber la réponse asthmatique.

I.9.1. Cellules T régulatrices.

Le terme de cellules T régulatrices ou Treg est communément employé pour définir une population particulière de lymphocyte T qui contrôle plutôt négativement les propriétés fonctionnelles d'autres cellules du système immunitaire. Les cellules Treg sont impliquées dans le développement des maladies autoimmunes, dans le rejet de greffes, ainsi que dans les processus allergiques et dans l'asthme (Akbari and Umetsu, 2004). Les quatre principaux types de cellules T $CD4^+$ régulatrices sont: les cellules Th3, les cellules T_R1, les cellules T $CD4^+CD25^+$, et les cellules iNKT. Les cellules T $CD4^+$ Th3 agissent principalement via leur production de TGF-β (Chen et al., 1994 ; Faria and Weiner, 2005), tandis que les cellules T_R1 pourraient inhiber la prolifération des cellules effectrices via leur production d'IL-10. Il a été décrit que les cellules T_R1 bloquent le développement de l'asthme allergique via leur production d'IL-10 (Akbari et al, 2002).

Les cellules T régulatrices $CD4^+$, qui expriment le récepteur alpha de l'IL-2, ($CD25^+$), sont dénommés cellules T régulatrices « naturelles » et sont originaires du thymus (Jordan et al., 2001). Ces cellules $CD4^+CD25^+$ portent à leur surface le récepteur CTLA-4 et le GITR (glucocorticoid-inducible tumor necrosis factor receptor) (Shimizu et al., 2002). Le marqueur le plus spécifique à l'heure actuelle pour identifier ces lymphocytes est le facteur de transcription Foxp3 (Hori et al., 2003). Les mécanismes par lesquels les lymphocytes $CD4^+CD25^+$ contrôlent la réponse immune ne sont pas encore bien élucidés, mais plusieurs auteurs ont suggéré la nécessité du contact cellulaire ainsi que

leur sécrétion d'IL-10 et du TGF-β (Umetsu et al., 2003). Les cellules régulatrices $CD4^+CD25^+$ peuvent influencer le développement de l'asthme allergique puisqu'il a été démontré que le transfert adoptif de ces cellules inhibe l'inflammation des voies aériennes et la HRB d'une façon dépendante d'IL-10 (Kearley et al., 2005). De plus, les cellules $CD4^+CD25^+$ peuvent limiter l'activation des cellules dendritiques et ainsi leur capacité à promouvoir une réponse asthmatique de type Th2 (Lewkowich et al., 2005).

En plus des cellules $CD4^+CD25^+$, une autre population de cellules régulatrices, les lymphocytes iNKT, pourrait également jouer un rôle dans le développement de l'asthme allergique. Mon travail de thèse est focalisé sur l'implication possible des lymphocytes iNKT dans la sévérité de cette maladie, et un résumé de leurs principales caractéristiques est présenté au cours des paragraphes suivants.

II. Lymphocytes iNKT (invariant Natural Killer T).

II.1. Découverte et identification.

Au cours des années 80, plusieurs équipes ont décrit des populations particulières des lymphocytes T que plus tard se sont avéré être des lymphocytes NKT (Natural Killer T). En 1987, trois équipes ont décrit une population minoritaire (0,4%) de lymphocytes T $CD4^-CD8^-$, DN (double négatif), qui exprime majoritairement la chaîne Vβ8 du TCR (Budd et al., 1987 ; Ceredig et al., 1987 ; Fowlkes et al., 1987). Sykes et Ballas montrèrent que ces cellules DN expriment le marqueur NK1.1, spécifique jusqu'à présent des cellules NK, mais que, de façon similaire aux lymphocytes T mémoires/activées, ces cellules ne

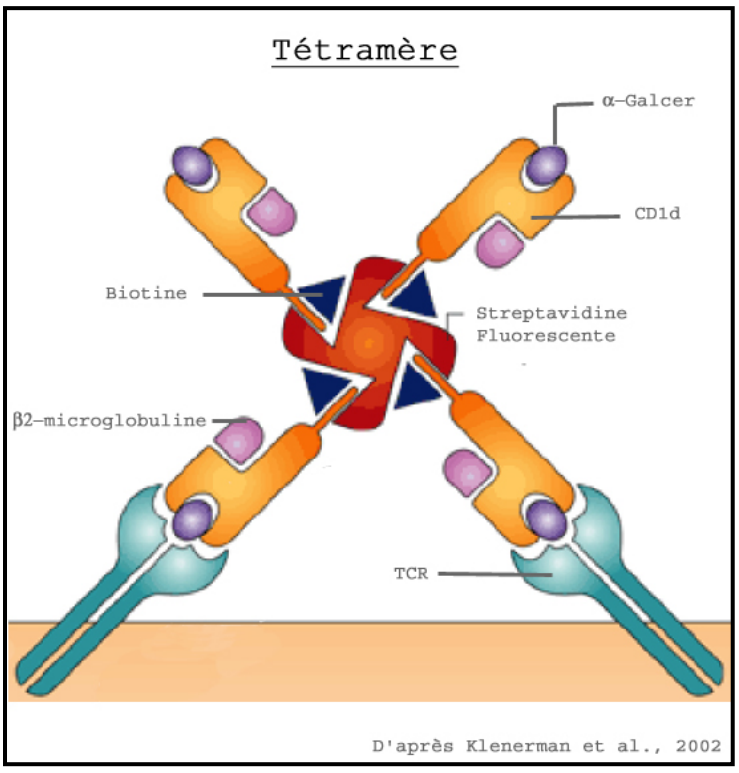
portent pas la molécule CD62L (Sykes, 1990 ; Ballas and Rasmussen, 1990). La démonstration que de lymphocytes TCR$\alpha\beta^+$NK1.1$^+$DN ou TCR$\alpha\beta^+$NK1.1$^+$CD4$^+$ produisaient massivement des cytokines immuno-régulatrices comme l'IL-4 et l'IFN-γ (Zlotnik et al., 1992 ; Arase et al., 1993 ; Yoshimoto and Paul, 1994) a déclenché un intérêt croissant sur ces lymphocytes non conventionnels. Ensuite, les travaux de Lantz et Bendelac (Lantz and Bendelac, 1994) ont montré que ces populations non conventionnelles de cellules T (avec un phénotype de cellules mémoires/activées et des marqueurs de cellules NK) possédaient la chaîne Vα14-Jα18 invariante auparavant décrite par l'équipe de Taniguchi (Imai et al., 1986). En effet, c'était ce dernier (Makino et al., 1995) qui a proposé le terme de cellules NKT (Natural Killer T) qui est aujourd'hui couramment utilisé pour définir les lymphocytes T qui portent de marqueurs NK.

Toutefois, trois catégories des lymphocytes NKT existent : les lymphocytes NKT de type I ou « classiques », les lymphocytes NKT de type II et les lymphocytes « NKT-like » (Godfrey et al., 2004). Les lymphocytes NKT de type I sont les cellules qui possèdent la chaîne alpha invariante Vα14-Jα18 et reconnaissent des glycolipides, comme l'α-Galactosylcéramide (α-GalCer), présenté exclusivement par la molécule CD1d et sont ainsi dénommés iNKT (invariant NKT). Les cellules NKT de type II ont été également sélectionnées positivement par CD1d, mais possèdent un TCR plus divers ou variable (vNKT) et ne reconnaissent pas l'α-GalCer. La troisième catégorie, dite « NKT-like », inclus des lymphocytes T NK1.1$^+$ qui ne sont pas sélectionnés par la molécule CD1d et qui présentent un TCR très divers pouvant également contenir des lymphocytes T conventionnels qui expriment des marqueurs de cellules NK après activation. L'identification de lymphocytes NKT de type II ou III est difficile puisque aucun marqueur spécifique n'existe à l'heure actuelle. En revanche, les lymphocytes NKT de type I ou

iNKT sont aisément identifiés par l'aide des tétramères CD1d/α-GalCer (Figure 4) qui ont été construits par les équipes de Kronenberg et Bendelac (Matsuda et al., 2000 ; Benlagha et al., 2000).

Notre étude a été centrée sur les lymphocytes iNKT et leurs principales caractéristiques seront développées au cours des paragraphes suivants.

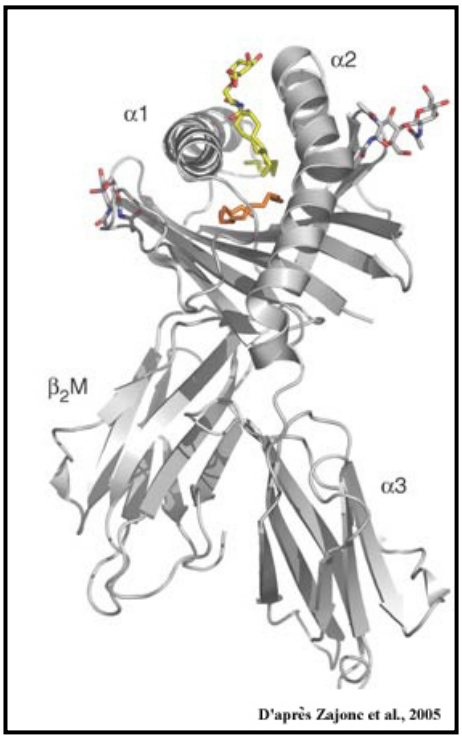
Figure 4 : Tétramère.



II.2. Phénotype.

Les cellules iNKT sont des lymphocytes T qui expriment un TCR semi-invariant : Vα14Jα18 et Vα24Jα18 respectivement chez la souris et chez l'homme. Ce TCR semi-invariant reconnaît des molécules glycolipidiques présentées par la molécule CD1d (Bendelac, 1995). La molécule CD1d est apparentée aux molécules du CMH de classe I, mais ne présente pas de polymorphisme allélique. Cette molécule est composée d'une chaîne légère, la β_2-microglobuline (β_2-m) et d'une chaîne lourde transmembranaire avec trois domaines extracellulaires dont les domaines α_2 et α_3 forment une cavité assez ouverte et riche en résidus hydrophobes de sorte que les molécules CD1d s'associent à des glycolipides, des lipides ou des lipopeptides (Figure 5).

Figure 5 : Molécule CD1d.



Les cellules iNKT expriment les molécules CD5 (Gapin et al., 2001) et CD122 (IL-2/IL-15Rβ) (Hammond et al., 2001). De 60 à 70% des cellules iNKT murines sont $CD4^+$ et le restant DN ($CD4^-CD8^-$) (Bendelac et al., 1994 ; Benlagha et al., 2000 ; Matsuda et al., 2000). Elles expriment de façon constitutive la molécule CD69 (Eberl et al., 1999) et la molécule CD44 (Ballas and Rasmussen, 1990) qui sont respectivement des marqueurs d'activation précoce et tardive. Les cellules iNKT, comme les cellules T conventionnelles mémoires, n'expriment pas la molécule CD62L (Hammond et al., 2001). Ces caractéristiques confèrent aux cellules iNKT un phénotype de lymphocytes T activés et mémoires.

Les lymphocytes iNKT, comme leur nom l'indique, expriment des marqueurs de cellules NK (Natural Killer), tel que le NK1.1. La molécule NK1.1 appelée aussi CD161 appartient à la famille des protéines NKR-P1 (Natural Killer Receptor Protein) qui est une molécule décrite comme étant impliquée dans la reconnaissance des cellules cibles par les cellules NK (Giorda et al., 1990). Un nombre limité de lignées de souris expriment la molécule NK1.1 comme C57BL/6, NZB et CE (Glimcher et al., 1977 ; Koo and Peppard, 1984). Les cellules iNKT expriment d'autres molécules de cellules NK, notamment la famille Ly49, CD94/NKG2A et NKG2D (Gapin et al., 2001 ; Ho et al., 2002).

Les lymphocytes iNKT sont très conservés dans les différentes espèces de mammifères et sont également présents chez l'homme. En effet, l'équipe de Porcelli a montré dans le sang périphérique humain, une population de lymphocytes T $CD4^+$ et DN exprimant la chaîne Vα24-Jα18 du TCR qui est homologue à la chaîne Vα14-Jα18 de la souris et qui s'associe préférentiellement à la chaîne Vβ11 (Porcelli et al., 1993). Ces

cellules reconnaissent également l'α-GalCer présenté par la molécule CD1d. Contrairement aux cellules murines, les cellules humaines Vα24-Jα18 peuvent porter la molécule CD8 à leur surface et elles sont ainsi : $CD4^+$, $CD4^-CD8^-$ ou $CD8^+$ (Takahashi et al., 2002).

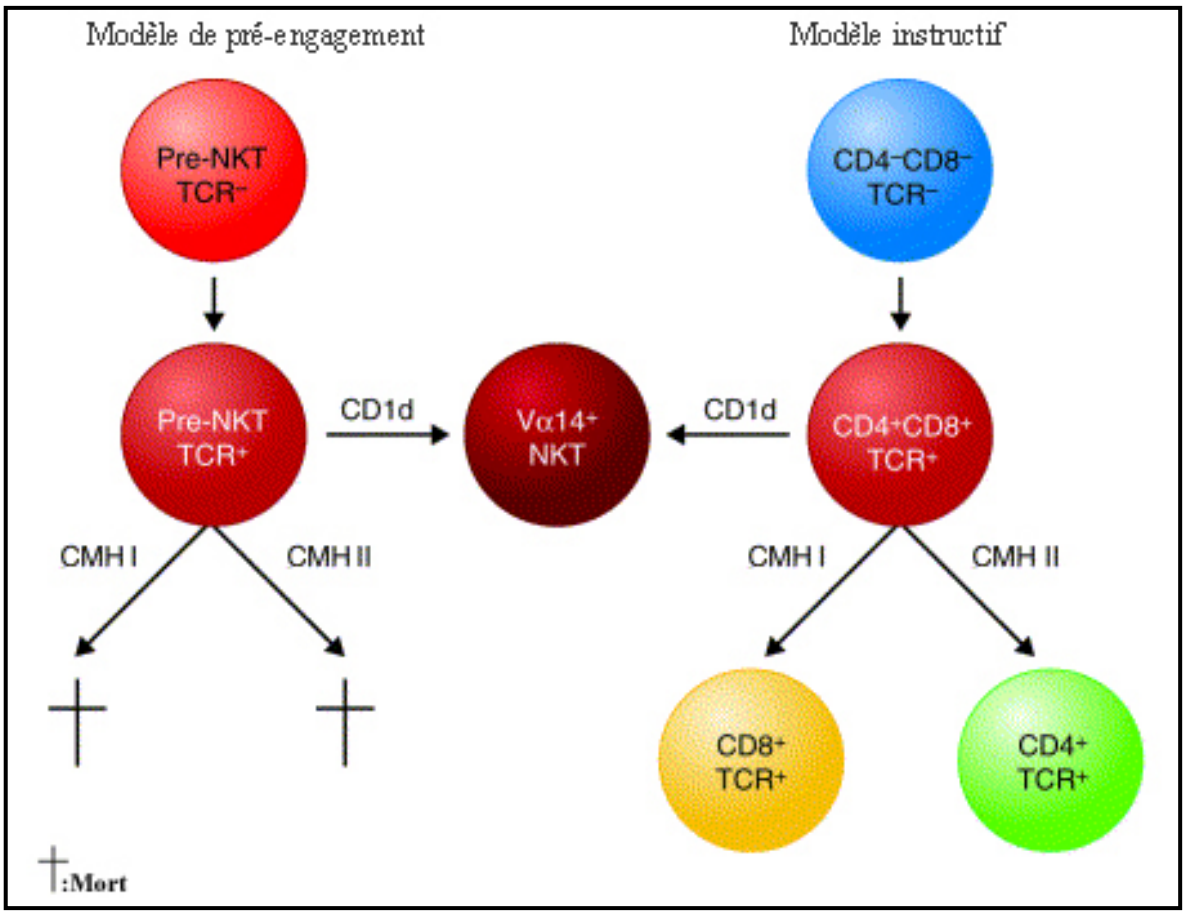
II.3. Origine thymique des cellules iNKT.

L'origine des cellules iNKT a suscité de nombreux débats. Certaines équipes ont suggéré que leur origine était indépendante du thymus alors que d'autres confirmèrent leur origine thymique. Il a fallu attendre les années 2000 et le tétramère CD1d-α-GalCer, pour confirmer que les cellules iNKT se développent dans le thymus. Il a été démontré que des thymocytes $CD4^+CD8^+$ lorsqu'ils sont injectés en intra-thymique chez des souris iNKT déficientes, se développent en cellules iNKT seulement si les molécules CD1d sont présentes (Gapin et al., 2001). De plus, certains précurseurs thymiques impliqués dans les différentes étapes de maturation de cellules iNKT ont été identifiés (Benlagha et al., 2002). En parallèle, des études *in vitro* ont également mis en évidence que des cellules iNKT matures peuvent être générées à partir de cultures de thymus fœtal (Pellicci et al., 2002).

Les cellules T conventionnelles sont sélectionnées positivement par les molécules classiques du CMH exprimées sur les cellules épithéliales corticales thymiques. En revanche, les cellules iNKT sont sélectionnées positivement par les thymocytes $CD4^+CD8^+$ dérivées de la moelle osseuse qui expriment la molécule CD1d (Bendelac, 1995; Coles and Raulet, 2000).

Deux théories existent pour expliquer l'origine des cellules iNKT (Figure 6) : le modèle dit « instructif » (instructive model) et le modèle dit « pré-engagé » (precommitted model). Le modèle instructif suggère l'existence d'un précurseur double positif commun (Gapin et al., 2001) des cellules T conventionnelles et iNKT. Dans ce modèle, le réarrangement du TCR est aléatoire et la reconnaissance de ligands endogènes présentés par la molécule CD1d ira sélectionner le TCR Vα14-Jα18 des lymphocytes iNKT. La théorie de pré-engagement suggéré que des précurseurs déjà engagés à devenir des cellules iNKT existent avant le réarrangement du TCR (Baur et al., 2001). Le débat n'est pas encore clos, mais des travaux récents suggèrent que les voies de développement de cellules iNKT et T conventionnelles divergent après le réarrangement du TCR (Benlagha et al., 2005), favorisent ainsi la théorie d'instruction.

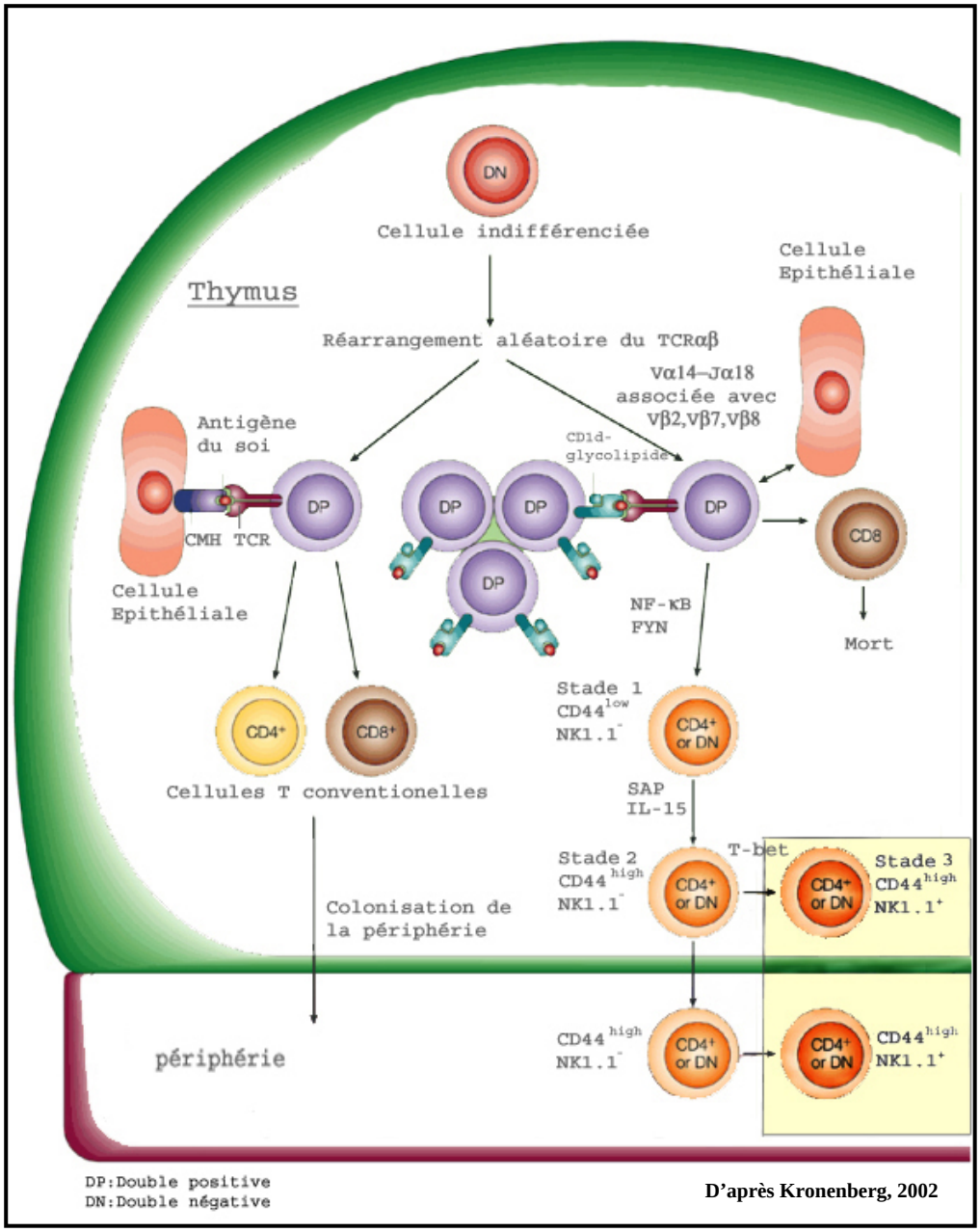
Figure 6 : Origine des cellules iNKT.



II.4. Stades de développement.

Les cellules iNKT se développent dans le thymus à partir de cellules doubles positives et passent par trois stades avant d'acquérir leur phénotype mature (Matsuda and Gapin, 2005). (Figure 7).

Figure 7 : Développement des cellules iNKT.



Dans le thymus, un précurseur DP indifférencié réarrange son TCR pour exprimer la chaîne Vα14-Jα18 associée à Vβ8.2 ou Vβ7 ou Vβ2. Cette cellule sera sélectionnée positivement par les thymocytes DP exprimant la molécule CD1d. L'absence de molécules CD1d chez les souris $CD1d^{-/-}$ bloque le développement des lymphocytes iNKT au stade DP $Vα14\text{-}Jα18^{+}$ (Gapin et al. 2001).

Une étude récente de l'équipe de Bendelac a identifié le précurseur immature HSA^{high} des cellules iNKT dans le thymus et définit les stades de développement de ces cellules qui passent par un phénotype DP avant de devenir $CD4^{+}$ pour ensuite perdre ce marqueur et acquérir le phénotype DN (Benlagha et al., 2005). Ces cellules passent par 3 stades de différentiation. Au stade 1 les cellules iNKT présentent un phénotype $CD44^{low}$ $NK1.1^{-}$. Au stade 2 elles deviennent $CD44^{high}$ sans toute fois exprimer la molécule NK1.1. Ces cellules produisent essentiellement de l'IL-4, et au stade 3, elles acquièrent le phénotype NK1.1 et la capacité à sécréter de l'IFN-γ.

Plusieurs facteurs sont impliqués dans le développement des cellules iNKT à différents stades de leur maturation thymique. Au niveau du stade 1 : l'ablation spécifique de IκK2 (inhibiteur κB (IκB) Kinase 2) induit l'absence totale des cellules iNKT (Shmidt-Supprian et al., 2004). Ces résultats suggèrent la nécessité de la voie de NF-κB très tôt dans le développement des cellules iNKT, probablement pendant la sélection des thymocytes DP qui ont réarrangé leur TCR Vα14-Jα18.

Les souris déficientes pour la Tyrosine Kinase Fyn, présentent une diminution des cellules $Vα14\ NK1.1^{-}$ (Stade 1) (Gadue et al., 2004). L'expression transgénique de la chaîne Vα14-Jα18 du TCR des cellules iNKT, induit la restauration complète du nombre

des cellules iNKT chez les souris déficientes en Fyn. Ces résultats suggèrent que Fyn pourrait jouer un rôle avant le stade 1 du développement des cellules iNKT (Figure 7).

Au niveau du stade 2 : le développement des cellules iNKT est altéré en absence de la protéine adaptatrice SAP (SLAM–associated Protéine (SLAM : Signaling Lymphocytic Activation Molecule)) qui s'attache au domaine cytoplasmique du récepteur de la famille SLAM qui recrute Fyn. Ce processus contribue à la phosphorylation de SLAM et l'activation de signaux phosphotyrosines (Latour and Veillette, 2004). Le pourcentage des cellules iNKT est diminué dans le foie, la rate et le thymus des souris déficientes pour SAP par rapport aux souris sauvages (Pasquier et al., 2005). Cette diminution est similaire chez les souris déficientes en CD1d (Nichols et al., 2005). SAP pourrait être nécessaire au niveau du stade 2 puisque les cellules CD1d Tétramère^{+} des souris SAP$^{-/-}$ sont CD44^{low} NK1.1^{-}, c'est-à-dire, bloquées dans le stade 1. Cette protéine est importante puisque son absence chez l'humain conduit à l'absence des cellules iNKT et à la maladie XLP (X-linked lymphoproliferative disease) (Nichols et al., 2005 ; Pasquier et al., 2005) (Figure 7).

Différentes molécules peuvent affecter le développement des cellules iNKT. De même, des cytokines et leurs récepteurs peuvent interférer dans le développement de ces cellules. Les cellules iNKT sont complètement absentes de la périphérie des souris déficientes de la chaîne $\gamma c^{-/-}$ (la chaîne commune des récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-15 (Leonard et al., 1995) bien que la fréquence des thymocytes matures $V\alpha14^{+}V\beta8^{+}$ est identique à celle des souris sauvages (Lantz et al., 1997). Ces résultats suggèrent l'implication de ces cytokines dans le développement des cellules iNKT. Cependant, seules les souris déficientes pour l'IL-15 ou pour la chaîne β du récepteur de l'IL-15 présentent moins de cellules T NK1.1^{+} dans leur thymus, leur foie et leur rate.

L'administration de l'IL-15 à ces souris rétablie une partie de ces cellules (Kennedy et al., 2000 ; Ohteki et al., 1997). Mastuda et al. montrent que l'IL-15 est requise pour le passage du stade 1 (CD44 ^{low} NK1.1^{-}) au stade 2 (CD44 ^{high} NK1.1^{-}) (Mastuda et al., 2002).

Au niveau du stade 3 : Le pourcentage et le nombre des cellules iNKT chez les souris déficientes en T-bet (un facteur de transcription requis pour la différentiation des cellules Th1) sont largement diminués par rapport aux souris sauvages. Toutes les cellules tétramère CD1d/α-GalCer^{+} sont CD44^{+} NK1.1^{-} Ly-49^{-} CD122^{-} chez ces souris T-bet$^{-/-}$ suggérant un blocage du développement de ces cellules entre le stade 2 et le stade 3 (Townsend et al., 2004) (Figure 7).

L'IL-7 jouerait plutôt un rôle en aval de tous ces facteurs cités précédemment puisque les cellules iNKT sont présentes mais en nombre réduit chez les souris déficientes pour cette cytokine. De plus, elles présentent une anomalie fonctionnelle puisqu'elles sécrètent peu d'IL-4 et d'IFN-γ après stimulation (Vicari et al., 1996 ; Leite-de-Moraes et al., 1997).

Dans le processus de différenciation des cellules iNKT elles subissent des sélections positive et négative. Plusieurs équipes ont essayé de trouver le(s) ligand(s) endogène(s) naturel(s) des lymphocytes iNKT capables d'influencer leur sélection thymique. Tout récemment, il a été mis en évidence que l'isogloboside iGb3 (isoglobotrihexosylcéramide), un produit de dégradation de l'iGb4 (isoglobotetrahexosylcéramide) par l'enzyme β-hexosaminase b (Hexb), serait un ligand naturel des cellules iNKT. Chez les souris déficientes en Hexb, les cellules iNKT sont

absentes (Zhou et al., 2004), suggérant ainsi que l'iGb3 pourrait sélectionner positivement des cellules iNKT quand il est présenté à la surface des molécules CD1d.

Bien que les cellules iNKT requièrent un antigène endogène pour leur sélection positive, plusieurs études montrent que ces cellules peuvent également être sélectionnées négativement dans le thymus. L'absence de cellules iNKT $CD8^+$ chez la souris peut être expliquée par la sélection négative, puisque la molécule CD8 pourrait augmenter l'affinité des cellules iNKT pour leur ligand ce qui induirait leur sélection négative (Bendelac et al. 1994 ; Lantz and Bendelac, 1994).

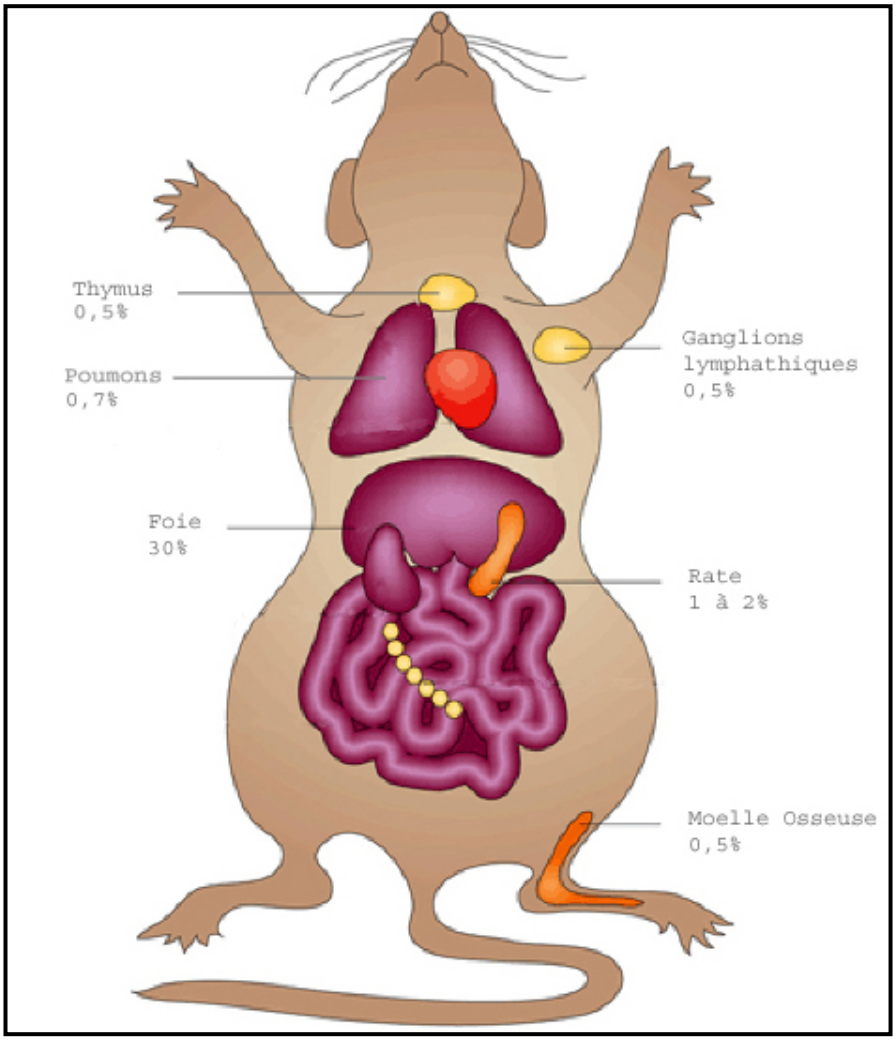
L'addition d'α-GalCer à des cultures de thymus fœtal induit la sélection négative des cellules iNKT (Chun et al., 2003 ; Pellicci et al., 2003) et l'augmentation de l'expression de la molécule CD1d chez les souris transgéniques induit la diminution du nombre des cellules iNKT (Chun et al., 2003). L'exposition chronique à l'α-GalCer chez des souris jeunes conduit aussi à la délétion des cellules iNKT (Hayakawa et al., 2004). Ces résultats suggèrent que durant leur développement, les cellules iNKT sont négativement sélectionnées si elles présentent une grande affinité à l'antigène.

II.5. Distribution tissulaire et homéostasie.

Les cellules iNKT matures sont des cellules $CD4^+$ ou DN, $CD44^{high}$, $NK1.1^+$, $CD69^+$ et $CD62L^-$. Elles quittent le thymus et migrent vers les organes lymphoïdes périphériques. Les cellules iNKT ne sont détectées chez la souris qu'une semaine après sa naissance. Leur nombre dans les organes augmente peu à peu et atteint le taux optimal vers 6 semaines d'âges (Gapin et al., 2001 ; Pellicci et al., 2002).

Les cellules iNKT sont plutôt minoritaires dans la majorité des organes. Elles représentent de 0,5 à 1 % des thymocytes (Matsuda et al., 2000), de 1 à 2 % dans la rate (Matsuda et al., 2000) et les poumons (données du laboratoire), moins que 0,5 % dans les ganglions lymphatiques et dans la moelle osseuse (Matsuda et al., 2000). Cependant, elles sont majoritaires dans le foie où les cellules iNKT représente 30 % des lymphocytes T (Matsuda et al., 2000) (Figure 8).

Figure 8 : Distribution tissulaire des cellules iNKT.



Les travaux de Ranson et al. montrent que les cellules iNKT ont un potentiel d'homéostasie. Des souris $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$ (déficientes en cellules T, B et NK) sont injectées par des cellules de ganglions lymphatiques en provenance de souris transgéniques pour le récepteur Vα14. Un jour après le transfert, les cellules injectées sont retrouvées dans la rate et dans le foie. Le nombre absolu des cellules iNKT augmente après 5 jours du transfert arrivant à 31 fois plus dans la rate et 20 fois plus dans le foie (Ranson et al., 2003). Les cellules iNKT ne nécessitent pas de la molécule CD1d pour leur survie en périphérie. En effet, des cellules iNKT en provenance de souris transgénique pour le récepteur Vα14 prolifèrent même quand elles sont transférées à des souris $Rag^{-/-}$ $\gamma c^{-/-}$ $I^{-/-}II^{-/-}$ (Ranson et al., 2003), ou à des souris $CD1d^{-/-}$ (Matsuda et al., 2002). Ainsi, l'interaction TCR-CD1d n'est pas importante pour leur maintien homéostatique (Matsuda et al., 2002).

Une étude récente vient confirmer que la molécule CD1d est dispensable à l'homéostasie de lymphocytes iNKT. En effet, les souris mutantes qui expriment la molécule CD1d exclusivement au niveau des thymocytes et des lymphocytes T, possèdent de lymphocytes iNKT dans les différents organes bien que leur nombre et leur fonction soit altéré au niveau du foie puisque les proportions de cellules $CD4^+$ et DN sont différentes de celles des souris sauvages, et ces cellules présentent une diminution de sécrétion de cytokines suite à leur stimulation par l'α-GalCer (Zimmer et al., 2006). Mais, ces cellules y sont présentes.

Il a été démontré que les cytokines IL-7 et IL-15 sont importantes pour l'homéostasie des cellules iNKT. Les souris déficientes en IL-15 présentent un nombre diminué de cellules iNKT dans le thymus et le foie (Matsuda et al., 2002). Cette cytokine est importante pour la survie et la prolifération des lymphocytes iNKT dans la périphérie.

Lorsque des cellules iNKT sont transférées vers des souris $Rag^{-/-}IL\text{-}15^{-/-}$et $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$, une diminution du nombre de ces cellules est retrouvé dans le foie et la rate des souris $Rag^{-/-}IL\text{-}15^{-/-}$ comparé aux souris $Rag^{-/-}\gamma c^{-/-}$, et ces cellules ne se divisent pas (Ranson et al., 2003). Les souris doubles déficientes en IL-15 et IL-7 ne présentent pas de cellules iNKT ni dans le thymus, ni dans le foie ni dans la rate (Matsuda et al., 2002). Chez les souris $IL\text{-}15^{-/-}$/IL-7 transgéniques, le nombre de cellules iNKT est légèrement augmenté dans le foie et la rate montrant que l'IL-7 peut compenser partiellement le manque d'IL-15. L'injection d'IL-7 chez les souris C57BL/6 et NOD induit une nette expansion des cellules iNKT dans la périphérie de ces deux souches (Sharif et al., 2001).

II.6. Propriétés fonctionnelles des cellules iNKT.

Les lymphocytes iNKT exercent leurs fonctions immunorégulatices essentiellement via leur production de cytokines. Les cellules iNKT peuvent être activées par divers facteurs notamment des ligands naturels ou synthétiques.

II.6.1. Les ligands.

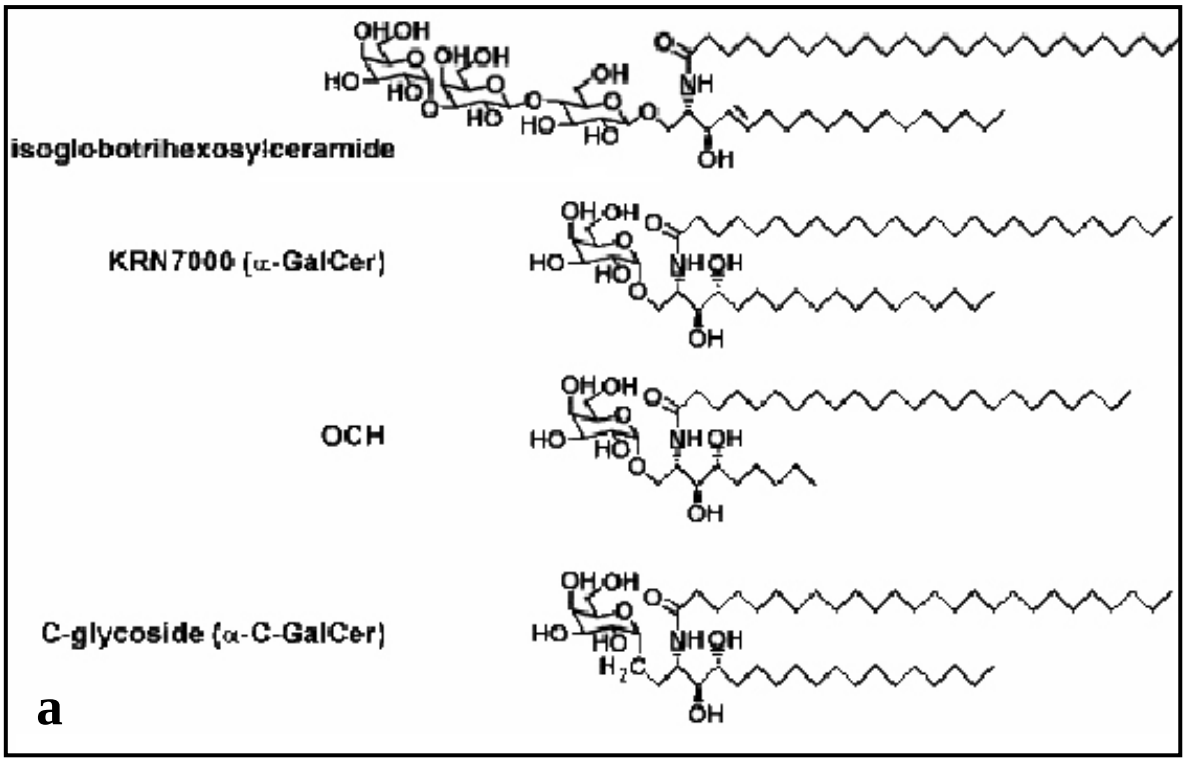
L'α-galactosylcéramide (α-GalCer) est le ligand le plus couramment utilisé pour étudier les cellules iNKT. L'α-GalCer est un glycosphingolipide extrait des éponges marines et identifié lors d'un criblage de composés capables de prévenir des métastases de tumeurs du foie chez la souris (Morita et al., 1995). Ce ligand, présenté par les molécules CD1d, active spécifiquement les cellules iNKT, induisant la production de différentes cytokines, notamment d'IL-4 et d'IFN-γ (Figure 9a).

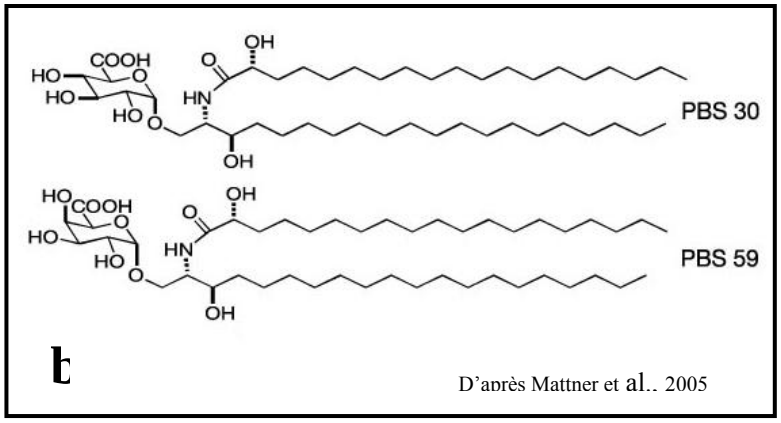
Plusieurs analogues de l'α-GalCer ont été synthétisés, comme l'OCH qui diffère de l'α-GalCer par la longueur de sa chaîne sphingosine. Il induit préférentiellement la sécrétion d'IL-4 par les cellules iNKT (Miyamoto et al., 2001). À l'inverse, un autre ligand synthétique, l'α-C-GalCer, qui diffère de l'α-GalCer uniquement au niveau d'un groupement glycosidique "O" remplacé par un groupement CH_2, induit une production plus tardive et plus importante d'IFN-γ (Schmieg et al., 2003) (Figure 9a).

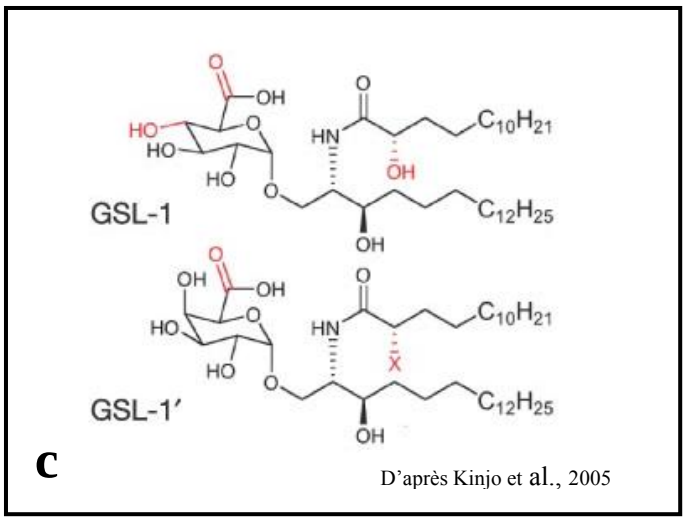
La recherche de ligands naturels endogènes ou exogènes des cellules iNKT a été longue et difficile. C'est seulement en 2004 que le groupe de Bendelac a trouvé un ligand naturel endogène capable de stimuler les cellules iNKT : l'iGb3 (isoglobotrihexosylcéramide) (Zhou et al., 2004). Ce ligand, à l'inverse de l'α-GalCer, est présent naturellement et de façon ubiquitaire chez les mammifères et active spécifiquement les cellules iNKT quand il est présenté par la molécule CD1d (Zhou et al., 2004) (Figure 9a).

La découverte de ligands naturels exogènes a suivi rapidement. En effet, récemment, il a été démontré que des composés glycolipidiques de la paroi de *Sphingomonas* sont capables d'activer les cellules iNKT et d'induire leur sécrétion de cytokines. Ces glycolipides sont : le PBS30 (α-glucuronosylcéramide), le PBS59 (α-galacturonosylcéramide) (Figure 9b), le GSL-1 (glycosphingolipide contenant un acide glycuronique en position alpha) et le GSL-1' (glycosphingolipide contenant un acide galacturonique en position alpha) (Figure 9c) (Mattner et al., 2005 ; Kinjo et al., 2005).

Figure 9 : Ligands des cellules iNKT.



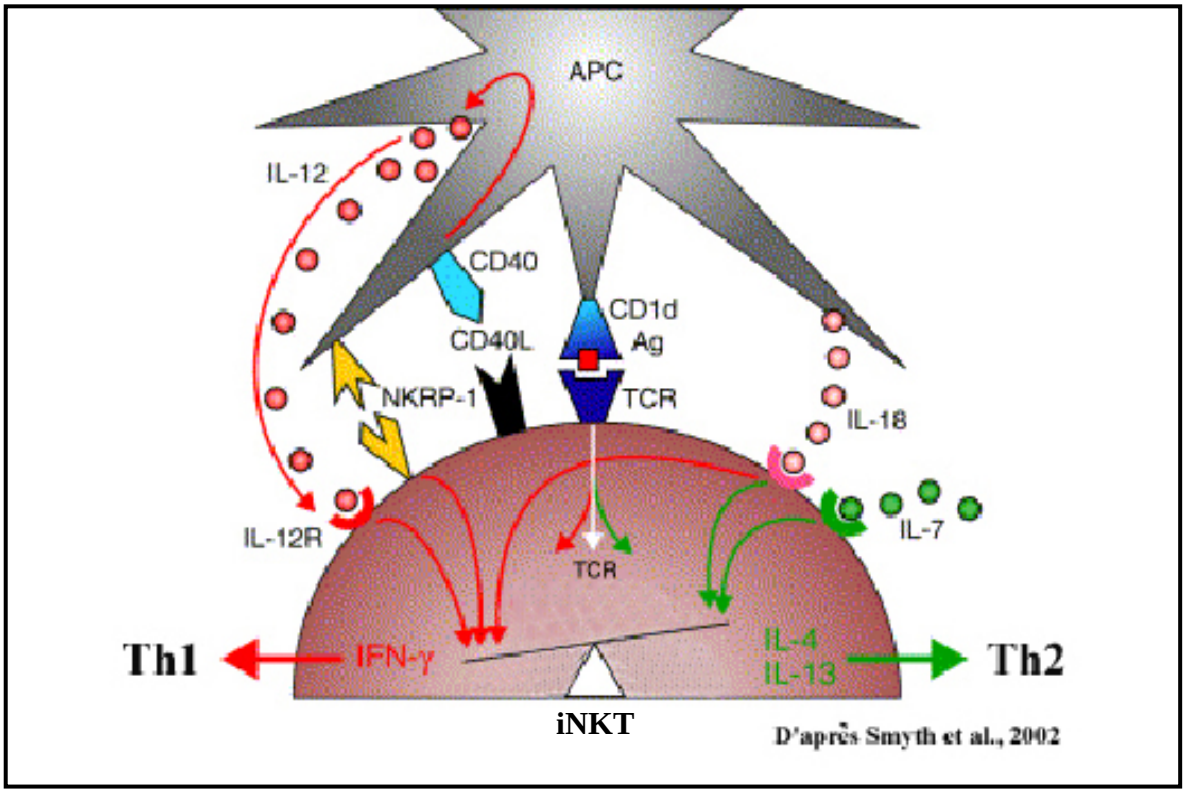




II.6.2. Plasticité fonctionnelle.

Plusieurs facteurs peuvent influencer le profil de cytokines produites par les cellules iNKT (Figure 10). Outre les ligands synthétiques (comme l'OCH ou l'α-C-GalCer), d'autres facteurs, notamment les cytokines ou les hormones présentes dans leur microenvironnement, peuvent également diriger la production de cytokines des cellules iNKT vers un profil Th1 ou Th2. Par exemple, l'IL-7 favorise la sécrétion d'IL-4 par les cellules iNKT spléniques et thymiques (Gombert et al., 1996 ; Vicari et al., 1996). Dans le laboratoire, il a été démontré que l'IL-18 associée à l'α-GalCer augmentait la production d'IL-4 par les cellules iNKT qui peuvent ainsi amplifier une réponse Th2 en activant les lymphocytes B (Leite-de-Moraes et al., 2001). Cependant, l'effet de l'IL-18 est assez complexe puisque, associée à l'IL-12, cette cytokine induit la production d'IFN-γ par les cellules iNKT, et ceci en absence d'une stimulation par le TCR (Leite-de-Moraes et al., 1999).

Figure 10 : Profil cytokinique des cellules iNKT.



Les bactéries gram-négatives, LPS positives, possèdent un moyen indirect d'activer les lymphocytes iNKT : elles induisent la production d'IL-12 par les CPA infectées. L'IL-12 ira à son tour induire ou amplifier la sécrétion d'IFN-γ par les cellules iNKT (Leite-de-Moraes et al., 1998 ; Brigl et al., 2003).

D'autres facteurs endogènes non-immunologiques, comme l'oestradiol, peuvent aussi influencer la production de cytokines par les lymphocytes iNKT. Chez les souris femelles, l'injection d'α-GalCer induit une concentration d'IFN-γ plus élevée que chez les souris mâles. Cette différence est liée à l'oestradiol, puisque les souris ovariectomisées en

produisent moins, et le traitement par l'oestradiol rétablit la production d'IFN-γ par les cellules iNKT activées. De plus, les souris femelles dépourvues de récepteurs pour l'oestradiol, produisent autant d'IFN-γ en réponse à l'α-GalCer, que les souris mâles (Gourdy et al., 2004).

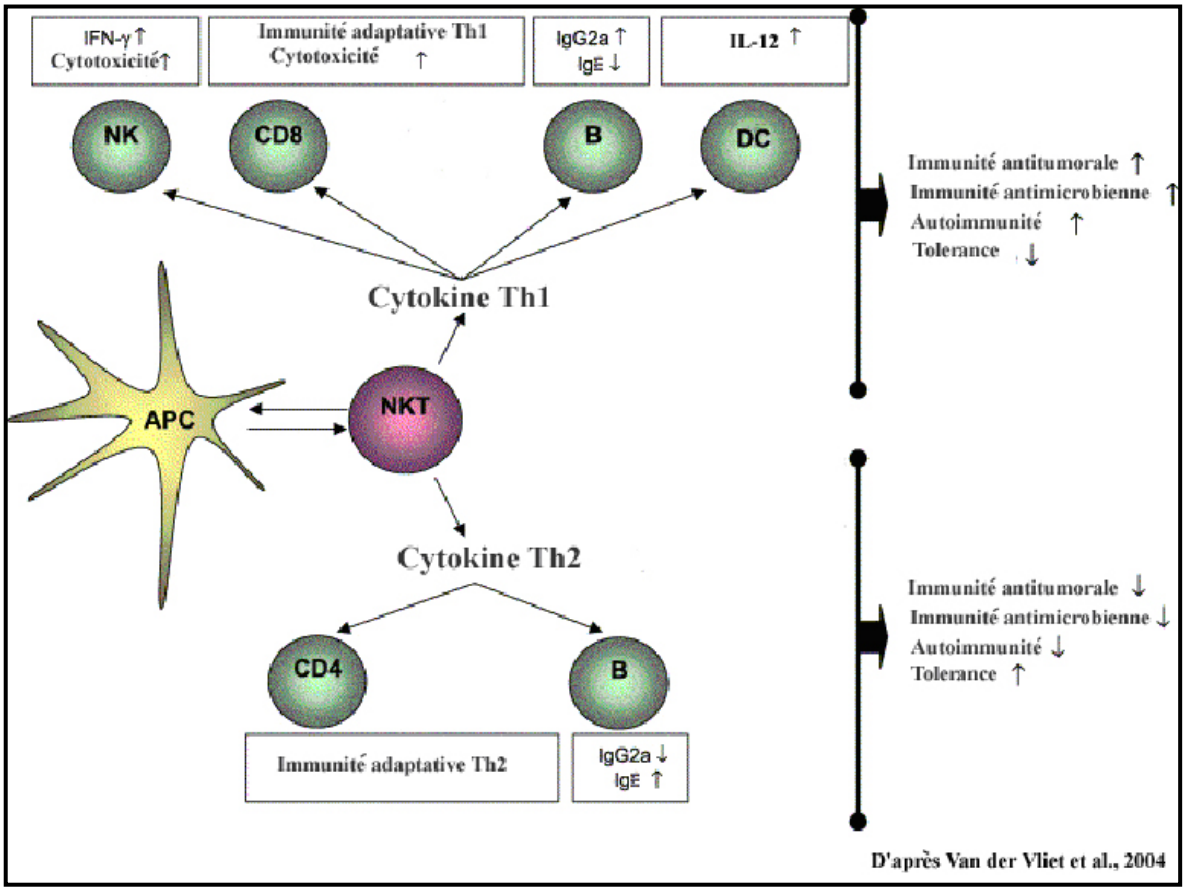
Les lymphocytes iNKT possèdent également des propriétés cytotoxiques. L'injection d'α-GalCer induit une réponse cytotoxique puissante, dépendante des lymphocytes iNKT, contre les cellules tumorales du foie et de la rate (Kawano et al, 1998; Smyth et al, 2002). De nombreuses données suggèrent que les cellules NK sont les cellules effectrices essentielles de cette cytotoxicité. Cependant, nous avons démontré que les lymphocytes iNKT ont une activité cytotoxique dépendante des interactions Fas / FasL, quelques minutes après leur activation *in vivo* par l'α-GalCer (Lisbonne et al., 2004). Les cellules NK deviennent ensuite les principales cellules effectrices de la réponse cytotoxique déclanchée par l'injection d'α-GalCer, par un mécanisme plutôt dépendant de la voie perforine / granzyme.

II.7. Interaction avec différentes cellules.

Les cellules iNKT activées ont la particularité de stimuler des cellules de l'immunité innée et adaptative via leur production des cytokines (Figure 11). Parmi les premières études montrant l'action de lymphocytes iNKT sur les cellules avoisinantes, nous pouvons citer celles soulignant leur capacité à induire, après activation par l'α-GalCer, la production d'IFN-γ et la cytotoxicité de cellules NK (Carnaud et al., 1999 ; Eberl and MacDonald., 2000 ; Lisbonne et al., 2004).

Un autre exemple d'interaction des lymphocytes iNKT avec les cellules impliquées dans la réponse innée est leur capacité à mobiliser les progéniteurs myéloïdes et les neutrophiles de la moelle osseuse murine vers les organes périphériques. Cette mobilisation est due à la production d'IL-3 et de GM-CSF par les cellules iNKT en réponse à l'α-GalCer (Leite-de-Moraes et al., 2002). Une étude récente *in vitro* vient étayer ces donnés puisqu'elle montre que les cellules iNKT humaines, via leur sécrétion de GM-CSF, augmentent le nombre de colonies hématopoïétiques (Kotsianidis et al., 2006).

Figure 11 : Interaction cellules iNKT et différentes cellules.



Les cellules iNKT activées par l'α-GalCer affectent également la maturation et la différentiation des cellules dendritiques (Hermans et al., 2003). En effet, les cellules dendritiques lorsqu'elles présentent aux lymphocytes iNKT des ligands, comme l'α-GalCer ou des ligands naturels, les activent, mais à leur tour les cellules dendritiques sont également stimulées pour produire des cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-10 (Kitamura et al., 1999 ; Kojo et al., 2005). Une autre démonstration de l'activation de cellules dendritiques est l'augmentation de l'expression des molécules CD40, CD80 et CD86 à leur surface (Fujii et al., 2004). Ces interactions pourraient être déterminantes pour le développement de la réponse immune adaptative.

Les principaux acteurs de la réponse immune adaptative, lymphocytes B et T, sont aussi influencés indirectement ou directement par les cellules iNKT. Récemment il a été démontré que les cellules iNKT activent une population particulière de lymphocytes B, les cellules B-1. Ces lymphocytes B, qui possèdent un BCR (B cell receptor), portent un marqueur de cellules T, le CD5. Il a été montré, dans un modèle de sensibilité de contact, où les souris sont immunisées au niveau de la peau et restimulées quelques jours plus tard par le même antigène au niveau des oreilles, que la production d'IL-4 par les cellules iNKT était indispensable à l'activation des lymphocytes B-1. Ces lymphocytes ainsi activés secrètent des immunoglobulines de type IgM qui déclancheront une cascade d'événements aboutissant à l'hypersensibilité de contact (Campos et al., 2003, 2006). Les cellules iNKT peuvent également activer les lymphocytes B et T conventionnels, via leur production de cytokines (Eberl et al., 2000 ; Leite-de-Moraes et al., 2001).

L'action des cellules iNKT sur les lymphocytes immuno-régulateurs de type $CD4^+CD25^+$ consisterait plutôt à augmenter leur prolifération via la sécrétion d'IL-2 par

cellules iNKT activées (Jiang et al., 2005 ; Liu et al., 2005). Cependant, à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas exclure que les cellules iNKT agissent également sur d'autres types de lymphocytes T immuno-régulateurs et que, dans certains cas, les cellules iNKT puissent avoir un effet plutôt négatif sur ces cellules.

II.8. Cellules iNKT et pathologies.

Sachant que les cellules iNKT sont au carrefour entre immunité innée et adaptative et qu'elles peuvent produire rapidement et massivement toute une panoplie de cytokines immuno-régulatrices, il n'est pas étonnant qu'elles soient impliquées dans différentes réponses immunitaires dirigées contre diverses pathologies. Quelques exemples seront donnés au cours des paragraphes suivants.

II.8.1. Tumeurs

Il existe très peu de données concernant le rôle naturel des cellules iNKT dans la réponse anti-tumorale. Toutefois, il a été démontré dans un modèle de tumeurs spontanées induites par le méthylcholanthrène (MCA), que les souris Jα18$^{-/-}$ déficientes en cellules iNKT développent des tumeurs plus rapidement et plus fréquemment que les souris sauvages (Smyth et al., 2000). Cette protection naturelle des cellules iNKT est liée à leur production d'IFN-γ, qui a la capacité d'activer d'autres cellules, comme les cellules NK et les cellules T CD8^{+} anti-tumeur (Smyth et al. 2001; Crowe et al., 2002).

Ces travaux ont également mis en évidence chez la souris l'existence de sous-populations de cellules iNKT douées de propriétés fonctionnelles différentes. En effet, l'équipe de Smyth a démontré que les cellules iNKT du foie, mais pas celles de la rate, étaient responsables de cette protection. De plus, la population de cellules iNKT DN était plus efficace que les cellules iNKT $CD4^+$ dans cette protection (Crowe et al., 2005).

Dans ce modèle, il était possible que l'activation de cellules iNKT ait été provoquée par un ou plusieurs antigène(s) endogène(s) glycolipidique(s) dérivés de la tumeur. En faveur de cette hypothèse, des travaux plus récents montrent que le GD3, ganglioside exprimé sur des mélanomes humains, active les cellules iNKT lorsqu'il est présenté par la molécule CD1d (Wu et al., 2003).

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont démontré que le traitement par l'α-GalCer était aussi très efficace pour réduire la masse tumorale ainsi que les métastases. En effet, l'α-GalCer, découvert comme agent anti-tumoral (Morita et al., 1995), joue un rôle protecteur dans différents modèles de métastases expérimentales du foie, des poumons et des ganglions lymphatiques (Kawano et al., 1998 ; Van der Vliet et al., 2004). Le mécanisme d'induction de la réponse anti-tumorale est dépendant de l'IFN-γ (Smyth et al., 2002). Il a été également démontré que l'α-GalCer est plus efficace lorsqu'il est administré conjugué aux cellules dendritiques (Toura et al., 1999). Il est intéressant de souligner que des essais cliniques sont en cours pour tester l'efficacité du traitement par l'α-GalCer chez les patients atteint de tumeurs (Giaccone et al., 2002 ; Chang et al., 2005).

II.8.2. Infections

Au cours des infections, l'utilisation de souris déficientes en lymphocytes iNKT, ainsi que l'emploi de l'α-GalCer ont permis de suggérer que ces cellules jouaient un rôle plutôt protecteur dans la défense de l'organisme. Ainsi, l'implication des cellules iNKT dans la réponse anti-infectieuse a été mise en évidence dans les modèles d'infection virale, parasitaire et bactérienne. Par exemple, il a été démontré que le traitement par l'α-GalCer inhibe la réplication du virus de l'hépatite B dans un modèle de souris transgénique (Kakimi et al., 2000), et protège les souris des infections par *Pseudomonas aeruginosa* (Nieuwenhwis et al., 2002), *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium berghei* (Gonzalez-Aseguinolaza et al., 2000), par un mécanisme dépendant de l'IFN-γ.

Chez les souris déficientes en cellules iNKT, la réponse anti-virale vis-à-vis de l'infection par le virus de l'encéphalomyocarditis et de l'herpès de type 1 est diminuée (Exley et al., 2001 ; Grubor-Bauk et al., 2003) tandis que le nombre de bactéries et la destruction tissulaire observée après infection par *Mycobacterium tuberculosis* (Apostolou et al., 1999) ainsi que la mortalité après infection par *Sphingomonas* (Mattner et al., 2005) sont augmentés chez ces animaux comparés aux contrôles sauvages.

Les cellules iNKT sont rapidement activées après une infection par *Listeria monocytogenes*, produisent de l'IFN-γ, et participent ainsi à la protection contre l'infection (Ranson et al., 2005). Il est intéressant de souligner que dans certains cas, la production d'IFN-γ par les cellules iNKT peut s'avèrer préjudiciable pour l'hôte. En effet, les souris $J\alpha18^{-/-}$ seraient plus résistantes à l'infection par *Toxoplasma gondii* que les souris

sauvages, puisque chez ces dernières, les cellules iNKT produisent des taux élevés d'IFN-γ qui sont létaux pour la souris (Ronet et al., 2005).

Une étude récente a mis en évidence l'influence de cellules iNKT dans l'infection par un helminthe, le *Schistosoma mansoni*. La schistosomiase est une maladie chronique causée par ce parasite dont la caractéristique principale est une forte réponse Th2 déclenchée par les œufs déposés préférentiellement dans le foie de l'hôte définitif. Les cellules iNKT hépatiques sont activées durant l'infection et produisent de l'IFN-γ et de l'IL-4. Cette activation dépend des cellules dendritiques, des molécules CD1d et vraisemblablement des ligands endogènes (Faveeuw et al., 2002; Mallevaey et al., 2006).

II.8.3. Maladies autoimmunes

Au cours de ces dernières années, plusieurs stratégies s'appuyant sur le modèle du diabète spontané de la souris NOD (pour «non-obese diabetic») ont été employées pour analyser l'implication des cellules NKT dans le développement de cette maladie auto-immune. Tout d'abord il a été démontré que ces animaux présentent une anomalie numérique et fonctionnelle des cellules iNKT (Gombert et al., 1996 ; Baxter et al., 1997).

L'anomalie numérique des cellules iNKT apparaît à l'âge de 3 à 5 semaines chez les souris NOD et précède le développement du diabète chez ces animaux. La déplétion en cellules iNKT ou la délétion du locus CD1d chez les souris NOD conduit à l'accélération de la maladie (Wang et al., 2001 ; Shi et al., 2001). Les souris NOD CD1d$^{-/-}$ présentent non seulement une accélération de la maladie mais également une augmentation de l'incidence du diabète. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur naturel des cellules iNKT

dans le développement de cette pathologie. Cependant, différents gènes sont impliqués dans la susceptibilité de la souris NOD au diabète et certains d'entre eux peuvent se localiser à proximité de la région codant pour la molécule CD1d. Afin de mieux définir le rôle naturel des cellules iNKT dans le développement du diabète auto-immun, il serait opportun de connaître le devenir des souris NOD Jα18$^{-/-}$, qui sont en cours de production dans le laboratoire (A. Herbelin, communication personnelle).

Toutefois, il est clair que le diabète peut-être contrôlé chez les souris NOD en agissant sur les cellules iNKT. En effet, les souris NOD transgéniques pour le TCR Vα14-Jα18 développent moins de diabète que les souris NOD sauvages (Laloux et al., 2001) et le traitement par l'α-GalCer inhibe le développement de la maladie (Hong et al., 2001; Sharif et al., 2001). Cet effet protecteur de l'α-GalCer est associé chez les souris NOD à une polarisation de la réponse immune vers le type Th2 comme le montrent les quantités élevées d'IL-4 et d'IL-10 trouvées dans la rate et le pancréas ainsi que l'augmentation des récepteurs de l'IL-10 présents sur les splénocytes des souris malades (Hong et al., 2001; Sharif et al., 2001).

Les cellules iNKT jouent également un rôle dans le développement de l'EAE (encéphalomyélite autoimmune expérimentale). Cette maladie autoimmune est caractérisée par une réponse de type Th1 impliquée dans l'inflammation et la démyélinisation des cellules du système nerveux. En effet, les souris SJL qui développent l'EAE ont un nombre réduit de cellules iNKT CD4^{+} produisant l'IL-4 (Yoshimoto et al., 1995). De plus, chez les souris NOD et C57BL/6 transgéniques pour les cellules iNKT, le développement de l'EAE est inhibé par les cellules iNKT (Mars et al., 2002).

L'administration d'α-GalCer dans les modèles d'EAE a confirmé la capacité des lymphocytes iNKT activés à moduler la maladie. Il est intéressant de souligner que dans ce modèle, l'effet de l'α-GalCer peut être aggravant ou protecteur (Singh et al, 2001 ; Furlan et al, 2003 ; Pal et al, 2001). L'activation des lymphocytes iNKT par l'α-GalCer, chez des souris transgéniques pour un TCR spécifique de la myéline, prévient l'EAE d'une manière dépendante de l'IL-4, de l'IL-10 et de CD1d, quand l'α-GalCer est injecté avant la stimulation des cellules T spécifiques de la myéline (Singh et al., 2001). Cependant, quand l'activation de cellules iNKT est effectuée simultanément à celle des cellules T réactives à la myéline, l'α-GalCer augmente la sévérité de l'EAE, en raison d'une réponse Th1 excessive (Jahng et al., 2001). Ceci suggère que la chronologie de l'activation des lymphocytes iNKT par rapport à celle des cellules T autoréactives est importante dans le développement de la maladie.

OBJECTIFS

Comme nous l'avons décrit au cours de l'introduction, l'asthme allergique est une maladie complexe où les réponses immunes innées et adaptatives sont en interaction constante. Les lymphocytes iNKT sont reconnus comme étant dans la frontière entre ces deux réponses. En effet, ils sont impliqués dans différentes maladies dont les réponses immunitaires mise en jeu sont relativement diverses.

Lorsque ce travail a commencé, il avait été montré que les lymphocytes iNKT activés pouvaient être des cellules effectrices et également agir sur les cellules de l'immunité innée. Ces observations ainsi que leur rôle pro-Th2 dans certaines situations pathologiques nous ont conduit à rechercher si les lymphocytes iNKT sont impliqués dans la réponse inflammatoire tissulaire de type Th2 qui est induite au sein des poumons au cours de l'asthme allergique expérimental. Pour cela, nous avons utilisé un protocole classique d'immunisation systémique par l'antigène ovalbumine (OVA) suivi par le challenge via les voies aériennes par ce même antigène (**Article 1**). À la suite de ce travail montrant que les lymphocytes iNKT augmentent la sévérité de la réaction asthmatique, nous nous sommes demandés si nous pourrions empêcher la sévérité de cette maladie en agissant spécifiquement sur les lymphocytes iNKT Pour tester cette hypothèse nous avons traité des souris avec l'α-GalCer à divers moments du protocole expérimental et par diverses voies d'administration. Nous avons ainsi mis en évidence un nouvel agent thérapeutique, l'α-GalCer, puisqu'il est capable d'inhiber les divers symptômes de l'asthme allergique chez les souris qui ont été précédemment sensibilisées à l'antigène (**Article 2 et résultats non publiés**).

RESULTATS

Les lymphocytes NKT iVα14 sont nécessaires à l'hyperréactivité et à l'inflammation des voies aériennes induites par un allergène dans le modèle d'asthme expérimental. (Article I)

Dans cette étude, nous montrons que les cellules iNKT sont requises pour le développement de l'asthme allergique dans un modèle où les souris sont immunisées par voie systémique puis aérienne (« challenge ») par l'Ovalbumine (OVA). En effet, les souris déficientes en cellules iNKT ($J\alpha18^{-/-}$) développent une HRB (hyperréactivité bronchopulmonaire) diminuée après inhalation de la métacholine et présentent un nombre réduit de cellules, notamment d'éosinophiles, dans le LLBA (liquide de lavage broncho-alvéolaire) comparées aux souris sauvages. Les taux de cytokines de type Th2, comme l'IL-4 et l'IL-5, sont significativement réduits dans le LLBA, chez les souris $J\alpha18^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles. De même, la production d'IgE et d'IL-5 sérique est nettement diminuée chez ces souris $J\alpha18^{-/-}$ comparées aux souris sauvages, qui produisent huit fois plus d'IgE spécifiques d'OVA.

Pour confirmer l'implication des cellules iNKT dans la sévérité de l'inflammation asthmatique, les souris $J\alpha18^{-/-}$ immunisées par l'OVA ont reçu, 1h avant le premier challenge, des cellules spléniques enrichies en lymphocytes iNKT. Ce transfert adoptif reconstitue l'HRB, l'éosinophilie, la production d'IL-4 et d'IL-5 ainsi que des IgE spécifiques d'OVA chez les souris $J\alpha18^{-/-}$. Les résultats obtenus nous ont conduits à vérifier si les cellules iNKT étaient activées après challenge par l'OVA. Cela était bien le

cas puisque l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 est augmentée à la surface des cellules iNKT spléniques chez les souris asthmatiques comparées aux souris contrôles.

L'activation des cellules iNKT peut être indépendante de la molécule CD1d et induite par les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IL-18. Nous avons administré un anticorps anti-CD1d aux souris sauvages pour vérifier le mode d'activation de ces cellules. En effet, les cellules iNKT induisent l'inflammation de type Th2 par des mécanismes mettant en jeu la molécule CD1d puisque le blocage de cette molécule diminue l'inflammation asthmatique en inhibant le recrutement des éosinophiles vers les poumons ainsi que la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IgE chez les souris traitées.

En conclusion, nous avons démontré que les cellules iNKT sont nécessaires à l'inflammation pulmonaire et l'HRB dans un modèle d'asthme allergique induit par l'OVA. Elles peuvent amplifier la réponse inflammatoire de type Th2, suggérant que le blocage ou la déplétion des cellules iNKT pourrait constituer un traitement potentiel de cette maladie.

THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY

CUTTING EDGE

Cutting Edge: Invariant Vα14 NKT Cells Are Required for Allergen-Induced Airway Inflammation and Hyperreactivity in an Experimental Asthma Model[1]

Mariette Lisbonne, Séverine Diem,* Alexandre de Castro Keller,†‡ Jean Lefort,† Luiza M. Araujo,*§ Patricia Hachem,* Jean-Marie Fourneau,§ Stéphane Sidobre,¶ Mitchell Kronenberg,¶ Masuru Taniguchi,‖ Peter Van Endert,§ Michel Dy,* Philip Askenase,# Momtchilo Russo,‡ B. Boris Vargaftig,2† André Herbelin,* and Maria C. Leite-de-Moraes3**

Airway hyperreactivity (AHR), eosinophilic inflammation with a Th2-type cytokine profile, and specific Th2-mediated IgE production characterize allergic asthma. In this paper, we show that OVA-immunized Jα18$^{-/-}$ mice, which are exclusively deficient in the invariant Vα14^{+} (iVα14), CD1d-restricted NKT cells, exhibit impaired AHR and airway eosinophilia, decreased IL-4 and IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid, and reduced OVA-specific IgE compared with wild-type (WT) littermates. Adoptive transfer of WT iVα14 NKT cells fully reconstitutes the capacity of Jα18$^{-/-}$ mice to develop allergic asthma. Also, specific tetramer staining shows that OVA-immunized WT mice have activated (CD69^{+}) iVα14 NKT cells. Importantly, anti-CD1d mAb treatment blocked the ability of iVα14 T cells to amplify eosinophil recruitment to airways, and both Th2 cytokine and IgE production following OVA challenge. In conclusion, these findings clearly demonstrate that iVα14 NKT cells are required to participate in allergen-induced Th2 airway inflammation through a CD1d-dependent mechanism. The Journal of Immunology,* 2003, 171: 1637–1641.

Allergic asthma is a chronic inflammatory disease which is increasing throughout the Western world. This airway inflammation is associated with a predominant Th2 response generating eosinophilia, increased mucus production in the lung, airway hyperresponsiveness, and specific IgE Ab synthesis (1, 2). The production of Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-5, is considered pivotal for the recruitment of eosinophils to the airways and for airway hyperreactivity (AHR),[4] which are characteristic of asthma. Adoptive transfer of effector Th2 cells into naive mice followed by exposure to inhaled Ags triggers eosinophilic inflammation, mucus hypersecretion, and airway hyperresponsiveness, definitively demonstrating the capacity of immune Th2 cells to induce the asthma phenotype (3). It is generally known that rapid generation of IL-4 supports the crucial Ag-specific Th2 cell differentiation. The exact source of this required IL-4 is not known, but besides Th2 cells themselves, cells like mast cells, basophils, γ/δ T cells, and NKT lymphocytes are thought to be contributors to Th2 immune responses.

NKT cells are a distinct subset of lymphocytes with NK markers and αβ TCR, that regulate immune responses in several models of autoimmunity, infection, and cancer (4). They are selected and are restricted by the nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1d, and express an invariant Vα14 (iVα14)-Jα18 TCR chain (4, 5). Since the stimulation of their TCR by glycolipid ligands, such as exogenous α-galactosylceramide (α-GalCer) presented in the context of CD1d molecules, promptly induces secretion of high concentrations of IL-4 (6), it has been proposed that they may participate in the differentiation of Th2 cells. Indeed, α-GalCer-stimulated NKT lymphocytes, in some cases, promote a protective Th2 immune response (7, 8). However, even though Th2 differentiation can be accomplished normally in NKT cell-deficient mice (9, 10), it cannot be excluded that NKT cells influence the development of some immune responses involving Th2 cells.

In the present study, we demonstrate that the iVα14 NKT cell subset is required for airway eosinophilia, hyperresponsiveness, Th2 cytokine production, and elevated levels of IgE Abs, in an experimental model of allergic asthma.

*Centre National de la Recherche Scientifique Formation de Recherche en Evolution 2444, Paris V, Hôpital Necker, Paris, France; †Unité de Pharmacologie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris, France; ‡Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil; §Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 25 Hôpital Necker, Paris, France; ¶La Jolla Institute for Allergy and Immunology, San Diego, CA 92121; ‖RIKEN Research Center for Allergy and Immunology and Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan; #Section of Allergy and Clinical Immunology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06520

Received for publication February 24, 2003. Accepted for publication June 19, 2003.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[1] This work was supported by institute funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, Université René Descartes-Paris V, and Association pour la Recherche sur le Cancer (4661).

[2] Current address: Department of Pharmacology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

[3] Address correspondence and reprint requests to Dr. Maria C. Leite-de-Moraes, Centre National de la Recherche Scientifique Formation de Recherche en Evolution 2444, Paris V, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743, Paris Cedex 15, France. E-mail address: leite.de.moraes@necker.fr

[4] Abbreviations used in this paper: AHR, airway hyperreactivity; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; Penh, enhanced pause; iVα14, invariant Vα14^{+}, WT, wild type; α-GalCer, α-galactosylceramide.

Copyright © 2003 by The American Association of Immunologists, Inc.

0022-1767/03/$02.00

Materials and Methods

Mice

Six- to 8-wk-old male C57BL/6 wild-type (WT) and Jα18$^{-/-}$ (backcrossed at least 10 times in C57BL/6) (11) mice were bred in our own facilities. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and pellet food throughout the experimental period.

Ag immunization and airway challenge

At 1-wk intervals animals were immunized by an i.p. (day 0) and a s.c. (day 7) injection with 4 μg OVA (ICN Biomedicals) adsorbed on 1.6 mg of aluminium hydroxide gel (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.4 ml of sterile saline. Beginning on day 14 following the initial immunization, mice were anesthetized with ketamine anesthesia (Imalgene 1000, 35 mg/kg; Merial, Lyon, France) and airway challenged twice (days 14 and 21) intranasally with 10 μg of OVA in 50 μl of saline. Control mice received only saline at these times. Twenty-four hours after the last intranasal challenge (day 22), each group consisting of 6–20 mice was analyzed for eosinophil infiltration, airway hyperresponsiveness, cytokine levels, and Ab production.

In some experiments, at 1-wk intervals, animals were immunized by three i.p. injections (days 0, 7, and 14) with 10 μg OVA adsorbed on 1.6 mg of aluminum hydroxide gel in 0.4 ml of sterile saline. Sera were collected on day 15 and storaged for IgE measurement.

Adoptive transfer

Spleen cells from WT or Jα18$^{-/-}$ mice were depleted of CD8$^+$ T cells, CD62L$^+$, and CD19$^+$ B cells labeled with the corresponding mAbs with anti-rat Ig-coated magnetic beads (Dynal, Compiègne, France). Among the mAbs used for cell depletion CD8 (clone 53.67) and CD62L (clone Mel14) were purified in our laboratory while the anti-CD19 (clone 1D3) was purchased from BD PharMingen (San Diego, CA). The enriched negative selected NKT spleen cell population (containing 10^5 iVα14 NKT cells, as assessed by CD1d/α-GalCer tetramers staining), as well as a negative control (equivalent numbers of similarly depleted spleen cells from Jα18$^{-/-}$ mice) were injected i.v. into Jα18$^{-/-}$ mice that had been immunized twice with OVA.

Blocking of NKT/CD1d cell interaction in vivo

In some experiments, in addition to OVA immunization and challenge (as described above), separate groups of mice were also treated i.p. with 0.15 mg of blocking rat anti-CD1d mAb (clone 20H2) or control rat IgG (Sigma-Aldrich, Stonheim, Germany) per mouse on days -1, 0, $+2$, $+6$, $+7$, $+9$, $+13$, $+14$, $+16$, $+20$, and $+21$. No differences in the percentage of iVα14 NKT splenocytes were observed following anti-CD1d or Ig treatment on day 22 when mice were sacrificed (data not shown).

Determination of airway hyperresponsiveness

Airway responsiveness was assessed as previously described (12). Briefly, 24 h after the last challenge, conscious mice were placed into a plethysmograph chamber (Buxco Eletronics, Sharon, CT), and respiratory parameters were measured after 10 min of aerosol administration of 150 mM methacholine (Sigma-Aldrich) delivered for 60 s. Airflow obstruction was expressed as enhanced pause (Penh), calculated as: Penh = [*Te* (expiratory time)/*Tr* (relaxation time)] $-$ 1 $\times$ [*Pef* (peak expiratory flow)/*Pif* (peak inspiratory flow)]. The values of Penh expressed per minute were averaged from three determinations recorded every 20 s.

Bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

Immediately after assessment of AHR, mice were deeply anesthetized by i.p. injection of urethane (15 mg/10 g body weight) (Sigma-Aldrich), blood was collected, and the resulting serum was stored. Airways were washed twice with saline, and the BALF cell differential counts and percentages were determined by Diff-Quik (Baxter-Dale, Dudingen, Germany) staining of cytospin slides. Two-hundred cells per slide were counted. Aliquots of BALF were stored for cytokine measurement.

Determination of cytokines in BALF and of serial OVA-specific IgE

The levels of IL-4, IL-5, IL-13, and IFN-γ in BALF and OVA-specific IgE serum levels were assessed by ELISA as previously described (6, 12) OVA-specific IgE levels of samples were related to an internal standard from pooled sera of hyperimmunized BALB/c mice. Data were expressed as IgE index calculated as follows: IgE index = [OD sample $-$ OD buffer only]/[OD positive control $-$ OD buffer only].

Flow cytometric analysis

Kinetic analysis of NKT cell activation after exposure to OVA was performed. In brief, 24 h after immunizations and/or intranasal challenges, mice were sacrificed, and splenocytes were recovered and stained for 30 min in PBS containing 2% FCS and 0.01 M sodium azide and mCD1d-α-GalCer tetramer-APC. Tetramers were prepared in our laboratory from mCD1d/mβ2m expression vector (13). Cells were then incubated with appropriate dilutions of anti-CD4 PerCP-Cy-5.5 (clone RM4-5), anti-TCR$\alpha\beta$-FITC (clone H57-597) and anti-CD69-PE (H1.2F3), all purchased from BD PharMingen. Dead cells were excluded on the basis of forward and side scatter. At least 5×10^5 live lymphoid cells were acquired in each run. Samples were analyzed on a FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA) using CellQuest software.

Statistical analysis

Nonparametric Mann-Whitney test was used to calculate significance levels for all measurements. Values of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

AHR and eosinophilic inflammation is reduced in Jα18$^{-/-}$ mice

Marked features in this model of allergen-induced asthma are AHR and massive airway inflammation observed following OVA challenge. Our findings clearly demonstrate that OVA-sensitized and -challenged Jα18$^{-/-}$ mice developed decreased AHR after methacholine inhalation as compared with OVA-sensitized and -challenged control mice (Fig. 1), implicating iVα14 NKT cells in AHR. The total cell number in BALF of Jα18$^{-/-}$ mice following two intranasal OVA challenges was decreased by 42% compared with WT mice (Fig. 2*A*). The percentage of eosinophils, which account for the majority of cells in BALF from OVA-challenged mice (up to 65%), was decreased by 58% in iVα14 NKT cell-deficient animals (Fig. 2*B*). Both macrophages and neutrophils also were reduced accounting for the overall decrease ($2.6 \pm 0.2 \times 10^5 \pm 0.2$ vs $1.7 \pm 0.2 \times 10^5$ macrophages/ml and $2.2 \pm 0.6 \times 10^5$ vs $1.1 \pm 0.1 \times 10^5$ neutrophils/ml in OVA-challenged WT vs Jα18$^{-/-}$ mice, respectively). Conversely, lymphocyte recruitment in BALF was not modified $7 \pm 2 \times 10^3$ vs $4.7 \pm 2 \times 10^3$ lymphocytes/ml in OVA-challenged WT and Jα18$^{-/-}$ mice, respectively). Among these lymphocytes, iVα14 NKT cells were also recruited to the lung of OVA-treated WT mice as assessed by RT-PCR analysis (data not shown).

Both IL-4 and IL-5 production are impaired in BALF of immunized Jα18$^{-/-}$ mice

IL-4 and IL-5 levels were markedly reduced in BALF collected 24 h after challenge from NKT cell-deficient mice as compared with WT littermates (Fig. 2, *C* and *D*). Impaired IL-5 production

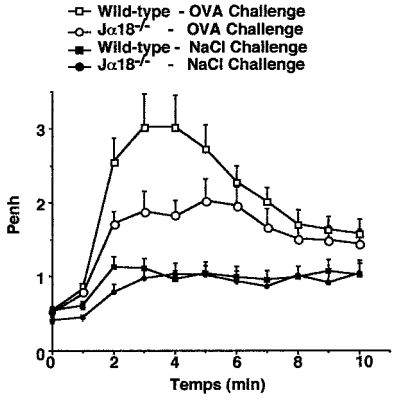


FIGURE 1. Decreased AHR development in Jα18$^{-/-}$ mice. Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA (○ and □) or NaCl (● and ■) in both WT (squares) and Jα18$^{-/-}$ (circles) mice. Data represent the mean $\pm$ SEM Penh values from 6 to 20 mice.

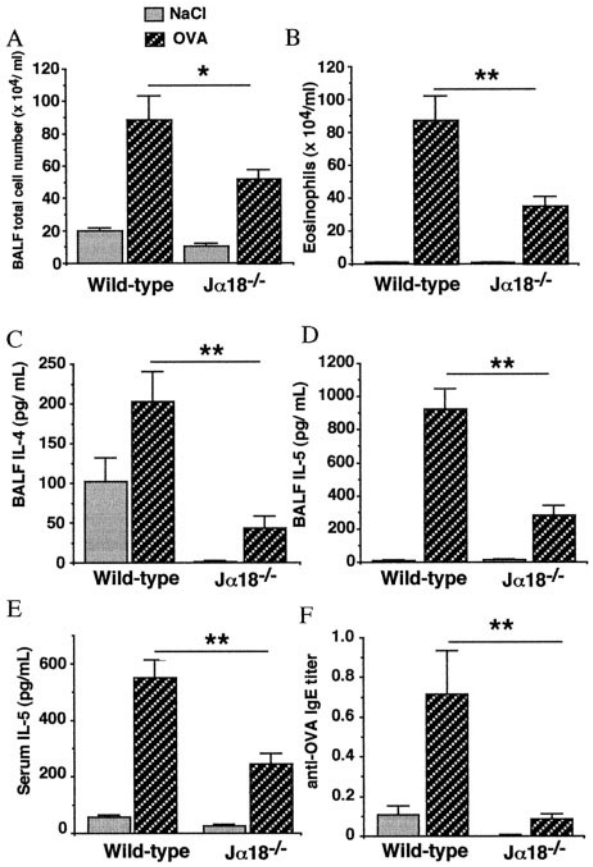


FIGURE 2. Marked decrease in specific airway eosinophilia, IL-4, IL-5, and anti-OVA IgE production in OVA-challenged Jα18$^{-/-}$ mice. Total (*A*) and eosinophil cell counts (*B*) were determined in the BALF of Jα18$^{-/-}$ and WT mice 24 h after the second NaCl or OVA challenge on day 22. Levels of IL-4 (*C*) and IL-5 (*D*) in BALF as well as IL-5 (*E*) and specific anti-OVA IgE Abs (*F*) in serum were also measured 24 h after the second NaCl or OVA challenge. Data are means ± SEM from 6 to 20 mice per group. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

in response to OVA challenge was also observed in the serum of Jα18$^{-/-}$ mice (Fig. 2*E*), showing a systemic defect in the production of this cytokine in the absence of NKT cells. IL-4 levels in the serum were below detection limits (<10 pg/ml).

OVA-specific IgE secretion is markedly decreased in Jα18$^{-/-}$ mice

To assess the peripheral response to immunization and subsequent allergen challenge, we measured OVA-specific IgE levels in the sera using ELISA. OVA-immunized and -challenged Jα18$^{-/-}$ mice had one-eighth (12.3 ± 9.7%) OVA-specific IgE compared with WT littermates, indicating that IgE production was severely affected (Fig. 2*F*). The failure to produce high levels of anti-OVA IgE was not due to the inability of Jα18$^{-/-}$ mice to produce this isotype, because in response to three OVA immunizations but without intranasal challenges they did effectively produce anti-OVA IgE (0.83 ± 0.10 and anti-OVA IgE titer for Jα18$^{-/-}$ and 1.53 ± 0.22 for WT mice).

Adoptive transfer of iVα14 NKT cells restores AHR development, airway eosinophilia, as well as IL-4, IL-5, and IgE production in Jα18$^{-/-}$ mice

To confirm the implication of iVα14 NKT cells in the severity of allergic asthma, we reconstituted OVA-sensitized Jα18$^{-/-}$ mice with iVα14 NKT lymphocytes 24 h before the first OVA airway challenge. Adoptive transfer of iVα14 NKT cells, but not of spleen cells from Jα18$^{-/-}$ mice, fully restored the capacity of Jα18$^{-/-}$ mice to develop AHR (Fig. 3*A*). Moreover, airway eosinophilia (Fig. 3*B*), both IL-4 (Fig. 3*C*) and IL-5 (Fig. 3*D*) production in the BALF as well as specific anti-OVA IgE (Fig. 3*E*) in the serum of OVA-sensitized and -challenged Jα18$^{-/-}$ mice were restored by the adoptive transfer of iVα14 NKT cells.

iVα14 NKT cells are activated in OVA-treated mice

We evaluated whether iVα14 NKT lymphocytes were activated during OVA-induced allergic asthma, as assessed by expression

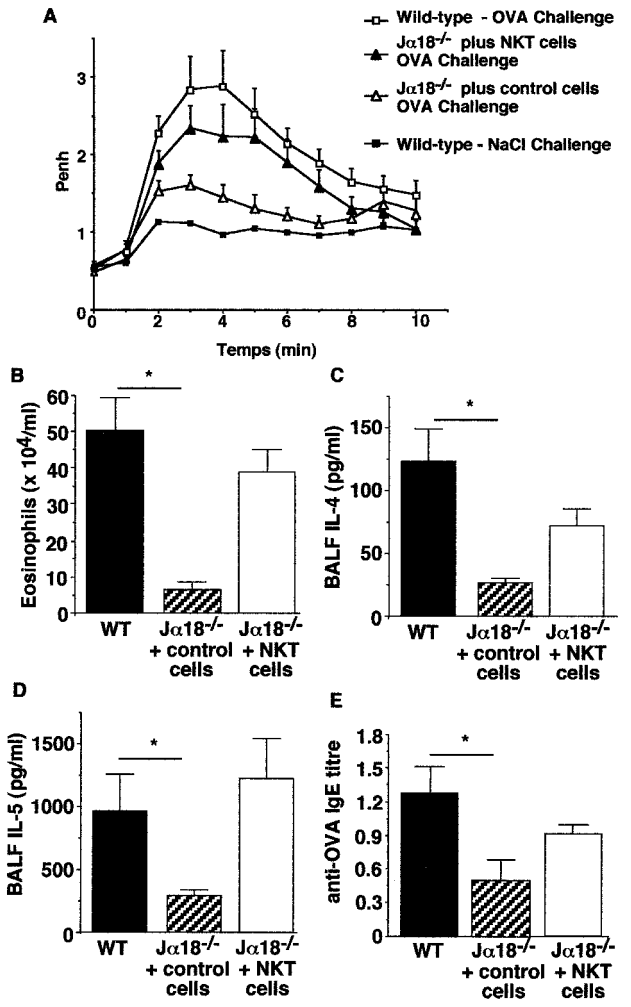


FIGURE 3. Decreased AHR development, eosinophilia as well as IL-4, IL-5, and anti-OVA IgE production in Jα18$^{-/-}$ mice are restored by adoptive transfer of NKT cells before challenge. Groups of OVA-immunized and -challenged Jα18$^{-/-}$ mice were adoptively transferred with enriched CD1d/α-GalCer tetramer positive splenocytes. Control Jα18$^{-/-}$ mice were adoptively transfered with splenocytes from Jα18$^{-/-}$ animals. *A,* Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA or NaCl in both WT (squares) and Jα18$^{-/-}$ (triangles) mice. Enriched CD1d/α-GalCer tetramer positive splenocytes (▲) were adoptively transferred into OVA-immunized and challenged Jα18$^{-/-}$ mice. Control Jα18$^{-/-}$ mice were adoptively transfered with splenocytes obtained from Jα18$^{-/-}$ animals (△). Data represent the mean ± SEM Penh values from 5 to 10 mice. *B–E,* Twenty-four hours after the last OVA challenge, airway eosinophil (*B*) numbers were evaluated and both IL-4 (*C*) and IL-5 (*D*) were measured in BALF. Serum levels of OVA-specific IgE (*E*) were determined by ELISA. Results represent means ± SEM from 5 to 10 mice. *, $p < 0.05$.

of the early activation marker CD69. Indeed, CD69 expression was up regulated on tetramer CD1d/α-GalCer$^+$TCR$\alpha\beta^+$ splenocytes from OVA-immunized and -challenged mice on day 21 compared with those immunized with OVA but challenged with NaCl (Fig. 4*A*), demonstrating the activation of these cells following the OVA treatments. Similar results were obtained on day 14 after the first OVA challenge (data not shown).

iVα14 NKT cells mediate Th2 allergen-induced airway inflammation in a CD1d-dependent manner

We have previously reported that NKT activation of iVα14$^+$ NKT cells does not necessarily occur in a CD1d-dependent manner, but can also be induced by the pro-inflammatory cytokines IL-12 and IL-18 (14). To evaluate possible CD1d involvement in NKT cell participation in Th2 asthmatic responses, WT mice were treated with blocking anti-CD1d mAb, or with control rat IgG at several time points during OVA immunization and challenge. Fig. 4*B* clearly shows that anti-CD1d treatment prevents the characteristic eosinophil recruitment to BALF observed after OVA challenge. Similarly, the secretion of both IL-4 (Fig. 4*C*) and IL-5 (Fig. 4*D*) levels in the BALF and of specific serum anti-OVA IgE Abs (Fig. 4*E*) were diminished when CD1d-dependent interactions were blocked.

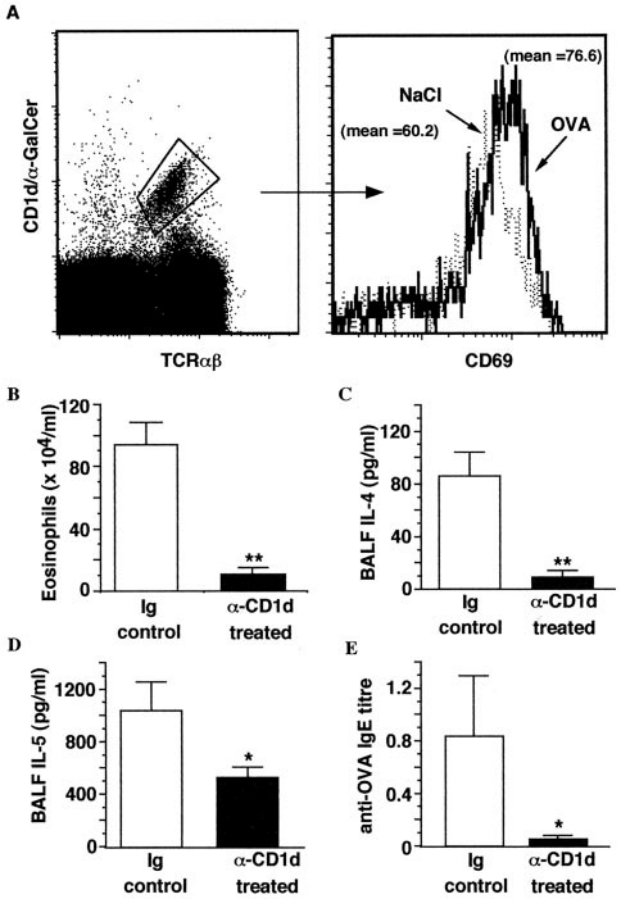


FIGURE 4. OVA immunization and challenge activates iVα14 NKT cells, while anti-CD1d mAb treatment diminishes airway eosinophilic recruitment, Th2 cytokine levels and OVA-specific IgE production. *A,* Representative FACS profiles showing up-regulation of CD69 expression on gated iVα14 CD1d/α-GalCer$^+$ TCR$\alpha\beta^+$ splenocytes recovered 24 h after the last OVA or NaCl challenge. *B–E,* Groups of C57BL/6 mice were treated with anti-CD1d mAb or control rat IgG (see *Materials and Methods*) and immunized with OVA and challenged with OVA or NaCl. Twenty-four hours later, serum and BALF were collected. Eosinophil numbers (*B*) and both IL-4 (*C*) and IL-5 (*D*) were measured in BALF while OVA-specific IgE (*E*) were determined in the serum. Results represent means ± SEM from 5 to 10 mice. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Discussion

Our experiments with Jα18$^{-/-}$ mice clearly show that iVα14 NKT lymphocytes are required for the characteristic features of experimental allergic asthma, namely airway inflammation, BALF Th2 cytokine production and the secretion of high levels of specific anti-OVA IgE, that will ultimely induce AHR.

The failure of Jα18$^{-/-}$ mice to develop the typical Th2 inflammation, AHR and IgE responses following OVA airway challenge is not due to a deficiency in Th2 responsiveness since these mice produce high levels of IgE in another protocol using three systemic immunizations with 2.5 higher doses of OVA. These data concur with previous reports showing that Jα18$^{-/-}$ mice are not defective in IgE production (15). In this study we used a protocol where all mice were similarly immunized with OVA and alum, and airway OVA challenge resulting in Th2 inflammation and AHR. Because we found that iVα14 NKT cells are present in the lung of OVA-challenged mice, it is possible that they are involved during challenge rather than necessarily during priming. According to this postulate, we adoptively transferred WT iVα14 NKT cells just before OVA challenge, and then sufficed to restore the capacity of Jα18$^{-/-}$ mice to fully develop airway eosinophilia, AHR, BALF cytokine, and anti-OVA IgE production.

Our results differ from those of a previous study using another type of NKT cell-deficient mice, lacking CD1d molecules (16), which demonstrated that allergen-specific IgE levels and eosinophilia were not different from those observed in WT mice. Discrepancies observed may be explained by the different experimental protocols (two vs multiple challenges, timing of mice sacrifice) as well as the genetic background of the mutant mice (129/Sv × C57BL/6 for CD1d$^{-/-}$ and C57BL/6 for Jα18$^{-/-}$ mice). It is unlikely that the genotype (CD1d$^{-/-}$ vs Jα18$^{-/-}$ mice) is responsible for these differences since CD1d$^{-/-}$ mice (backcrossed with C57BL/6) and Jα18$^{-/-}$ mice were similarly deficient in response to our protocol of immunization and challenge (data not shown). Moreover, in agreement with our results, it has recently been reported that both CD1d$^{-/-}$ and Jα18$^{-/-}$ mice, backcrossed with BALB/c, develop neither AHR nor airway eosinophilia, Th2 cytokine production and high levels of IgE following OVA challenge (17). Taken together, these results clearly demonstrate the requirement of iVα14 NKT cells in allergen-induced asthma.

Additionally, our findings show that iVα14 NKT cells are present in lungs of OVA-treated mice, that they are systemically activated (up-regulation of CD69), and that their implication in this model is mediated through CD1d interactions. We and others have already demonstrated that NKT cells stimulated with α-GalCer favor Th2 or Th1 protective immune responses in experimental autoimmune diseases or tumors, respectively (4). In contrast, the present study underscores the capacity of activated iVα14 NKT cells to mediate a pathological Th2 allergy immune response in asthma. It is probable that this activation involves recognition of endogenous Ags associated with CD1d molecules, because OVA itself was unable to stimulate NKT cells neither from naive nor from OVA-treated mice (day 22) (data not shown). Endogenous Ags capable of stimulating

iVα14 NKT cells remain to be determined, but it has been suggested that the self-Ags, presumably glycolipids, that bind CD1d are recognized by V$\alpha14^+$ TCR of these cells.

In conclusion, we have demonstrated that iVα14 NKT cells mediate Th2 eosinophil airway inflammation and AHR in an allergen-induced asthma model. Thus, NKT cells may mediate or amplify the pathogenic Th2 inflammatory response and crucial AHR in allergic asthma, suggesting that depletion or blockade of NKT cells might be a possible option for the treatment of this disease.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. E. Schneider (Centre National de la Recherche Scientifique Formation de Recherche en Evolution 2444, Paris, France) for helpful discussions and critical comments and E. Bardel for technical assistance. We are especially indebted to Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd., for providing α-GalCer and to Dr. Albert Bendelac (Princeton University, Princeton, NJ) for the gift of 20H2 hybridoma.

References

1. Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol. 17:255.*
2. Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R. H. DeKruyff. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol. 3:715.*
3. Cohn, L., R. J. Homer, A. Marinov, J. Rankin, and K. Bottomly. 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.*
4. Lisbonne, M., and M. C. Leite-de-Moraes. 2003. Invariant Vα14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur. Cytokine Network 14:4.*
5. Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, K. Motoki, H. Ueno, R. Nakagawa, H. Sato, E. Kondo, et al. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of vα14 NKT cells by glycosylceramides. *Science 278:1626.*
6. Leite-de-Moraes, M. C., G. Moreau, A. Arnould, F. Machavoine, C. Garcia, M. Papiernik, and M. Dy. 1998. IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-γ production by IL-12: influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur. J. Immunol. 28:1507.*
7. Singh, N., S. Hong, D. C. Scherer, I. Serizawa, N. Burdin, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 1999. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and α-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J. Immunol. 163:2373.*
8. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura. 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature 413:531.*
9. Chen, Y. H., N. M. Chiu, M. Mandal, N. Wang, and C. R. Wang. 1997. Impaired $NK1^+$ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice. *Immunity 6:459.*
10. Smiley, S. T., M. H. Kaplan, and M. J. Grusby. 1997. Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells. *Science 275:977.*
11. Cui, J., T. Shin, T. Kawano, H. Sato, E. Kondo, I. Toura, Y. Kaneko, H. Koseki, M. Kanno, and M. Taniguchi. 1997. Requirement for Vα14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science 278:1623.*
12. Russo, M., M. A. Nahori, J. Lefort, E. Gomes, A. de Castro Keller, D. Rodriguez, O. G. Ribeiro, S. Adriouch, V. Gallois, A. M. de Faria, and B. B. Vargaftig. 2001. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 24:518.*
13. Matsuda, J. L., O. V. Naidenko, L. Gapin, T. Nakayama, M. Taniguchi, C. R. Wang, Y. Koezuka, and M. Kronenberg. 2000. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med. 192:741.*
14. Leite-de-Moraes, M. C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, A. Herbelin, and M. Dy. 1999. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J. Immunol. 163:5871.*
15. Cui, J., H. Watanabe, T. Kawano, T. Yamashita, C. Kamata, C. Shimizu, K. Kimura, E. Shimizu, J. Koike, H. Koseki, et al. 1999. Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by lingand-activated Vα14 natural killer T cells. *J. Exp. Med. 190:783.*
16. Korsgren, M., C. G. Persson, F. Sundler, T. Bjerke, T. Hansson, B. J. Chambers, S. Hong, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren, and O. Korsgren. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J. Exp. Med. 189:553.*
17. Akbari, O., P. Stock, E. Meyer, M. Kronenberg, S. Sidobre, T. Nakayama, M. Taniguchi, M. J. Grusby, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2003. Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med. 9:582.*

Le traitement par l'α-galactosylcéramide inhibe le développement de l'asthme allergique expérimental via son action sur les cellules iNKT: rôle de l'IFN-γ. (article II)

Nous avons démontré que les cellules iNKT sont requises pour le développement de l'asthme allergique (article I). Dans la présente étude, nous avons testé l'hypothèse suivant laquelle l'asthme allergique pourrait être modulé par des traitements agissant sur les cellules iNKT. Sachant que l'α-GalCer active spécifiquement les cellules iNKT et que l'injection de ce glycolipide inhibe le développement de certaines maladies chez la souris, nous nous sommes proposés d'analyser son effet sur le modèle d'asthme allergique.

Nos résultats montrent que le traitement par l'α-GalCer inhibe les composantes de l'asthme chez les souris pré-asthmatiques. L'injection i.v. d'α-GalCer 1h avant le premier challenge est capable de diminuer l'HRB chez les deux souches de souris C57BL/6 et BALB/c. Ce traitement diminue significativement le recrutement des éosinophiles vers les poumons ainsi que la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5 dans le LLBA et la production des IgE spécifiques d'OVA dans le sérum. Par contre, la quantité d'IFN-γ dans le LLBA est augmentée chez les souris traitées par l'α-GalCer par rapport aux souris non traitées. Il est intéressant de souligner que l'administration de l'α-GalCer par voie intra-nasale (i.n.), 1h avant le premier challenge, a le même effet que l'injection systémique. En effet, le traitement i.n. par l'α-GalCer chez les souris ayant déjà reçu le premier challenge par l'OVA inhibe l'HRB et la sécrétion d'IL-4 dans le LLBA. Nous soulignons également que

l'administration d'α-GalCer augmente le nombre et l'état d'activation des cellules iNKT dans les poumons des souris asthmatiques. De plus, ce traitement oriente la production de cytokines en faveur de la sécrétion d'IFN-γ plutôt que d'IL-4 par les cellules iNKT pulmonaires.

Nous avons ensuite analysé le rôle de différentes cytokines potentiellement impliquées dans le mécanisme par lequel l'α-GalCer exerce son effet protecteur. Nos résultats ont clairement démontré que seule l'administration d'anticorps anti-IFN-γ permet l'inhibition de la protection induite par l'α-GalCer, suggérant un rôle crucial pour cette cytokine dans la protection au cours de l'asthme allergique.

Il était également important de déterminer si l'effet protecteur de l'α-GalCer pouvait être transféré à des souris précédemment immunisées par l'OVA. Ces souris ont reçu par transfert adoptif des splénocytes de souris sauvages immunisées par l'OVA et traitées par l'α-GalCer, 1h avant leur challenge. D'autres groupes de souris ont reçu parallèlement des splénocytes provenant de souris déficientes soit en IFN-γ soit en cellules iNKT ($J\alpha18^{-/-}$). Seuls les splénocytes de souris sauvages traitées par l'α-GalCer ont été capables d'inhiber l'inflammation éosinophilique et l'HRB. Ces résultats suggèrent que les cellules iNKT et l'IFN-γ sont nécessaires à la protection obtenue par l'administration d'α-GalCer. Le rôle protecteur des cellules iNKT dans ce modèle est confirmé par le transfert de cellules iNKT triées à partir de souris immunisées par l'OVA et traitées pas l'α-GalCer. Ce transfert est capable de diminuer l'HRB et l'éosinophilie chez les souris receveuses.

Nous avons démontré qu'une seule injection d'α-GalCer inhibe l'HRB et l'inflammation pulmonaire chez des souris prédisposées à l'asthme allergique. Ces

résultats montrent que l'action délétère des lymphocytes iNKT sur la maladie peut être modifiée par le traitement par l'α-GalCer qui oriente leur sécrétion de cytokines vers un profil pro-Th1 (producteur d'IFN-γ).

Nos résultats sont en faveur d'une utilisation potentielle d'α-GalCer comme outil thérapeutique, puisque son administration locale, surtout chez des souris déjà sensibilisées à l'allergène, est capable de réduire les composantes de la maladie asthmatique.

European Journal of Immunology
Highlights

FRONTLINE:

α-Galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: Role of IFN-γ

Patricia Hachem[*1], Mariette Lisbonne*[*1], Marie-Laure Michel[1], Séverine Diem[1], Sukit Roongapinun[2], Jean Lefort[3], Gilles Marchal[3], André Herbelin[1], Philip W. Askenase[2], Michel Dy[1] and Maria C. Leite-de-Moraes[1]*

[1] CNRS UMR (Centre National de la Recherche Scientifique – Unité Mixte de Recherche) 8147, Paris V, Hôpital Necker, Paris, France
[2] Section of Allergy and Clinical Immunology, Yale U School of Medicine, New Haven, USA
[3] Laboratoire de Référence des Mycobacteries, Institute Pasteur, Paris, France

Received 15/7/05
Accepted 19/8/05

[DOI 10.1002/eji.200535268]

Allergic asthma is a multifaceted syndrome consisting of eosinophil-rich airway inflammation, bronchospasm, and airway hyper-responsiveness (AHR). Using a mouse model of allergic asthma, we previously reported that invariant NKT (iNKT) cells increase the severity of this disease. Herein, we demonstrate that a single i.v. injection of α-galactosylceramide (α-GalCer), 1 h before the first airway allergen challenge of OVA-sensitized mice, abrogates elicitation of AHR, airway eosinophilia, IL-4 and IL-5 production in bronchoalveolar lavage fluid, and specific anti-OVA IgE antibodies. Further, α-GalCer administered intranasally also strongly inhibited the major symptoms of asthma in sensitized and challenged mice. α-GalCer treatment induces iNKT cell accumulation in the lungs, and shifts their cytokine profile from pro-asthmatic IL-4 to a protective IFN-γ production. The role of IFN-γ from iNKT cells in protection was shown by adoptive transfer of sorted iNKT cells from OVA-sensitized and α-GalCer-treated mice which protected immunized recipients from manifesting asthma by an IFN-γ-dependent pathway. Our findings demonstrate for the first time that α-GalCer administered locally inhibits asthma symptoms, even in predisposed asthmatic mice, through an iNKT cell- and IFN-γ-dependent pathway.

Key words: NKT cells · Asthma · α-GalCer · Hyper-reactivity · Immunotherapy



See accompanying commentary: http://dx.doi.org/10.1002/eji.200535425

* The first two authors contributed equally to this study.

Correspondence: Maria C. Leite-de-Moraes, CNRS UMR 8147, Paris V, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France
Fax: +33-1-44490676
e-mail: leite.de.moraes@necker.fr

Abbreviations: α-GalCer: α-galactosylceramide · **AHR:** airway hyper-responsiveness · **BALF:** bronchoalveolar lavage fluid · **CD1d/α-GalCer tetramer:** α-GalCer-loaded CD1d/β2 m tetramer · **HE:** hematoxylin/eosin · **i.n.:** intranasal · **iNKT:** invariant natural killer T

Introduction

Recent advances in understanding the pathogenesis of allergic asthma have identified a complex interplay between Th2 effector cells, recruited inflammatory eosinophils, local IgE-activated mast cells, and released inflammatory cytokines and chemokines, as well as mediators of airway spasm and hyper-reactivity [1–5]. Locally, released Th2-type cytokines like IL-4 and IL-5 have been shown to generate mucosal eosinophil-rich

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

inflammation with goblet cell proliferation and increased mucus production [1–5]. Importantly, Th2-dependent mechanisms are also responsible for airway hyper-responsiveness (AHR), and for the production of IgE antibodies that lead to local mast cell activation [1–5]. Additionally, current concepts postulate that the Th2-type effector responses can possibly be regulated by suppressor $CD4^+CD25^+$ T cells, counter-regulatory Th1 cells, or immunoregulatory NKT cells [3, 6–8].

Invariant Vα14 natural killer T (iNKT) cells constitute a distinctive subpopulation of mature T lymphocytes, which co-express a highly restricted T cell receptor (TCR) repertoire composed of a single invariant Vα14Jα18 chain in mice and a Vα24Jα18 chain in humans, preferentially paired with limited TCR Vβ chains [9–12]. This semi-invariant TCR reflects positive selection by the non-polymorphic MHC class I-like molecule, CD1d [9–12]. iNKT cells specifically recognize the exogenous CD1d-bound glycolipid, α-galactosylceramide (α-GalCer), obtained from a marine sponge, but absent in mammalian cells [13]. A large range of cytokines are promptly generated by iNKT cells in response to α-GalCer, including IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-α and GM-CSF [10–14]. Recently, Bendelac and collaborators have identified the glycolipid iGb3 as one of the endogenous molecules that positively select and stimulate iNKT cells [15].

We and others have previously demonstrated that iNKT cells are required for the severity of allergic asthma since iNKT cell-deficient mice develop mild disease [6–8]. Herein, we hypothesized that allergic asthma could be modulated by treatments targeting iNKT cells. Knowing that iNKT cells specifically respond to α-GalCer and that injection of this glycolipid is protective in some experimental models of human disease [16–21], we reasoned that activation of iNKT cells by α-GalCer might prevent allergic asthma.

Our results show that a single administration of α-GalCer to sensitized mice, both prior or after antigen challenge, completely abolished their airway eosinophilia and AHR. This protective effect is dependent on the IFN-γ produced by iNKT cells and can be adoptively transferred to sensitized mice.

Results

Systemic α-GalCer treatment of previously sensitized mice inhibits the major asthma hallmarks

We previously demonstrated that the adoptive transfer of iNKT cells to pre-sensitized $J\alpha18^{-/-}$ (iNKT cell-deficient) mice 1 h before the first OVA airway challenge reconstituted allergic asthma [6]. This finding prompted us to examine whether α-GalCer could protect against asthma when injected 1 h before the first OVA challenge.

Similar to previous studies [6–8], we found that mice sensitized with OVA (i.p.) and challenged with allergen *via* the airways had AHR significantly increased compared to OVA-immunized and NaCl-challenged control mice (Fig. 1A, B). In contrast, mice treated with a single i.v. injection of α-GalCer 1 h before the first OVA challenge did not develop AHR (Fig. 1A, B). The protective effect of α-GalCer treatment was observed in both C57BL/6 and Balb/c mice, while it did not occur following injection of controls (vehicle used to dilute α-GalCer) (Fig. 1A, B). Further, α-GalCer treatment significantly decreased eosinophils, neutrophils and lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) as compared to controls (Fig. 1C). Histochemical staining also revealed that treatment with α-GalCer markedly reduced the characteristic eosinophil infiltrates in the lung of OVA-immunized and -challenged mice (Fig. 1D). In addition, typical Th2 cytokines induced by OVA challenge, namely IL-4 and IL-5, were significantly reduced in the BALF of α-GalCer-treated mice, while IFN-γ production was enhanced (Fig. 2A). Finally, α-GalCer treatment inhibited the peripheral response to immunization and airway challenge, as measured by serum OVA-specific IgE levels (Fig. 2B). Thus, several hallmarks of the Th2 asthmatic response were markedly inhibited by i.v. treatment of sensitized mice with α-GalCer 1 h before challenge.

Intranasal administration of α-GalCer to previously sensitized mice inhibits AHR, eosinophilia and BALF Th2 cytokine production

We addressed the question whether α-GalCer could exert the same protective effect when administered intranasally (i.n.). This proved to be the case (Fig. 3) since α-GalCer administered i.n. 1 h before the first OVA challenge significantly inhibited both AHR and eosinophil recruitment in the airways (Fig. 3A, B). Moreover, the decrease of IL-4 was concomitant with an increase of IFN-γ (Fig. 3C), indicating that a shift from a pro-asthmatic Th2 to a protective Th1 response had occured in the airways.

Local α-GalCer administration inhibits asthma elicitation in OVA-sensitized and -challenged mice

We further analyzed whether local α-GalCer treatment could abrogate asthma symptoms in mice that were previously sensitized and challenged with OVA. Indeed, α-GalCer administered i.n. 24 h after the first OVA challenge inhibited AHR (Fig. 3A), airway eosinophilia (Fig. 3B) and BALF IL-4 production while BALF IFN-γ

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

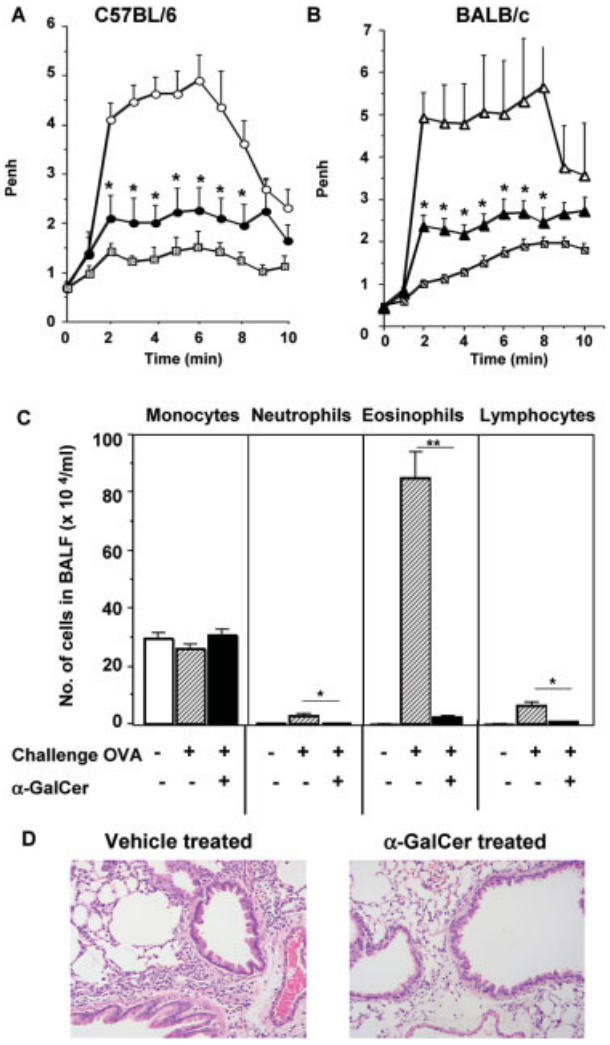


Figure 1. Analysis of antigen-induced airway responses in α-GalCer-treated mice. (A,B) α-GalCer treatment inhibits the development of AHR. Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA (circles and triangles) or NaCl (squares) in both C57BL/6 (A) and Balb/c (B) immunized mice treated with a single i.v. injection of α-GalCer (filled circles and triangles) or vehicle (empty circle and triangle) 1 h before the first challenge. Similar results were obtained when immunized mice were treated with α-GalCer i.v. or vehicle (data not shown) and then challenged with NaCl (squares represent data obtained with α-GalCer). Data represent the mean ± SEM enhanced pause (Penh) values from groups of 6–20 sensitized mice. OVA-immunized and -challenged mice treated with α-GalCer exhibit decreased AHR when compared to vehicle-treated animals (*p <0.05). (C) Airway eosinophilia is reduced after α-GalCer treatment. BALF from mice in (A) was analyzed immediately after AHR measurement. Results are shown as the number of cells per mL in BALF. Data represent the mean ± SEM of six mice. *p <0.05, **p <0.01. (D) Representative lung sections stained with HE (magnification × 10) from OVA-sensitized mice, treated with vehicle (left panel) or α-GalCer (right panel) i.v. 1 h before the first OVA challenge.

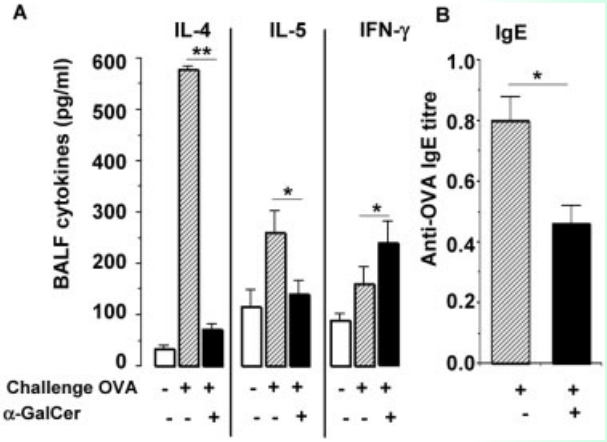


Figure 2. Analysis of antigen-induced cytokine responses in α-GalCer-treated mice. (A) A shift in the Th2/Th1 cytokine response occurs in BALF of α-GalCer-treated mice. IL-4, IL-5 and IFN-γ were measured in BALF of OVA-immunized mice treated or not with α-GalCer i.v. and then challenged with OVA or NaCl. Data are the means ± SEM of ten mice. (B) Evaluation of OVA-specific IgE in α-GalCer-treated mice. OVA-specific IgE was measured by ELISA in sera from mice sensitized, and α-GalCer-treated or not, and challenged with OVA. Data represent the mean ± SEM of six mice. *p <0.05, **p <0.01.

levels were enhanced (Fig. 3C), compared to untreated OVA-immunized and -challenged mice. These findings demonstrate that α-GalCer administered locally not only inhibits the elicitation of asthma in sensitized mice but also abrogates the major symptoms of asthma in mice that already were airway challenged with OVA, thus supporting a possible therapeutic use of this glycolipid.

IFN-γ is required for the protective effect of α-GalCer treatment

To further investigate the mechanism underlying the protective effect mediated through α-GalCer, we examined involvement of cytokines like IL-4, IFN-γ and IL-10. We blocked their activity *in vivo* by injecting neutralizing antibodies against the corresponding cytokine or its specific receptor, as in the case of IL-10. Only anti-IFN-γ antibody injection abrogated the protective effect of α-GalCer and completely restored airway eosinophilia and BALF IL-4 production (Fig. 4A, B). Importantly, AHR was also recovered in these conditions (Fig. 4C), supporting the notion that protection from allergic asthma could be afforded by a single administration of α-GalCer acting through IFN-γ, as shown in Fig. 3C.

α-GalCer treatment enhances both the frequency of lung iNKT cells and their capacity to produce IFN-γ

We thus examined the cytokine production profile of lung iNKT cells. iNKT cells are already present in the lung

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

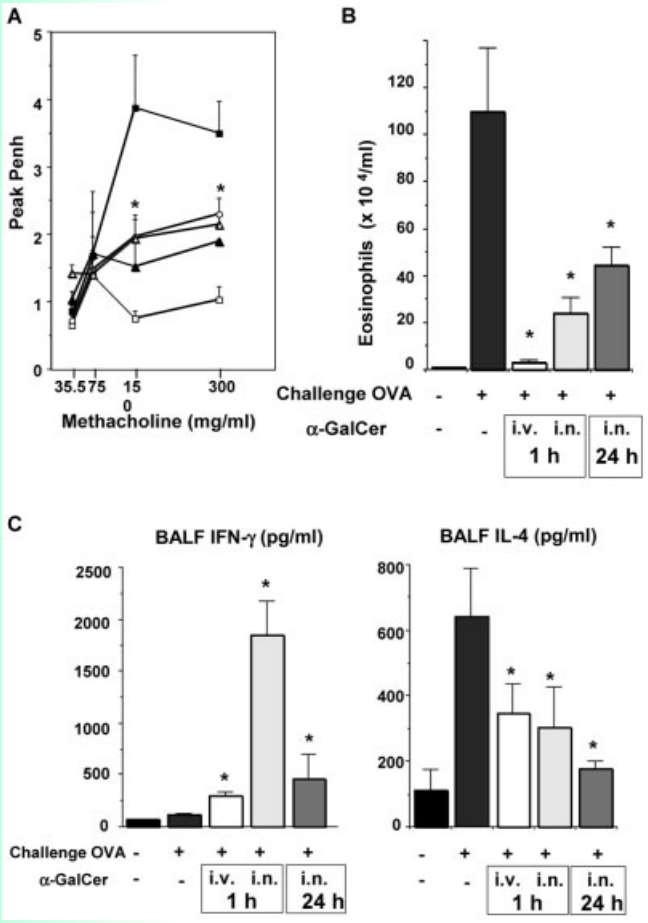


Figure 3. Effect of i.n. α-GalCer treatment on antigen-induced airway responses. (A) I.n. α-GalCer treatment inhibits the development of AHR. Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA (filled triangles and squares and both empty circles and triangles) or NaCl (empty squares) in C57BL/6 immunized mice treated with a single i.v. (circles) or i.n. (triangles) injection of α-GalCer 1 h before the first (empty circles and triangles) or 24 h after the first (filled triangles) OVA challenge. Data represent the mean ± SEM peak enhanced pause (Penh) values from groups of three to six sensitized mice. OVA-immunized and -challenged mice treated with α-GalCer i.n. or i.v. before the first OVA challenge exhibit decreased AHR when compared to untreated OVA-challenged animals (*p <0.05). (B, C) Airway eosinophilia and IFN-γ and IL-4 BALF levels after α-GalCer treatment. BALF from mice in (A) was analyzed immediately after AHR measurement. 1 h, α-GalCer injected 1 h before the first OVA challenge; 24 h, α-GalCer injected 24 h after the first OVA challenge. Data are the means ± SEM; *p <0.05.

of OVA-primed mice, and their frequency is enhanced following challenge with OVA compared to NaCl (Fig. 5A). Notably, α-GalCer treatment significantly augments the percentage of the iNKT cells among lung T cells in OVA-primed and -challenged mice (Fig. 5A). Further, lung iNKT cells in OVA-primed, α-GalCer-treated and OVA-challenged mice were significantly activated as assessed by their forward scatter (Fig. 5A). α-GalCer treatment did also increase the frequency of $CD4^+$ cells among lung iNKT cells, as well as the expression of this marker by these cells (Fig. 5A). Previous reports suggested that IL-4 produced by iNKT cells potentiated the development of asthma [7]. Thus, we examined the effect of the α-GalCer treatment on the cytokine production profile of lung iNKT cells obtained 2 days post treatment. Intracytoplasmic cytokine staining in freshly isolated lung iNKT cells showed that *in vivo* they produce preferentially IL-4 after priming and challenge with OVA (Fig. 5B). This *in vivo* data confirms previous data showing that lung iNKT cells from sensitized and challenged mice could produce IL-4 after *in vitro* stimulation [7]. In contrast, α-GalCer treatment induced a shift in the cytokine production profile of lung iNKT cells away from IL-4 towards higher IFN-γ production (Fig. 5B). This indicates that lung iNKT cells of α-GalCer-treated mice preferentially secrete IFN-γ in the airways.

The adoptive transfer of iNKT cells recovered from OVA-sensitized mice treated with α-GalCer protects sensitized mice against asthma

It was important to determine whether the protective effect of α-GalCer could be transferred to wild-type sensitized mice. Thus, we examined whether splenocytes from OVA-immunized and α-GalCer-treated wild-type mice could inhibit airway eosinophilia and AHR in OVA-immunized recipients. Using intracellular cytokine staining, we observed, as expected [10], that the majority of donor iNKT splenocytes from OVA-primed α-GalCer-treated mice produce IFN-γ and IL-4 at the time of their transfer to recipients (Fig. 6). Splenocytes from OVA-immunized mice treated at day 8 with α-GalCer were transferred i.v. to OVA-immunized recipients, 1 h before the first OVA challenge. This resulted in significantly reduced OVA-induced airway eosinophilia (Fig. 7A; group D) and AHR (Fig. 7B). In contrast, transfer of splenocytes from naive (data not shown), or simply OVA-primed mice to OVA-immunized recipients (Fig. 7A, B; group C) had no such effect, confirming the central role of α-GalCer treatment. Importantly, pulmonary eosinophilia and AHR were not decreased in OVA-immunized recipients injected with splenocytes from OVA-primed α-GalCer-treated $J\alpha18^{-/-}$ (iNKT cell-deficient) mice (Fig. 7A, B; group E) nor from IFN-γ-deficient mice (Fig. 7A, B; group F). These findings indicate that IFN-γ produced by iNKT cells is required for adoptive cell transfer of the inhibition of eosinophilia and airway hyper-reactivity.

To prove that iNKT cells actually were responsible for the inhibition of asthma following α-GalCer treatment, we sorted iNKT cells from the spleen of OVA-primed α-GalCer-treated mice after staining with α-GalCer-loaded

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

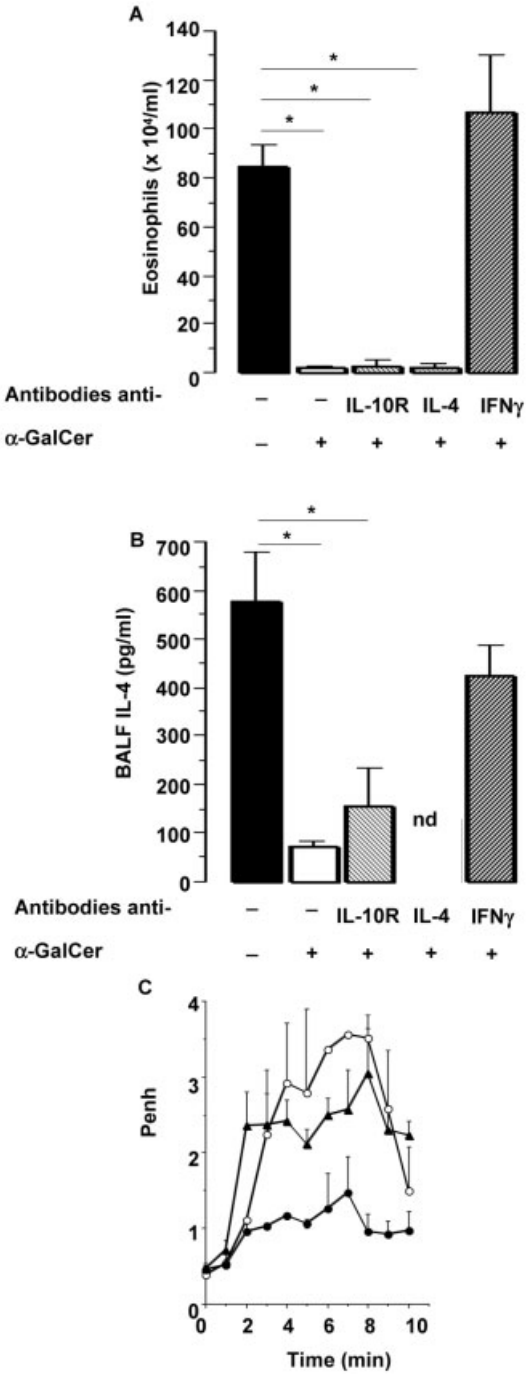


Figure 4. Anti-IFN-γ mAb treatment blocks the protective effect of α-GalCer injection. (A,B) Anti-IFN-γ treatment restores airway eosinophilia and IL-4 production in the BALF. Groups of OVA-immunized C57BL/6 mice were treated with anti-IL-4, anti-IL-10R, anti-IFN-γ mAb or control rat IgG (see Materials and methods), treated or not with α-GalCer i.v. and challenged with OVA 1 h later. At 24 h after the last challenge, BALF were collected. Eosinophil numbers (A) and IL-4 (B) were measured in BALF. (C) Anti-IFN-γ treatment restores AHR. Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA in mice treated (filled circles, triangles) or not (empty circle) with a single injection i.v. of α-GalCer 1 h after the second anti-IFN-γ treatment (triangles). No significant effect was observed when isoytpe controls were used (data not shown). Results represent means ± SEM from five to ten mice. $^{*}p < 0.05$.

CD1d/β2 m tetramers (CD1d/α-GalCer tetramers) and assessed their protective effect after injection into OVA-immunized recipients. We found that antigen-induced airway eosinophilia and AHR were significantly reduced by the transfer of only 10 000 sorted iNKT cells from OVA-immunized and α-GalCer-treated mice (Fig. 7A, B; group G), proving the high efficiency of iNKT cells in suppressing both eosinophilic inflammation and airway hyper-reactivity.

Discussion

Our findings clearly demonstrate that a single systemic (i.v.) or local (i.n.) administration of α-GalCer 1 h before the first airway challenge to OVA-sensitized mice abrogates the major asthma hallmarks such as AHR, airway eosinophilia, IL-4 and IL-5 production in BALF, and specific anti-OVA IgE antibodies. Importantly, local i.n. α-GalCer administration also effectively blocked AHR and airway eosinophilia following challenge in allergen-sensitized mice. These findings support the possible therapeutic use of α-GalCer treatment since it is effective when administered locally and protection is observed also in mice already challenged with the antigen.

Our results differ from previous reports showing that α-GalCer, co-administrated with OVA immunization, exacerbated allergic asthma probably by amplifying Th2 responses in the lung [22]. The protocol used in the paper of Kim *et al.* [22] is quite different from ours. They administered OVA i.n. on three consecutive days to lead to systemic unresponsiveness on rechallenge with the same antigen. α-GalCer was co-administered i.n. with OVA to act as an adjuvant, which broke the tolerance, thus inducing allergic asthma [22]. Other reports have already demonstrated that α-GalCer treatment could block the induction of tolerance by an IL-4-dependent mechanism or by triggering dendritic cell maturation when co-administered with the antigen [23, 24]. In contrast, here we demonstrated that a single i.n. administration of α-GalCer abrogates asthma symptoms in predisposed asthmatic mice, since these animals were immunized and challenged with OVA before the treatment. Another recent report also showed that α-GalCer treatment could inhibit allergic airway inflammation [25]. However, our paper brings new important data because we demonstrated that α-GalCer could act locally and even in mice already challenged with OVA,

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

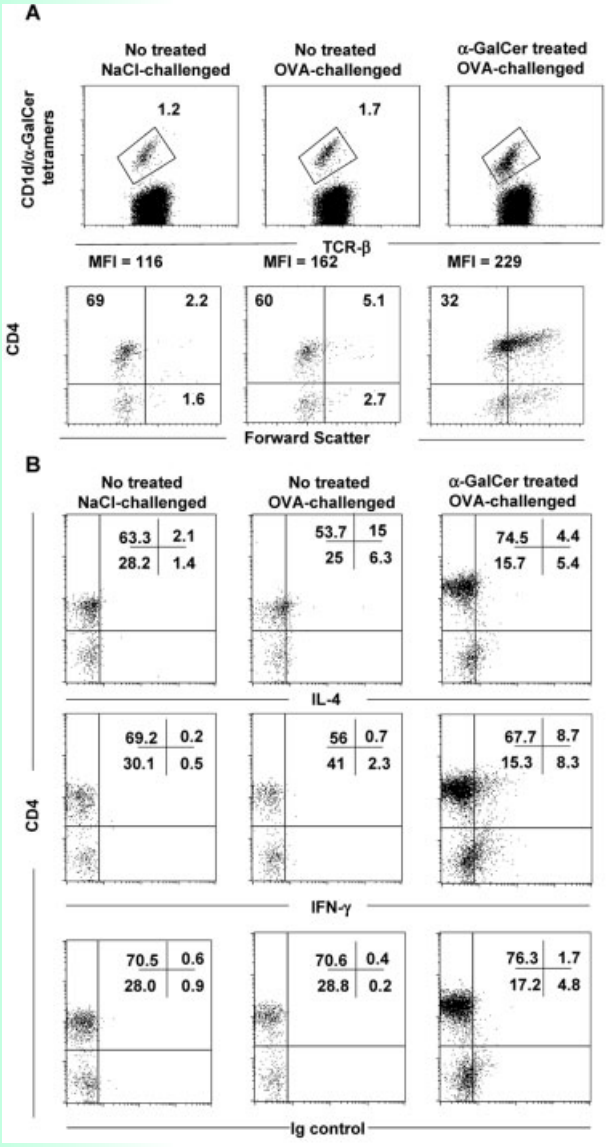


Figure 5. Effect of α-GalCer treatment on the cytokine production of lung iNKT cells. (A) Activation of lung iNKT cells increases in airways from mice treated with α-GalCer before being challenged with OVA. Mice were sensitized, treated or not with α-GalCer i.v. and challenged with OVA or NaCl 1 h later. Lung cells were isolated and stained with α-GalCer-loaded CD1d tetramers and mAb against TCRβ and CD4. Upper panels show the percentage of iNKT cells among lung T cells. Lower panels show the percentage of $CD4^+$ cells among gated lung iNKT cells as well as their forward scatter. The mean fluorescence intensity (MFI) for the CD4 expression among $CD4^+$ iNKT cells is also indicated. Data represent one experiment out of three. (B) α-GalCer treatment shifts the cytokine production profile of pulmonary iNKT cells. Lung cells isolated from immunized and α-GalCer-treated (right) or untreated control (middle) before OVA-challenged mice were obtained 1 h after the last challenge and immediately stained with α-GalCer-loaded CD1d tetramers, anti-TCRβ, anti-CD4 and anti-IL-4 or anti-IFN-γ mAb. The profile represents IL-4 (upper) and IFN-γ (low) production in gated lung iNKT cells. Data represent one experiment out of three.

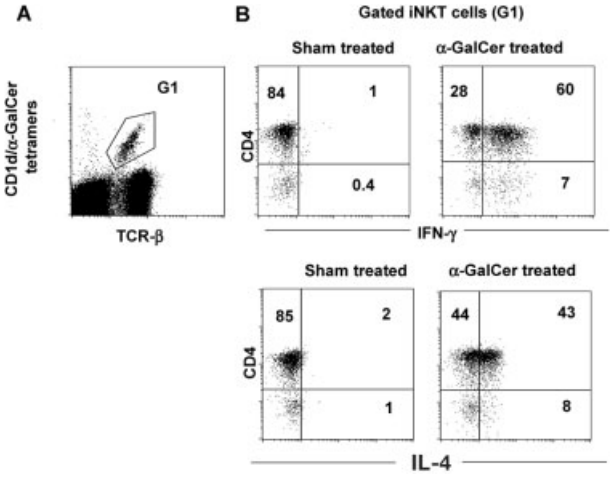


Figure 6. Cytokine production by iNKT donor splenocytes. (A,B) Representative FACS profiles showing IFN-γ and IL-4 production by iNKT splenocytes following α-GalCer injection. Mice were sensitized and treated or not with α-GalCer i.v. After 1 h, splenocytes were recovered, stained with α-GalCer-loaded CD1d tetramers, anti-TCRβ, anti-CD4 mAb and anti-IFN-γ, anti-IL-4 mAb or isotype control antibody. These cytokines were then measured in gated (G1) iNKT cells. The percentage of positive cells in each quadrant is represented. Data represent one experiment out of three.

and that α-GalCer induced suppressive iNKT cells that transferred inhibition of asthma.

We have previously demonstrated that iNKT cells are implicated in the severity of asthma [6]. The mechanisms are still unclear, despite recent reports that point to the major role of endogenous antigens capable of stimulating iNKT cells [15, 26]. It is suggested that an increased expression of some self glycolipids associated with the pro-Th2 environment in the asthma model could amplify the IL-4- and IL-13-producing capacity of iNKT cells to enhance asthma. Our present findings demonstrate that we can counteract the deleterious effect of iNKT cells in allergic asthma by a single α-GalCer administration. These cells promptly produce large amounts of both IL-4 and IFN-γ in response to α-GalCer [10, 27]. However, it is noteworthy that while serum IL-4 production is very rapid (2–4 h) but transient, IFN-γ is still detected in the serum 24 h later [27]. Thus, it is possible that sustained IFN-γ production by iNKT cells induced by α-GalCer treatment, even in the airways as we demonstrated here, could be responsible for the protective effect of α-GalCer treatment. Indeed, the protective effect of α-GalCer is IFN-γ dependent since it was completely blocked by the injection of anti-IFN-γ mAb (Fig. 4). Previous results demonstrated that IFN-γ injection could inhibit asthma severity [28, 29]. The mechanism through which IFN-γ could influence elicitation of asthma in α-GalCer-treated mice is still unclear, but the protection probably results from

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

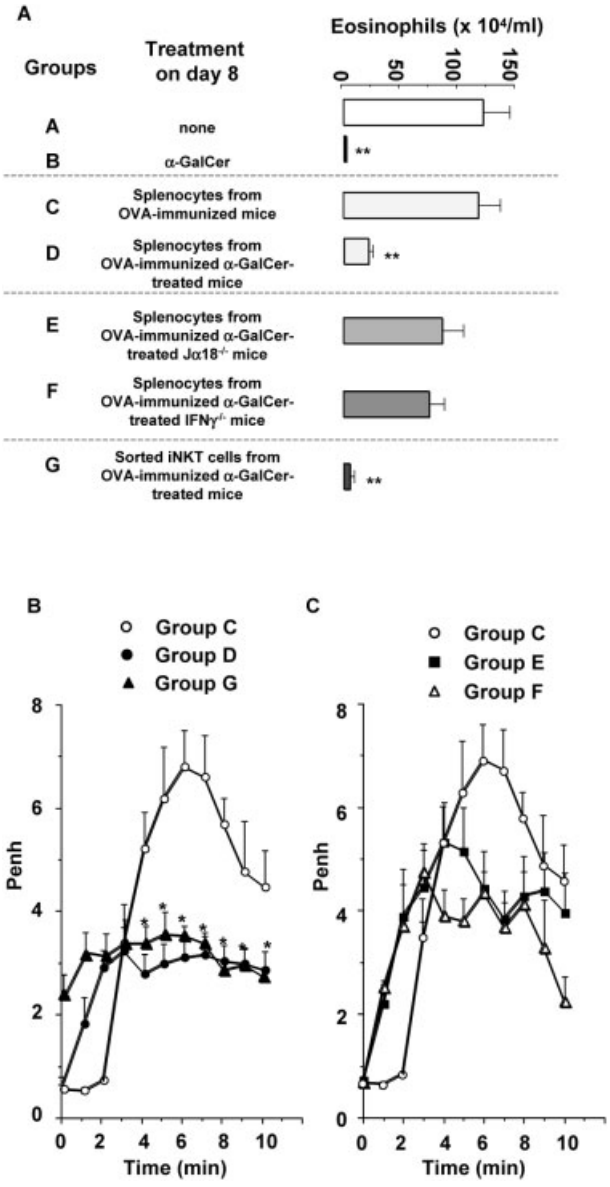


Figure 7. Transfer of iNKT splenocytes from OVA-immunized and α-GalCer-treated mice confers protection of recipient mice. (A) Donor splenocytes were obtained from wild-type (groups C and D), Jα18$^{-/-}$ (group E) or IFN-γ$^{-/-}$ (group F) OVA-immunized mice that were treated (groups D–F) or not (group C) with α-GalCer i.v. These cells were transferred to wild-type OVA-immunized recipients 1 h before the first OVA challenge. Sorted CD1d/α-GalCer tetramer-positive cells from OVA-immunized and α-GalCer i.v. treated mice (group G) were also transferred to recipient OVA-immunized mice1 h before the first OVA challenge. Control mice were likewise sensitized and treated (group B) or not (group A) with α-GalCer and challenged with OVA. Eosinophil numbers in the BALF were measured 24 h after the last challenge. Results represent means ± SEM from five to ten mice. (B, C) Airway responsiveness is reduced after the transfer of cells from α-GalCer-treated mice. Airway reactivity to methacholine was measured 1 day after the last challenge with OVA from mice in (A). Donor splenocytes were obtained from wild-type (empty and filled circles and filled triangles), Jα18$^{-/-}$ (filled squares) or IFN-γ$^{-/-}$ (empty triangles) OVA-immunized mice that had been treated (filled circles, filled and empty triangles and filled squares) or not (empty circles) with α-GalCer i.v. 1 h previously. These cells were transferred to wild-type OVA-immunized recipients 1 h before the first OVA challenge. Sorted CD1d/α-GalCer tetramer-positive cells from OVA-immunized and α-GalCer i.v. treated mice (filled triangle) were also transferred to recipient OVA-immunized mice 1 h before the first OVA challenge. All these mice were challenged with OVA. $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

immune deviation away from the harmful pulmonary Th2 response. We showed that α-GalCer treatment induces a shift in the cytokine production profile of lung iNKT cells by favoring their production of IFN-γ and decreasing their IL-4 secretion following OVA challenge.

Our experiments with adoptive transfer of purified iNKT cells from OVA-immunized and α-GalCer-treated mice reveal that, in addition to shifting the cytokine production profile of lung iNKT cells, α-GalCer treatment can also induce the emergence of protective IFN-γ-producing iNKT cells that inhibit pro-asthmatic Th2 responses. The induction of immunoregulatory IFN-γ-producing iNKT cells is supported by the fact that recipient immunized mice already contain harmful pro-Th2 iNKT cells that are counteracted by the adoptive transfer of small numbers of "protective" iNKT cells obtained from mice immunized and treated with α-GalCer. Further studies are required to determine whether iNKT can directly or indirectly decrease Th2 or increase Th1 anti-OVA-specific immune responses, or even whether they influence other immunoregulatory cells such as CD4^{+}CD25^{+} or dendritic cells that are implicated in controlling asthma severity [30–32].

In summary, we demonstrated that a single i.n. α-GalCer administration abrogates AHR and airway eosinophilia in mice predisposed to be asthmatic. The treatment counteracts the positive influence of iNKT cells on asthma pathology [6, 7] by shifting their cytokine production profile towards a preferential IFN-γ production, and by inducing the emergence of an immunoregulatory IFN-γ-producing iNKT cell population. The effectiveness of this population to inhibit asthma elicitation was confirmed using transfer of small numbers of sorted iNKT cells. Our findings strengthen the potential applicability of α-GalCer treatment, which can inhibit asthma severity in sensitized animals that otherwise mount several hallmarks of the disease. Our results thus raise the possibility that local α-GalCer treatment, acting specifically on iNKT cells, might provide novel therapeutic strategies to reduce allergic asthma.

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Materials and methods

Animals

Male C57BL/6 wild-type, Jα18$^{-/-}$ and IFN-γ$^{-/-}$ (backcrossed at least ten times with C57BL/6 mice) [33, 34] mice at 6–8 wk of age were bred in our own facilities. BALB/c mice were purchased from Janvier (France). All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and pellet food. Animal experiments were performed according to the French institutional committee.

Sensitization and airway challenge

Animals were sensitized by an i.p. injection of 100 μg OVA (Sigma) emulsified in 1.6 mg alum (Merck). After 8 days, mice were exposed to i.n. administered antigen (50 μg/mouse) or sterile saline on three consecutive days (D8, D9 and D10). At 24 h after the last challenge (day 11), airway function was measured as described below, followed by collection of samples for further analyses.

In vivo treatment

In some experiments, OVA-sensitized mice received a single administration of 2 μg α-GalCer (Kirin, Japan) i.v. or i.n. 1 h before the first OVA challenge or 24 h after the first challenge. Control mice received the vehicle (polysorbate-20, 0.5%). In other experiments, OVA-sensitized mice were treated i.p. with 500 μg anti-IFN-γ (clone R4-6A2), anti-IL-4 (clone 11B11), anti-IL-10R (clone 1B1) mAb or control rat IgG (Sigma-Aldrich) at 24 h and 1 h before the α-GalCer or vehicle injection. After 1 h, mice were challenged as described above.

Adoptive cell transfer

Spleen cells were harvested from wild-type or IFN-γ$^{-/-}$ mice previously OVA-sensitized and treated or not with 2 μg α-GalCer i.v. 1 h before. These cells were injected (5×10^6/mouse) i.v. into recipient wild-type OVA-immunized mice on day 8. After 1 h, recipient mice received their first challenge. In some experiments, donor cells were electronically sorted as TCRβ$^+$ CD1d/α-GalCer tetramer$^+$ iNKT cells [35] also from spleens of mice previously OVA-sensitized and treated with 2 μg α-GalCer i.v.

Sorting of iNKT cells

Splenocytes were depleted of CD8$^+$ T cells, CD62L$^+$, and CD19$^+$ B cells after labeling with the corresponding mAb (clone 53.67, clone Mel14, clone 1D3, respectively) using anti-rat Ig-coated magnetic beads (Dynal) [36]. The enriched negatively selected NKT spleen cells were stained with anti-TCRβ antibody and CD1d/α-GalCer tetramers. TCRβ$^+$ CD1d/α-GalCer tetramer$^+$ iNKT cells were sorted using a FACSVantage (BD PharmMingen), and 10 000 purified cells were injected i.v. into immunized recipients. After re-analysis, 99% of the cells were found to be CD1d/α-GalCer tetramer positive.

Determination of AHR

Airway responsiveness was assessed as described [6]. Briefly, 24 h after the last challenge, conscious mice were placed into a whole-body plethysmograph (EMKA technologies, Paris), and 35.5, 75, 150 or 300 mM methacholine (Sigma-Aldrich) was delivered for 60 s. Respiratory parameters were then measured for 10 min. Airflow obstruction was expressed as enhanced pause (Penh) and calculated as: Penh = [Te (expiratory time)/Tr (relaxation time)] – 1 × [Pef (peak expiratory flow)/Pif (peak inspiratory flow)]. The values of Penh expressed per minute were averaged from three determinations recorded every 20 s. The value of the peak Penh is calculated as the mean of three Penh values obtained at 3, 4 and 5 min after methacholine.

Collection and analysis of BALF

Immediately after assessment of AHR, mice were deeply anesthetized by i.p. injection of urethane (15 mg/10 g body weight) (Sigma-Aldrich), blood was collected, and the resulting serum stored. Airways were washed twice with saline, and differential cell counts were determined in BALF after May-Grünwald/Giemsa (Merck) staining of cells on cytospin slides. Per slide, 200 cells were counted. Aliquots of BALF supernatants were stored for cytokine measurement. Cells were stained for flow cytometric analysis.

Histopathologic analysis

Immediately after BALF collection, the lungs were infused with 10% formalin and embedded in paraffin. Lung sections were cut (5 μm thick) and stained with hematoxylin/eosin (HE) for optic microscopy examination.

Lung mononuclear cell preparation

The aorta and the inferior vena cava were sectioned and the lungs were perfused with PBS. The lobes of the lungs were sliced into small cubes and then incubated for 45 min in 2 mL RPMI 1640 solution containing DNase (1 mg/mL) (Roche Diagnostics), collagenase (2 mg/mL) and brefeldine (10 μg/mL) (Sigma-Aldrich). Lung mononuclear cells (MNC) were separated by centrifugation on discontinuous Percoll (Amersham Biosciences) gradients (35%/70%).

Measurement of cytokines and anti-OVA IgE

The levels of IL-4, IL-5 and IFN-γ in BALF and OVA-specific IgE serum levels were assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [6]. OVA-specific IgE levels of samples were related to an internal standard from pooled sera of hyper-immunized BALB/c mice. Data were expressed as IgE index calculated as follows: IgE index = [OD sample – OD buffer only]/[OD positive control – OD buffer only].

Flow cytometry

Splenocytes and lung MNC were pre-incubated with monoclonal antibodies against Fcγ receptor (2.4G2 culture super-

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

natant), washed and incubated with CD1d/α-GalCer tetramer-allophycocyanin or control tetramers, as described [6]. Tetramers were prepared in our laboratory from the mCD1d/mβ2 m expression vector [35]. After washing, cells were further incubated with appropriate dilutions of anti-CD4-PerCP-Cy-5.5 (clone RM4-5) and anti-TCRβ-FITC (clone H57-597) antibodies, all purchased from BD PharMingen. For intracellular staining, cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, washed and permeabilized with 0.5% saponin (Sigma) and further incubated with anti-IL-4-PE, anti-IFN-γ-PE or isotype control antibody (PharMingen). The cells were washed and analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson) using CellQuest software (PharMingen).

Statistical analysis

Nonparametric Mann-Whitney test was used to calculate significance levels for all measurements. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Acknowledgements: This work was supported by institute funds from the CNRS, Université René Descartes – Paris V and from the FRM (Fondation pour la Recherche Médicale) (Equipe FRM/Jeune Investigateur en allergologie) to M.C.L.M. M.L. was supported by ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer).
We are grateful to Elke Schneider (CNRS UMR 8147, Paris) for helpful discussions and critical comments. We are especially indebted to Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd. (Gunma, Japan) for providing α-GalCer, to Masuru Taniguchi for Jα18$^{-/-}$ mice and to Mitchell Kronenberg and P. Van Endert for providing plasmid containing CD1d and β2 m genes and helping with CD1d/α-GalCer tetramer preparation. We are grateful to Corinne Garcia-Cordier and Jérôme Mégret (Necker Institut) for performing cell sortings.

References

1 **Wills-Karp, M.,** Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu. Rev. Immunol.* 1999. **17:** 255–281.

2 **Foster, P. S., Mould, A. W., Yang, M., Mackenzie, J., Mattes, J., Hogan, S. P., Mahalingam, S. *et al.*,** Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol. Rev.* 2001. **179:** 173–181.

3 **Umetsu, D. T., McIntire, J. J., Akbari, O., Macaubas, C. and DeKruyff, R. H.,** Asthma: An epidemic of dysregulated immunity. *Nat. Immunol.* 2002. **3:** 715–720.

4 **Herrick, C. A. and Bottomly, K.,** To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. **3:** 405–412.

5 **Cohn, L., Elias, J. A. and Chupp, G. L.,** Asthma: Mechanisms of disease persistence and progression. *Annu. Rev. Immunol.* 2004. **22:** 789–815.

6 **Lisbonne, M., Diem, S., Castro-Keller, A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J.-M. *et al.*,** Cutting Edge: Invariant Vα14 NKT cells are required for allergen-induced airwway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J. Immunol.* 2003. **171:** 1637–1641.

7 **Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M. *et al.*,** Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 2003. **189:** 553–588.

8 **Araujo, L. M., Lefort, J., Nahori, M. A., Diem, S., Zhu, R., Dy, M., Leite-de-Moraes, M. C. *et al.*,** Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: A critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34:** 327–335.

9 **Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H. and Roark, J. H.,** Mouse CD1-specific NK1 T cells: Development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 1997. **15:** 535–562.

10 **Lisbonne, M. and Leite-de-Moraes, M. C.,** Invariant Vα14 NKT lymphocytes: A double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur. Cytokine Netw.* 2003. **14:** 4–14.

11 **Godfrey, D. I. and Kronenberg, M.,** Going both ways: Immune regulation *via* CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* 2004. **114:** 1379–1388.

12 **Kronenberg, M.,** Toward an understanding of NKT cell biology: Progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. **23:** 877–900.

13 **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H. *et al.*,** CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997. **278:** 1626–1629.

14 **Mendiratta, S. K., Martin, W. D., Hong, S., Boesteanu, A., Joyce, S. and Kaer, L. V.,** CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity* 1997. **6:** 469.

15 **Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C. R., Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y. *et al.*,** Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004. **306:** 1786–1789.

16 **Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M. *et al.*,** Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001. **7:** 1057–1062.

17 **Miyamoto, K., Miyake, S. and Yamamura, T.,** A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001. **413:** 531–534.

18 **Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyparissoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H. and Godfrey, D. I.,** Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002. **99:** 1259–1266.

19 **Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C. C., Wilson, J. M., Schmieg, J., Kronenberg, M., Nakayama, T. *et al.*,** Natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *J. Exp. Med.* 2002. **195:** 617–624.

20 **Fujii, S., Shimizu, K., Kronenberg, M. and Steinman, R. M.,** Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha- galactosylceramide-loaded DCs. *Nat. Immunol.* 2002. **3:** 867–874.

21 **Nieuwenhuis, E. E., Matsumoto, T., Exley, M., Schleipman, R. A., Glickman, J., Bailey, D. T., Corazza, N. *et al.*,** CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat. Med.* 2002. **8:** 588–593.

22 **Kim, J. O., Kim, D. H., Chang, W. S., Hong, C., Park, S. H., Kim, S. and Kang, C. Y.,** Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2004. **114:** 1332–1338.

23 **Ishimitsu, R., Yajima, T., Nishimura, H., Kawauchi, H. and Yoshikai, Y.,** NKT cells are dispensable in the induction of oral tolerance but are indispensable in the abrogation of oral tolerance by prostaglandin E. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33:** 183–193.

24 **Chung, Y., Chang, W. S., Kim, S. and Kang, C. Y.,** NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34:** 2471–2479.

25 **Matsuda, H., Suda, T., Sato, J., Nagata, T., Koide, Y., Chida, K. and Nakamura, H.,** {alpha}-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2005. **31:** 22–31.

26 **Mattner, J., Debord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C. R., Zhou, D., Saint-Mezard, P. *et al.*,** Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 2005. **434:** 525–529.

27 **Leite-de-Moraes, M. C., Lisbonne, M., Arnould, A., Machavoine, F., Herbelin, A., Dy, M. and Schneider, E.,** Ligand-activated natural killer

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

T lymphocytes promptly produce IL-3 and GM-CSF *in vivo*: relevance to peripheral myeloid recruitment. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32:** 1897–1904.

28 **Lack, G., Bradley, K. L., Hamelmann, E., Renz, H., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G. and Gelfand, E. W.,** Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J. Immunol.* 1996. **157:** 1432–1439.

29 **Walter, D. M., Wong, C. P., DeKruyff, R. H., Berry, G. J., Levy, S. and Umetsu, D. T.,** IL-18 gene transfer by adenovirus prevents the development of and reverses established allergen-induced airway hyperreactivity. *J. Immunol.* 2001. **166:** 6392–6398.

30 **Stock, P., Akbari, O., Berry, G., Freeman, G. J., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T.,** Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat. Immunol.* 2004. **5:** 1149–1156.

31 **Kuipers, H. and Lambrecht, B. N.,** The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 2004. **16:** 702–708.

32 **Hawrylowicz, C. M. and O'Garra, A.,** Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 2005. **5:** 271–283.

33 **Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y. *et al.*,** Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997. **278:** 1623–1626.

34 **Wang, Z. E., Reiner, S. L., Zheng, S., Dalton, D. K. and Locksley, R. M.,** $CD4^+$ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 1994. **179:** 1367–1371.

35 **Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y. and Kronenberg, M.,** Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 2000. **192:** 741–754.

36 **Lisbonne, M., Hachem, P., Tonanny, M. B., Fourneau, J.-M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Endert, P. V. *et al.*,** *In vivo* activation of invariant Vα14 natural killer T cells by α-GalCer sequentially induces fas-dependent and -independent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34:** 1381–1388.

© 2005 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

RESULTATS NON PUBLIES

Effet de l'α-GalCer dans un modèle d'asthme chronique.

Il était important pour nous de vérifier l'effet de l'α-GalCer dans un modèle d'asthme chronique. L'HRB est une caractéristique importante de l'asthme allergique, cependant, au cours du temps, un remodelage pulmonaire définitif vient exacerber l'HRB et en conséquence la sévérité de l'asthme chronique. Les modifications structurales bronchiques survenues chez les patients asthmatiques en réponse à une inflammation persistante incluent une hyperplasie et une hypertrophie du muscle lisse bronchique, une fibrose sous épithéliale, une hyperproduction de mucus et une desquamation épithéliale. Au niveau murin, plusieurs groupes ont essayé divers protocoles pour pouvoir mimer ces changements pulmonaires avec plus ou moins de succès. Nous avons utilisé un protocole d'asthme chronique et analysé l'effet du traitement par l'α-GalCer sur la sévérité de la maladie.

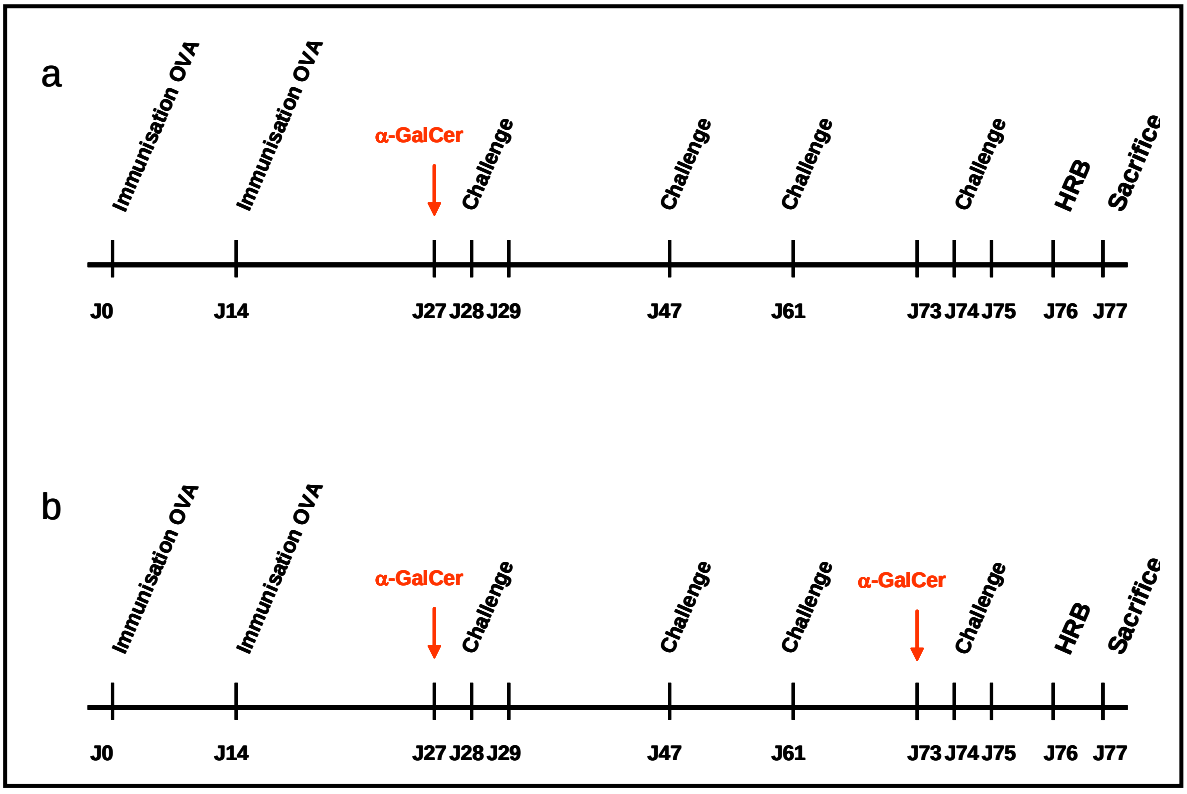
Protocole utilisé :

Des souris BALB/c mâles de 8 semaines d'âges sont immunisées à J0 et J14 par 100µg d'OVA plus l'alum en i.p. Ces souris sont exposées plusieurs fois, durant les soixante jours suivants (J27, J28, J29, J47, J61, J73, J74, J75) à 50mg/ml d'OVA ou de NaCl pour le groupe témoin pendant 20 minutes, grâce à un nébuliseur. Dans un groupe, 2µg d'α-GalCer sont injectés en i.v. 1h avant le premier challenge (J27) (**Figure 1a**). Dans

un autre, 2µg d'α-GalCer sont injectés en i.v. 1h avant le premier challenge (J27) et une deuxième dose 1h avant le sixième challenge (J73) (**Figure 1b**).

Vingt-quatre heures après le dernier challenge (J76), l'HRB est mesurée. Ensuite, à J77 les souris sont sacrifiées pour déterminer les différentes composantes de l'asthme, l'inflammation éosinophilique pulmonaire et les cytokines présentes dans le LLBA. Des coupes de poumons sont réalisées pour visualiser l'infiltration éosinophilique, l'épaisseur de la paroi du muscle lisse, la déposition du collagène, et les cellules productrices de mucus qui caractérisent les composantes de l'asthme chronique.

Figure 1 : Protocole utilisé



Résultats :

<u>L'hyperréactivité broncho-pulmonaire est réduite chez les souris ayant reçues une ou deux doses d'α-GalCer dans le modèle d'asthme chronique.</u> L'hyperréactivité broncho-pulmonaire (HRB) est l'un des symptômes les plus importants de l'asthme. L'HRB est observée chez les souris qui ont reçu immunisation et challenge avec l'OVA (**figure 2**). Nos résultats montrent clairement que les souris recevant l'α-GalCer, une seule fois au début du protocole (J27), ou deux fois au début (J27) et à la fin du protocole (J73) développent une HRB significativement diminuée par rapport aux souris contrôles (**figure 2**).

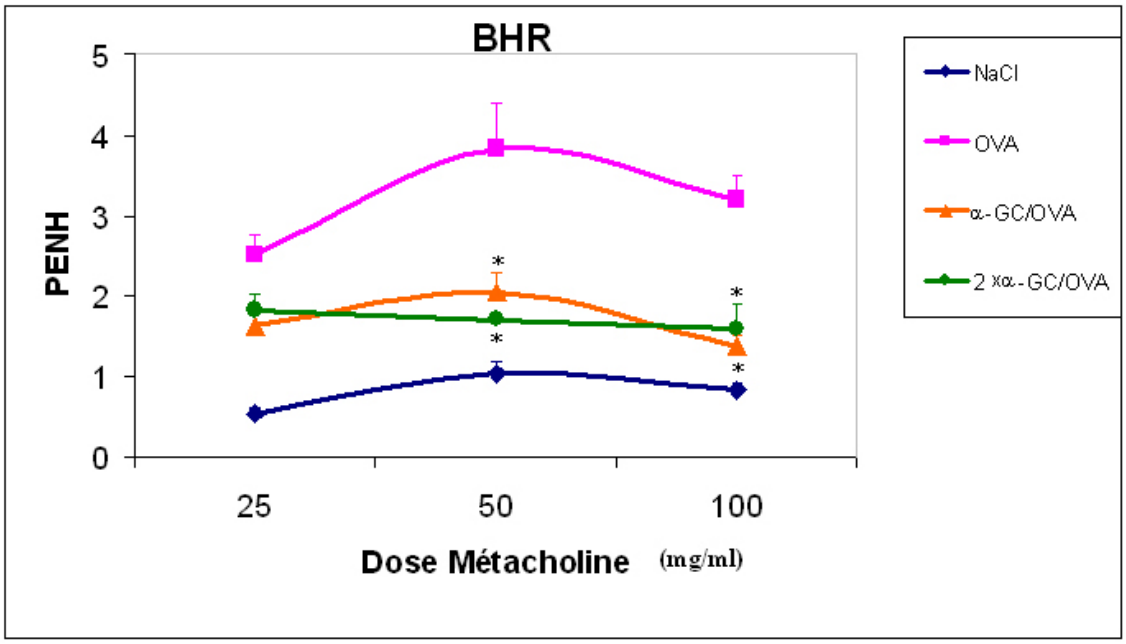


Figure 2 : Diminution de l'HRB chez les souris traitées par l'α-GalCer. L'HRB en réponse à la métacholine est mesurée 24h après le dernier challenge (J76) par l'OVA (carré, triangle et cercle) ou le NaCl (losange) chez les souris contrôles (carré) ou celles ayant reçues une dose d'α-GalCer (αGC/OVA) (triangle) ou deux doses d'α-GalCer (2x αGC/OVA) (cercle). Le graphe représente la moyenne +/- l'écart type, de 6 à 8 souris. *$p < 0,05$.

Le traitement par l'α-GalCer diminue l'éosinophilie. Le nombre total de cellules ainsi que le nombre de diverses populations cellulaires présentes dans le LLBA de souris traitées ou pas par l'α-GalCer sont déterminées à J77. L'injection de l'α-GalCer avant le premier challenge (J27) a diminué significativement le nombre total des cellules dans le LLBA (**Figure 3**). Cette diminution est plus prononcée lorsque les souris reçoivent 2 injections d'α-GalCer (J27 et J73) comparés aux souris contrôles.

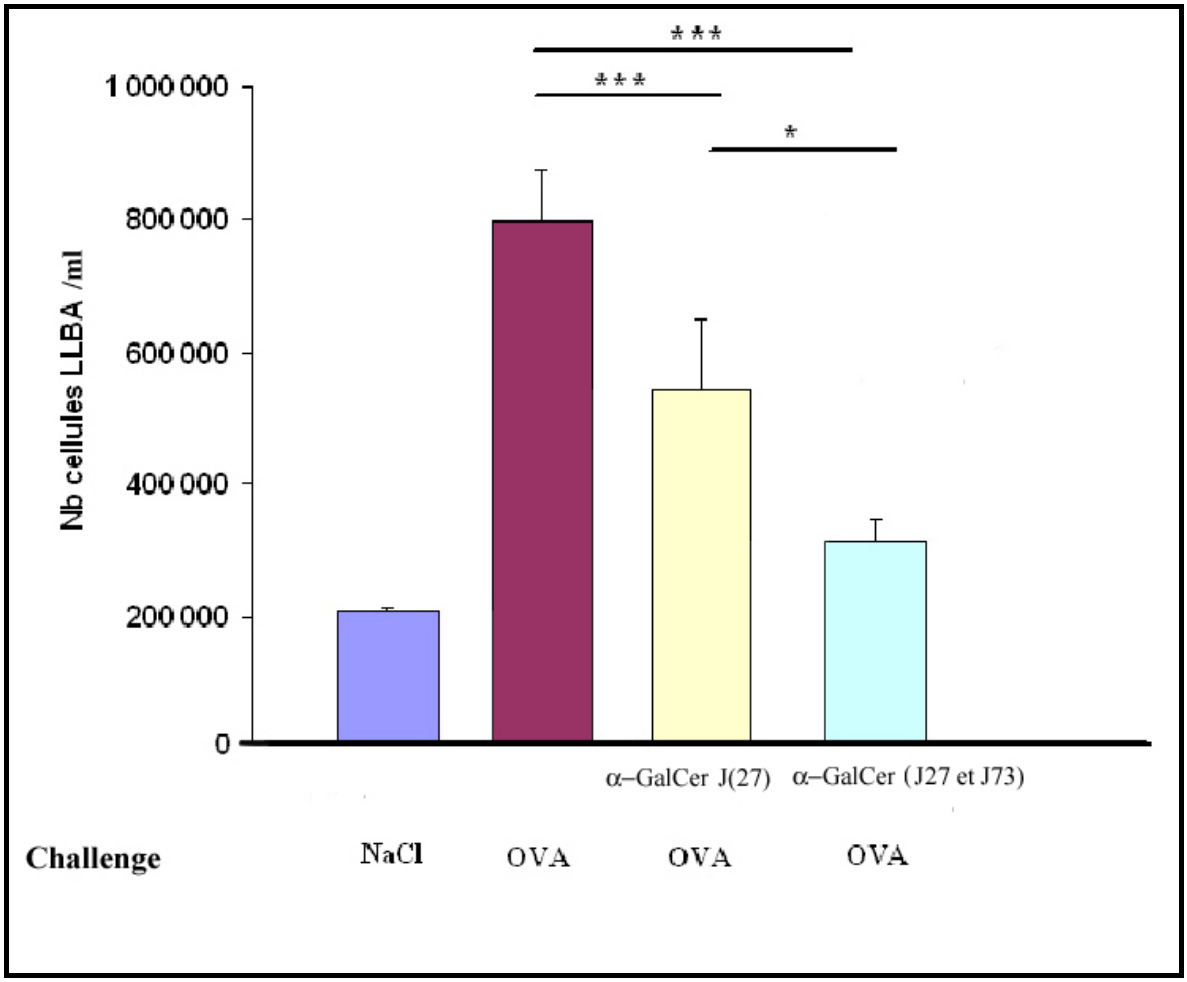


Figure 3: Diminution du nombre de cellules dans le LLBA chez les souris traitées par l'α-GalCer. L'injection d'α-GalCer a été réalisée 1h avant le premier challenge (J27) ou 1h avant le premier et le sixième challenge (J27 et J73). Toutes les souris ont reçu 2 immunisations d'OVA, suivis de plusieurs provocations avec l'OVA ou le NaCl. Le LLBA est récupéré 48h (J77) après le dernier challenge. Les résultats représentent la moyenne +/- l'écart type de 6 à 8 souris. *$p < 0,05$; **$p < 0,005$.

Le nombre des éosinophiles (**Figure 4**) est diminué de 50% chez le groupe traité par l'α-GalCer 1h avant le premier challenge. L'effet de l'α-GalCer est plus prononcé lorsqu'il est injecté 1h avant le premier et le sixième challenge par l'OVA comparé aux souris non traitées. Nous ne retrouvons pas de différences significatives pour les autres types cellulaires présents dans le LLBA (résultats non montrés).

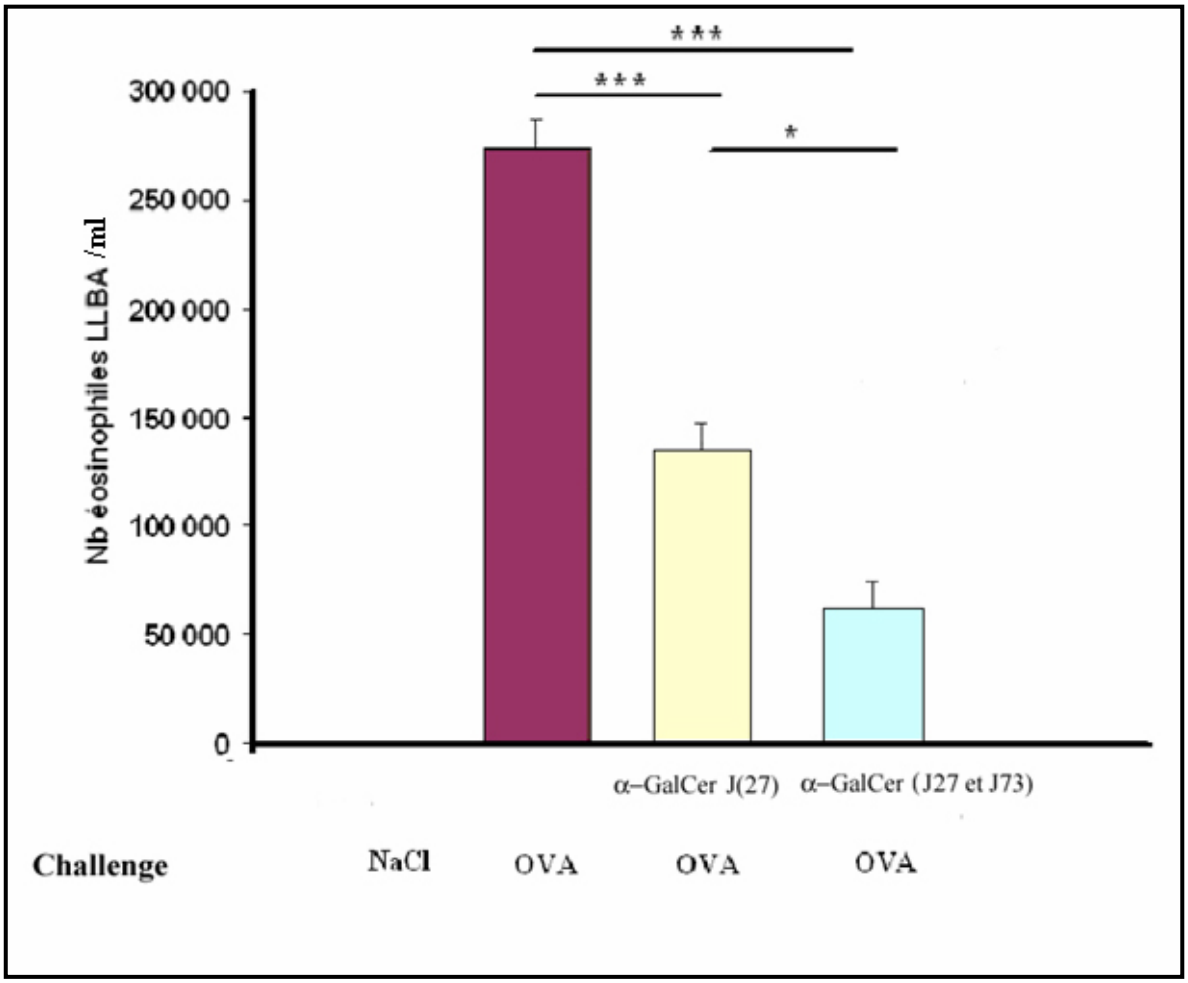


Figure 4 : Diminution du nombre des éosinophiles dans les poumons des souris traitées par l'α-GalCer. Les souris sont traitées par l'α-GalCer, comme décrit auparavant. Le LLBA est récupéré 48h après le dernier challenge et le nombre des éosinophiles a été déterminé. Les résultats représentent la moyenne +/- l'écart type, de 6 à 8 souris. *$p < 0,05$; ***$p < 0,001$.

L'analyse histologique des coupes des poumons des quatre groupes de souris n'a pas mis en évidence de différences significatives au niveau de l'infiltration éosinophilique (visualisée par une coloration Hématoxyline et éosine), du dépôt de collagène (coloration « Masson's Trichrome »), ni au niveau du nombre des cellules productrices de mucus (coloration de bleu d'alcian) (résultats non montrés).

En conclusion, nos résultats montrent que l'α-GalCer a un effet protecteur efficace dans un protocole chronique d'asthme allergique puisque les composantes de la maladie comme l'HRB et l'inflammation éosinophilique sont diminués chez les souris traitées. Notre protocole n'a pas permis d'effectuer une étude adéquate du remodelage pulmonaire. Ainsi, d'autres protocoles seront utilisés dans le futur afin de déterminer si l'α-GalCer peut inhiber le remodelage.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats montrent clairement que les cellules iNKT sont requises pour déterminer la sévérité des symptômes caractéristiques de l'asthme allergique expérimental, notamment l'inflammation pulmonaire, la production de cytokines de type Th2 et la sécrétion d'IgE spécifiques de l'allergène qui aboutiront à l'induction de l'HRB (Lisbonne et al., 2003).

Nous avons utilisé un protocole dans lequel toutes les souris sont d'abord immunisées de façon systémique, puis par voie aérienne (« challenge ») avec l'antigène OVA. Ce protocole induit les principaux symptômes de l'asthme, notamment l'inflammation pulmonaire de type Th2 et l'HRB, très exacerbées chez les souris sauvages par rapport aux souris Jα18$^{-/-}$ (déficientes en cellules iNKT). Afin de confirmer l'implication de cellules iNKT dans la sévérité de la maladie, nous avons effectué le transfert adoptif de cellules iNKT à des souris receveuses avant le premier challenge par l'OVA. Ce transfert a été suffisant pour restaurer la capacité des souris Jα18$^{-/-}$ à développer l'inflammation éosinophilique, l'HRB, la production de cytokines et la production d'IgE spécifiques de l'OVA (Lisbonne et al., 2003).

Sachant que les souris Jα18$^{-/-}$ présentent une diminution significative des symptômes de l'asthme qui résultent d'une réponse immune de type Th2, il était important de déterminer si ces animaux étaient capables de développer ce type de réponse. Afin de répondre à cette question, nous avons utilisé un protocole consistant en trois immunisations systémiques d'OVA à fortes doses, et nous avons démontré que les souris Jα18$^{-/-}$, de façon identique aux souris sauvages, développent une réponse immune de type Th2, caractérisée dans ce protocole par la production d'IgE anti-OVA (données du laboratoire). Ces résultats sont en accord avec des travaux montrant que les souris Jα18$^{-/-}$ n'ont pas de défaut de

production d'IgE après immunisation par l'OVA (Cui et al., 1999). De même, ces souris déficientes en cellules iNKT produisent des quantités normales d'IL-4 et d'IL-13 en réponse à une immunisation sous-cutanée d'OVA (Akbari et al., 2003), confirmant ainsi que les souris Jα18$^{-/-}$ ont la capacité d'établir des réponses immunes de type Th2.

Nos résultats diffèrent de ceux d'une étude précédente qui utilise des souris CD1d$^{-/-}$ déficientes en cellules iNKT (de type I), mais aussi en cellules vNKT (de type II) (Korsgren et al., 1999). Ces travaux montrent que le taux d'IgE spécifique de l'allergène ainsi que l'inflammation éosinophilique ne sont pas différents chez les souris CD1d$^{-/-}$ comparées aux souris sauvages. Cette divergence observée entre cette étude et la nôtre peut être expliquée par l'utilisation de protocoles différents (deux challenges et plusieurs challenges respectivement dans notre protocole et dans celui utilisé par l'autre groupe), le moment du sacrifice, ainsi que la différence génétique des souches murines utilisées. Dans notre étude, nous avons utilisé des souris Jα18$^{-/-}$ sur fond génétique C57BL/6, alors que l'autre équipe a utilisé pour les souris CD1d$^{-/-}$ le fond génétique hétérogène 129/Sv x C57BL/6. Il est improbable que la mutation CD1d$^{-/-}$ versus Jα18$^{-/-}$ soit responsable de cette différence puisque nous avons également testé des souris CD1d$^{-/-}$ sur fond génétique C57BL/6 qui présentent la même déficience pour le développement des composantes de l'asthme que les souris Jα18$^{-/-}$ (résultats non montrés).

En outre, nos résultats sont en accord avec les travaux d'Akbari et al., montrant que les souris Jα18$^{-/-}$ ainsi que les souris CD1d$^{-/-}$, sur fond génétique BALB/c, développent de façon diminuée une HRB, une inflammation éosinophilique, une production cytokinique de type Th2 et une sécrétion d'IgE par rapport aux souris sauvages (Akbari et al., 2003).

Tous ces résultats montrent clairement que les cellules iNKT jouent un rôle critique dans la sévérité de l'asthme allergique expérimental.

Les cellules iNKT sont présentes dans les poumons des souris traitées par l'OVA et sont activées, comme le montre l'augmentation de l'expression de la molécule d'activation CD69. L'implication des cellules iNKT dans ce modèle est dépendante de l'interaction entre le TCR de ces cellules et la molécule CD1d, puisque nous avons montré que l'injection d'anticorps anti-CD1d bloquants inhibe le développement de l'asthme chez les souris sauvages. Il est probable que la molécule CD1d présente un ligand endogène puisque tous nos efforts pour stimuler les lymphocytes iNKT avec l'OVA ont échoué (données du laboratoire). Il est possible qu'une expression augmentée d'un (des) glycolipide(s) endogène(s), comme l'iGb3, associée à un environnement pro-Th2 dans le modèle d'asthme, puisse accroître la capacité des cellules iNKT à produire des cytokines de type Th2 exacerbant l'inflammation pulmonaire. Ce ligand naturel serait potentiellement moins puissant que l'α-GalCer, comme c'est le cas de l'iGb3 (Zhou et al., 2004), mais il pourrait stimuler plusieurs fois les cellules iNKT tout au long du protocole, résultant ainsi dans la sécrétion préférentielle de cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13) par les cellules iNKT. En effet, l'exacerbation de l'inflammation serait due à la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 par les cellules iNKT, puisque le transfert de cellules iNKT en provenance de souris déficientes en IL-4 ou IL-13 ne restaure pas l'HRB chez les souris Jα18$^{-/-}$ (Akbari et al., 2003). Des études complémentaires seront nécessaires pour confirmer si l'iGb3 et/ou d'autres glycolipides endogènes, jouent un rôle dans l'activation des cellules iNKT dans l'asthme allergique expérimental.

Différents travaux ont démontré que les cellules iNKT stimulées par l'α-GalCer favorisent des réponses immunes protectrices dans certaines maladies autoimmunes expérimentales ou dans certaines tumeurs (Lisbonne et Leite-de-Moraes, 2003). En nous appuyant sur ces résultats, nous avons analysé dans la seconde partie de notre étude, l'influence de l'injection d'α-GalCer, ligand capable d'activer spécifiquement et massivement les cellules iNKT, sur le développement de l'asthme allergique.

Une seule dose systémique (i.v.) d'α-GalCer, une heure avant le premier challenge, administrée aux souris immunisées par l'OVA, est capable de diminuer les composantes de l'asthme allergique expérimental comme décrit ci-dessus (Hachem et al., 2005). L'administration locale (i.n.) d'α-GalCer est également efficace pour diminuer les composantes de la maladie asthmatique. Ce mode d'administration de l'α-GalCer est intéressant sur le plan thérapeutique puisque ce traitement garde son efficacité même lorsqu'il est administré avant le deuxième challenge. Nos résultats sont en accord avec des travaux de deux autres équipes montrant que l'α-GalCer injecté avant le premier challenge, respectivement par voie i.p. (Matsuda et al., 2005) ou s.c. (Morishima et al., 2005), induit également la diminution des composantes de l'asthme allergique.

Les cellules iNKT produisent de grandes quantités d'IL-4 et d'IFN-γ après stimulation par l'α-GalCer. Pourtant, la production d'IL-4 est très rapide puisqu'elle est détectée dans le sérum 2 à 4 heures après l'injection d'α-GalCer, mais cette production est transitoire, alors que le pic d'IFN-γ est atteint au bout de 24h (Leite-de-Moraes et al., 2002). Ce pic plus tardif est expliqué par la production d'IFN-γ par les cellules NK qui ont été activées secondairement par les cellules iNKT (Carnaud et al., 1999). Ainsi, la production d'IFN-γ par les cellules iNKT induite par le traitement par l'α-GalCer pourrait

activer secondairement les cellules NK qui prendront le relais pour la sécrétion de cette cytokine.

Nous avons observé une augmentation du nombre des cellules NK dans le LLBA chez les souris asthmatiques injectées par l'α-GalCer par rapport aux souris non traitées (résultats non montrés). En accord avec ces résultats, une autre étude a montré que les cellules NK sont augmentées dans les poumons des souris traitées par l'α-GalCer et que la proportion de ces cellules sécrétant l'IFN-γ augmente par rapport à celle des souris n'ayant pas reçu de l'α-GalCer (Morishima et al., 2005). Ces résultats suggèrent l'implication de l'IFN-γ et potentiellement des cellules NK dans l'effet protecteur du traitement par l'α-GalCer.

En effet, nos résultats montrent que l'induction de la protection par l'α-GalCer est dépendante de l'IFN-γ, puisque l'injection d'anticorps anti-IFN-γ, bloque cet effet protecteur et que le transfert des splénocytes de souris IFN-$\gamma^{-/-}$ traitées par l'α-GalCer n'est pas capable d'induire une protection chez les souris receveuses. Des travaux montrent que le traitement par l'IFN-γ peut diminuer la sévérité de l'asthme allergique, en inhibant la sécrétion des IgE spécifiques d'OVA (Lack et al., 1996). L'induction de l'IFN-γ conduit à la diminution de la production d'IL-4, de l'inflammation pulmonaire, de la sécrétion de mucus et du développement de l'HRB dans un modèle d'asthme allergique (Walter et al., 2001b). Cette diminution de la réponse Th2 est démontrée de même par l'injection locale d'IFN-γ dans les poumons (Nakajima et al., 1993).

Ces résultats suggèrent que les souris déficientes en IFN-γ développeraient un asthme allergique exacerbé. Cependant, ce n'est pas le cas puisque les souris déficientes en

IFN-γ développent un asthme allergique expérimental diminué (Matsuda et al., 2005). Ceci peut être expliqué par le fait que les macrophages des souris IFN-$\gamma^{-/-}$ expriment moins de molécules du CMH de classe II à leur surface (Dalton et al., 1993). Il est donc possible que la présentation d'antigène par les CPA soit de ce fait moins efficace dans une réaction allergique plus faible.

Une étude récente utilisant des souris déficientes en IFN-γ mais exprimant cette cytokine dans les poumons, montre que l'IFN-γ local diminue l'IL-4, la sécrétion des IgE et le développement de l'HRB. Par contre, il augmente les éosinophiles, l'IL-5 et l'IL-13 dans les poumons de souris immunisées et provoquées par l'OVA (Koch et al., 2006). Ainsi le rôle de l'IFN-γ n'est pas très clair dans la maladie asthmatique toutefois nos expériences utilisant le transfert adoptif des cellules iNKT purifiées en provenance de souris immunisées par l'OVA et traitées par l'α-GalCer, montrent que le traitement par l'α-GalCer peut induire l'émergence de cellules iNKT productrices d'IFN-γ et protectrices qui inhibent la réponse Th2 pro-asthmatique. Il est intéressant de souligner que dans notre modèle, la souris receveuse est sauvage, donc apte à produire de l'IFN-γ et avec des CPA tout à fait fonctionnelles. En conséquence, avec le transfert adoptif, nous montrons clairement que c'est l'IFN-γ produit par les cellules iNKT, en réponse à l'α-GalCer, qui est le facteur primordial dans la protection obtenue par ce traitement.

L'IL-17, cytokine sécrétée par les lymphocytes T CD4+, contribue au processus inflammatoire observé dans différentes maladies. Cette cytokine induit la production d'IL-6 et d'IL-8, deux cytokines impliquées dans l'inflammation pulmonaire, par les cellules épithéliales bronchiques (Kawaguchi et al., 2001). L'IL-8 a été retrouvée en quantité élevée dans le LLBA de patients asthmatiques (Norzila et al., 2000), et son administration

induit une HRB dans un modèle expérimental chez le cochon d'Inde (Fujimura et al., 1998). L'IL-6 a aussi été impliquée dans l'inflammation asthmatique puisqu'elle est capable d'induire la polarisation des cellules T naives vers Th2 (Rincon et al., 1997).

Il a été démontré que l'IFN-γ inhibait le développement des cellules T effectrices de type Th17, productrices d'IL-17 (Harrington et al., 2005). Dans notre modèle d'asthme, nous avons démontré que la protection induite par le traitement par l'α-GalCer dépend de l'IFN-γ. Ainsi, il est possible que l'IFN-γ produit par les cellules iNKT puisse inhiber la production d'IL-17 et, par conséquent, la cascade des cytokines inflammatoires. Une autre cytokine de la famille de l'IL-17, l'IL-17E ou l'IL-25 (Lee et al., 2001), jouerait également un rôle dans l'asthme allergique puisque cette cytokine agit sur le recrutement des éosinophiles et peut induire l'HRB quand administrée en i.n. (Hurst et al., 2002). Afin de tester ces hypothèses, le dosage d'IL-17 et d'IL-25 sera effectué dans le LLBA des souris asthmatiques traitées ou pas par l'α-GalCer.

L'injection d'α-GalCer, qui affecte la voie cytokinique en diminuant la sécrétion des interleukines pro-Th2, altère l'équilibre Th1/Th2 dans les poumons de souris asthmatiques. Mais, existerait-il aussi d'autres mécanismes pouvant expliquer cette diminution de l'inflammation éosinophilique pulmonaire?

La molécule d'adhésion endothéliale VCAM-1 a été décrite comme une molécule importante pour l'attachement et le roulement des éosinophiles vers les poumons (Patel et al., 1998). Les éosinophiles expriment la molécule VLA-4 qui se lie à la molécule VCAM-1 (Kudlacz et al., 2002). L'importance de cette interaction pour le bon cheminement des éosinophiles vers les poumons a été démontrée grâce à des études montrant que le blocage de VCAM-1/VLA-4 inhibe l'infiltration éosinophilique dans les poumons de souris

soumises à un protocole d'asthme allergique induit par l'OVA (Sagara et al., 1997). Il a été décrit que les fibroblastes pulmonaires humains expriment VCAM-1 en réponse à l'IL-4 (Spoelstra et al., 1999). Une étude récente, montre qu'en fait l'injection de l'α-GalCer diminue l'expression de VCAM-1 dans les poumons des souris asthmatiques (Morishima et al., 2005). Cette diminution de l'expression de VCAM-1 serait-elle due à la diminution de l'IL-4 retrouvée après traitement par l'α-GalCer? Ceci peut suggérer que l'IL-4 produite par les cellules iNKT chez les souris non traitées pourrait jouer un rôle primordial dans l'expression de VCAM-1 et donc dans le recrutement des éosinophiles. Puisque l'α-GalCer favorise la production d'IFN-γ en détriment de la production d'IL-4 par les cellules iNKT pulmonaires, la balance IL-4/IFN-γ est modifiée et le manque d'IL-4 pourrait expliquer la diminution de l'expression de VCAM-1 et par conséquent des éosinophiles dans les poumons.

Il est intéressant de noter que d'autres études ont montré que l'administration d'α-GalCer comme adjuvant, effectuée simultanément à l'immunisation par l'OVA en i.n., accroît la sévérité de l'asthme allergique en augmentant la réponse Th2 dans les poumons (Kim et al., 2004). Le fait d'administrer l'α-GalCer au moment de l'immunisation augmente les composantes de l'asthme. Récemment, Morishima et al., ont montré que la diffusion continue de l'α-GalCer durant la période d'immunisation, est capable d'augmenter l'inflammation éosinophilique chez les souris traitées (Morishima et al., 2005). Nous avons également montré qu'une seule injection d'α-GalCer administrée systémiquement avant l'immunisation est capable d'augmenter les composantes de l'asthme allergique expérimental chez les souris traitées, notamment le recrutement d'éosinophiles et macrophages dans le LLBA des souris traitées (résultats non publiés).

Dans un modèle de tolérance, il a été également démontré que l'α-GalCer pourrait favoriser le développement de l'asthme. En effet, l'injection d'OVA en i.n., trois jours de suite, conduit à une tolérance contre le challenge avec le même antigène. Dans ce modèle, il a été démontré que la co-administration d'α-GalCer et d'OVA, inhibe cette tolérance et augmente les composantes de l'asthme (Kim et al., 2004). Les mécanismes impliqués ne sont pas encore connu, mais il a été mis en évidence que le traitement par l'α-GalCer pouvait bloquer l'induction de la tolérance, soit par des mécanismes liés à la sécrétion d'IL-4 (Ishimitsu et al., 2003), soit par la maturation des cellules dendritiques (Chung et al., 2004), quand il est co-administré avec l'antigène.

Une étude récente montre que l'injection locale d'α-GalCer ou de PBS-30 (glycolipide de sphingomonas, ligand des cellules iNKT) à des souris naïves, induit l'HRB (Meyer et al., 2006). Toutefois, le traitement par deux doses d'α-GalCer provoque une diminution de l'HRB, suggérant que les cellules iNKT, activées une première fois induiront l'HRB mais, stimulées deux fois de suite, deviendraient insensibles ou potentiellement « anergiques » et par conséquent incapables d'induire l'HRB.

Ces résultats concernant l'effet contradictoire de l'α-GalCer fournissent des données intrigantes sur les fonctions stimulatrices ou inhibitrices de ce glycolipide dans le modèle d'asthme induit par l'OVA. Alors que son injection avant l'immunisation, induit une augmentation de l'inflammation éosinophilique, son administration au moment de la provocation conduit à la diminution de l'expression de la maladie. Ce type de résultat n'est pas étonnant puisque d'une part il a été démontré que l'activation des cellules iNKT par l'α-GalCer induit la génération de cellules de type Th2 ainsi qu'une augmentation des quantités d'IgE dans le sérum (Singh et al., 1999) et d'autre part que l'activation des

cellules iNKT par l'α-GalCer inhibe la production des IgE in vivo et la différentiation des cellules Th2 in vitro (Cui et al., 1999). L'administration de l'α-GalCer induit une sécrétion d'IFN-γ alors que l'injection répétée de ce même glycolipide induirait une réponse Th2 (Burdin et al., 1999).

Les cellules iNKT répondent différemment à la suite de leur activation par différents ligands. En effet, l'OCH induira une sécrétion préférentielle d'IL-4 par ces cellules alors que l'α-C-GalCer favorisera la production d'IFN-γ. Par conséquent, le ligand, endogène ou exogène, capable d'activer ces cellules, pourrait potentiellement polariser la production de cytokines par les cellules iNKT et la réponse immune. De plus, nous avons également démontré que l'environnement joue un rôle important dans le profil de cytokines produites par les cellules iNKT (Leite-de-Moraes et al., 1997, 1998, 1999, 2001). Il sera donc important, non seulement de déterminer la nature des ligands capables de stimuler les cellules iNKT, mais aussi les facteurs présents dans leur microenvironnement susceptibles d'influencer leur profil de cytokines.

Ces observations, ainsi que nos résultats, montrent que le moment du traitement, la dose, la fréquence et le mode d'administration de l'α-GalCer, peuvent avoir un rôle majeur dans la détermination de l'orientation de la réponse immune vers un profil pro-Th1 ou pro-Th2. Néanmoins, nos résultats montrent que les cellules iNKT sont requises pour amplifier les composantes de l'asthme allergique expérimental et qu'une seule administration d'α-GalCer avant le challenge est suffisante pour neutraliser l'effet préjudiciable des cellules iNKT dans le modèle d'asthme allergique.

Depuis quelques années, un grand intérêt a été accordé aux cellules T régulatrices qui peuvent contrôler le développement de certaines pathologies et pourraient jouer un rôle critique dans le contrôle de la maladie asthmatique. Ces cellules seraient-elles impliquées dans la protection obtenue après traitement par l'α-GalCer? Ces cellules T $CD4^+CD25^+$ ou Treg ont été décrites comme protectrices grâce à leur sécrétion de TGF-β (Hansen et al., 2000) ou d'IL-10 (Oh et al., 2002). Elles peuvent activer la production d'IL-10, importante pour l'inhibition de la maladie asthmatique, par les cellules T $CD4^+$ (Kearley et al., 2005). Les cellules iNKT activées par l'α-GalCer, peuvent induire la prolifération des cellules T $CD4^+CD25^+$ chez l'homme (Jiang et al., 2005) et la souris (Liu et al., 2005) via leur production d'IL-2. Pour pouvoir répondre à cette question, il serait intéressant d'analyser, dans notre modèle d'asthme allergique, si les cellules iNKT sécrètent de l'IL-2 capable d'activer les cellules $CD4^+CD25^+$ qui pourraient jouer un rôle dans la protection obtenue par le traitement avec l'α-GalCer.

Les cellules Treg induisent un effet protecteur en diminuant l'activité des cellules dendritiques pulmonaires (diminution de l'expression de CD80 et CD86 et des molécules de classe II), inhibant la prolifération des cellules T effectrices et la production des cytokines de type Th2 (Lewkowich et al., 2005). L'implication des cellules dendritiques a été décrite dans différents travaux sur l'asthme allergique expérimental. Bien que les cellules dendritiques myéloïdes aient été impliquées dans la sévérité de la maladie (Van Rijt et al., 2005), les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) ont été décrites comme protectrices. En effet, il a été montré récemment que le transfert adoptif des cellules pDC couplées à l'OVA peut inhiber les composantes de l'asthme allergique en agissant sur l'activation de cellules T régulatrices (De Heer et al., 2004). D'autres études montrent que les cellules dendritiques pulmonaires secrètent de l'IL10, cytokine immunorégulatrice

induisant la formation de cellules T régulatrices exprimant Foxp3 et GATA-3, et capables d'inhiber des réponses effectrices inflammatoires (Stock et al., 2004). La production d'IL-10 par ces cellules dendritiques stimule le développement des cellules T régulatrices qui à leur tour sécrètent cette cytokine. Cette activation induit une tolérance à l'OVA dans un modèle murin (Akbari et al., 2001).

Nous avons tenté de reproduire chez la souris le remodelage pulmonaire survenant chez l'homme dans la maladie asthmatique. Cependant, le protocole utilisé n'était pas adéquat pour provoquer ce remodelage. De plus, les taux des différentes cytokines dosées dans le LLBA n'étaient pas modifiés dans les différents groupes. Il se peut que le moment du sacrifice des souris ne corresponde pas aux pics de sécrétions des cytokines de type Th2. Un nouveau protocole sera mis au point afin de tenter d'induire le remodelage pulmonaire chez la souris.

Néanmoins, avec ce protocole qui a duré 3 mois, nous avons montré de façon surprenante, que l'α-GalCer est efficace pour diminuer l'inflammation pulmonaire et l'HRB. L'α-GalCer a un effet protecteur prolongé puisque son injection (suivie de plusieurs challenges par l'OVA), deux mois avant le test de l'HRB, provoque une diminution de cette composante de l'asthme chez les souris asthmatiques traitées.

Tout récemment il a été démontré dans notre laboratoire et dans deux autres équipes, que les cellules iNKT étaient augmentées dans les poumons des enfants et adultes asthmatiques (Pham Thi et al., 2005 ; Akbari et al., 2006 ; Sen et al., 2005). Ces résultats sont encore descriptifs, mais renforcent l'idée que les cellules iNKT sont impliquées dans la sévérité de l'asthme chez l'homme.

En conclusion, nos résultats démontrent que les cellules iNKT sont impliquées dans la sévérité de l'asthme allergique expérimental et que le traitement par l'α-GalCer, qui agit spécifiquement sur les lymphocytes iNKT, inhibe le développement de la maladie même chez les animaux précédemment immunisés. De plus, nos résultats fournissent de nouvelles connaissances et potentiellement une nouvelle voie thérapeutique pour l'utilisation de l'α-GalCer dans l'asthme allergique, puisque nous avons démontré que l'α-GalCer peut agir localement (en i.n) et dans un protocole où la maladie a déjà été déclanchée (injection d'α-GalCer 24h après le premier challenge) (Hachem et al., 2005). Ce mode d'administration local favoriserait l'utilisation thérapeutique de l'α-GalCer dans la maladie asthmatique. L'effet protecteur est d'autant plus intéressant qu'il pourrait avoir une action curative plutôt que préventive.

ANNEXE

In vivo activation of invariant Vα14 natural killer T cells by α-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity

Mariette Lisbonne[1], Patricia Hachem[1], Marie-Béatrice Tonanny[1], Jean-Marie Fourneau[2], Stephane Sidobre[3], Mitchel Kronenberg[3], Peter Van Endert[2], Michel Dy[1], Elke Schneider[1] and Maria C. Leite-de-Moraes[1]

[1] CNRS UMR 8147, Paris V, Institut de Recherche Necker Enfants Malades, Paris, France
[2] INSERM U580 Hôpital Necker, Paris, France
[3] La Jolla Intitute for Allergy and Immunology, San Diego, USA

The present study was designed to clarify the cytotoxic capacities of invariant Vα14 natural killer T (iNKT) cells activated *in vivo*. We found that as early as 2 h after a single injection of α-galactosylceramide (α-GalCer), sorted iNKT splenocytes from treated mice kill Fas-transfected target cells. The implication of the Fas pathway in this lysis was strengthened by both the blockage of cytotoxicity in the presence of anti-Fas ligand (FasL) monoclonal antibody (mAb) and the up-regulation of FasL expression on iNKT cells. Sorted NK cells did not participate in the lytic activity at this time point. Yet, they became cytotoxic later on, 24 h post-treatment, when target cell lysis was mainly independent of the Fas pathway. This type of cell killing was predominant at this later time point, even though iNKT cells conserved a slight Fas-dependent cytotoxicity. NK cells failed to acquire the ability to kill target cells when IFN-γ production in α-GalCer-injected mice was blocked by anti-IFN-γ mAb, underscoring the major role of this cytokine. In conclusion, our findings provide the first direct evidence that iNKT cells can exert Fas-dependent cytotoxicity very shortly after *in vivo* α-GalCer activation and later, through IFN-γ secretion, enable NK cells to kill target cells in a Fas-independent pathway.

Received	15/11/03
Revised	12/3/04
Accepted	22/3/04

Key words: NKT cells / CD1d / IFN-γ / Cytotoxicity

1 Introduction

Invariant Vα14 natural killer T (iNKT) cells constitute a distinctive subpopulation of mature T lymphocytes that co-express a highly restricted T cell receptor (TCR) repertoire composed of a single invariant Vα14Jα18 chain in mice and Vα24Jα18 chain in humans, preferentially paired with a limited TCR Vβ chain repertoire [1, 2]. This semi-invariant TCR reflects their positive selection by the non-polymorphic MHC class I-like molecule CD1d [3]. iNKT cells specifically recognize a CD1d-bound lipid molecule, α-galactosylceramide (α-GalCer), a glycolipid obtained from a marine sponge but absent in mammalian cells [4]. The natural ligands of iNKT cells are not well determined, but a recent report demonstrates the cross-presentation of a ganglioside expressed on human melanoma, GD3, to a subset of NKT cells [5].

The spectrum of actions attributed to iNKT cells is particularly diverse. They are implicated in controlling immune responses against infections, autoimmune diseases, asthma, contact sensitivity and tumors [2, 6, 11]. Over the past few years, many studies have confirmed the ability of α-GalCer treatment to provide protective immune responses, such as decreased incidence of experimental autoimmune diabetes or experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), as well as to promote tumor rejection in a variety of experimental tumor metastasis models [7, 11, 14]. The mechanisms accounting for this overall effect are complex because of the large spectrum of cytokines generated by these cells in response to α-GalCer, including IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-α and GM-CSF [2, 15]. On the other hand, α-GalCer injection induces a potent, iNKT cell-

[DOI 10.1002/eji.200324828]

Abbreviation: iNKT: Invariant Vα14 NKT **FasL:** Fas ligand **α-GalCer:** α-Galactosylceramide

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

dependent cytotoxic response against tumor cells in liver and spleen [11, 14]. While several data suggest that NK cells are the main cytotoxic effectors in the liver and spleen of GalCer-treated mice, little is known about the cytotoxic capacities of iNKT cells especially at earlier time points after *in vivo* α-GalCer treatment, when they produce a maximum of cytokines.

Here, we directly demonstrate, using CD1d/α-GalCer tetramers to specifically sort iNKT cells, that very shortly after treatment, iNKT splenocytes, but not NK cells, become cytotoxic and induce the apoptosis of target cells in a Fas-dependent way upon *in vivo* α-GalCer stimulation. Later on, NK cells, through IFN-γ presence, become cytotoxic, but in a Fas-Fas ligand (FasL)-independent manner. This is the first clear demonstration that *in vivo* activated iNKT lymphocytes can, in a few minutes, kill target cells in a Fas-dependent pathway.

2 Results

2.1 Fas-mediated cytotoxicity appears as early as 2 h after a single α-GalCer injection

In the present study, we examined whether iNKT lymphocytes, in addition to promptly producing IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IFN-γ, TNF-α and GM-CSF, can also acquire cytolytic functions few hours after α-GalCer injection. To start with, we evaluated the cytotoxicity of total splenocytes from C57BL/6 mice recovered 2 h after α-GalCer injection. As shown in Fig. 1A, a significant proportion of Fas-transfected L1210 targets (L1210Fas cells) were killed at an E/T ratio as low as 5:1, while only a slight cytotoxicity occurred against L1210 cells at a tenfold higher E/T ratio (Fig. 1A). Comparatively, splenocytes from control mice injected with vehicle alone killed only few target cells, whether they were Fas-transfected or not (Fig. 1A). Addition of neutralizing anti-FasL mAb during the cytolytic assays resulted in a significant diminution of cell killing, which became nearly as low as that of non-transfected L1210 cells (Fig. 1B). This result confirmed that the short-term cytotoxicity induced by the injection of α-GalCer was effectively mediated through the Fas pathway.

2.2 α-GalCer-activated iNKT lymphocytes kill target cells through the Fas pathway

Knowing that iNKT lymphocytes are very rapidly activated by α-GalCer, we hypothesized that they were the major effector population killing Fas-transfected L1210 cells. To directly test this hypothesis, we electronically sorted both iNKT and NK cells from the spleens of α-GalCer-treated mice, as TCRαβ$^+$CD1d/α-GalCer tetramer$^+$ and TCRαβ$^-$NK1.1$^+$ subsets, respectively (Fig. 2A). Fig. 2B clearly shows that Fas-dependent cytotoxicity was greatly increased when α-GalCer-activated iNKT cells were used instead of total spleen cells. Indeed, while the latter killed only 60% L1210Fas cells at an E/T ratio of 50:1, a 1:1 ratio was sufficient to kill up to 80% target cells, when the sorted iNKT population was used. Moreover, in this case the cytolytic effect was already significant at an E/T ratio as low as 0.1:1, which was not sufficient to kill control L1210 cells, thus proving the involvement of the Fas pathway. In contrast, sorted NK cells had only a slight cytolytic effect on L1210Fas cells, thus ruling out their participation in the early cytotoxic activity appearing within 2 h after α-GalCer injection (Fig. 2B). It can thus be concluded that iNKT cells are effectively capable of inducing apoptosis of target cells in a Fas-dependent manner.

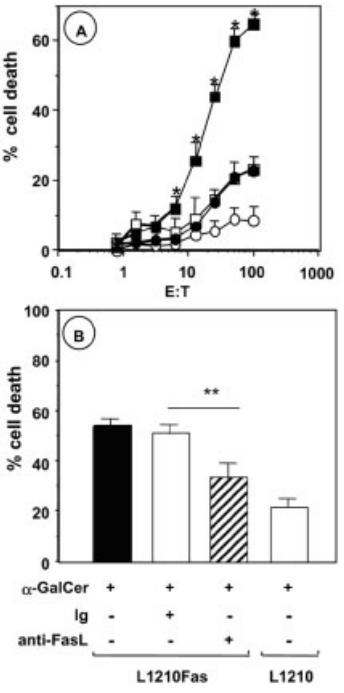


Fig. 1. Spleen cells exert Fas-mediated cytotoxicity as early as 2 h after a single α-GalCer injection. Wild-type mice were treated with a single dose of α-GalCer (2 μg/mouse, filled symbols) or vehicle (open symbols) and killed 2 h later. (A) Splenocytes were recovered, washed, and incubated with L1210Fas (squares) or L1210 (circles) cells at different E/T ratios for 18 h. The cytotoxicity was determined using the JAM assay. (B) Before the JAM assay, effector cells were incubated with anti-FasL (5 μg/ml) or control Ig antibodies. Only 50:1 cell ratio is represented. Data represent the means ± SEM from three to ten separate experiments; $^*p<0.05$; $^{**}p<0.01$.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

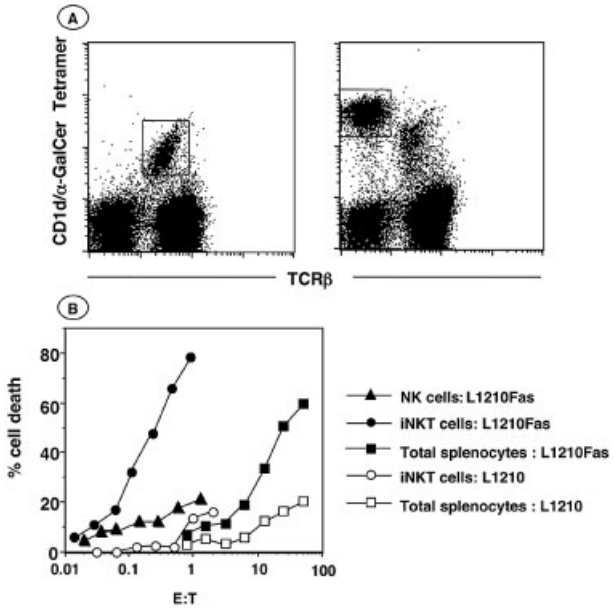


Fig. 2. iNKT lymphocytes are responsible for α-GalCer-induced Fas-dependent cytotoxicity. Wild-type mice were injected once with α-GalCer (2 μg/mouse) and killed 2 h later. (A) Total splenocytes were depleted of monocytes, granulocytes, CD8 and B lymphocytes. Enriched cells were then stained with anti-TCRαβ-FITC, anti-NK1.1-PE and CD1d/α-GalCer tetramer-APC. Cells were sorted from the regions depicted. (B) Total splenocytes (squares), TCRαβ$^+$CD1d/α-GalCer tetramer$^+$ (iNKT cells; circles) or TCRαβ$^-$NK1.1$^+$ (NK cells; triangles) cells were incubated with L1210Fas (filled symbols) or L1210 (open symbols) cells at different E/T ratios for 18 h when a JAM assay was performed. Data represent a typical experiment out of three.

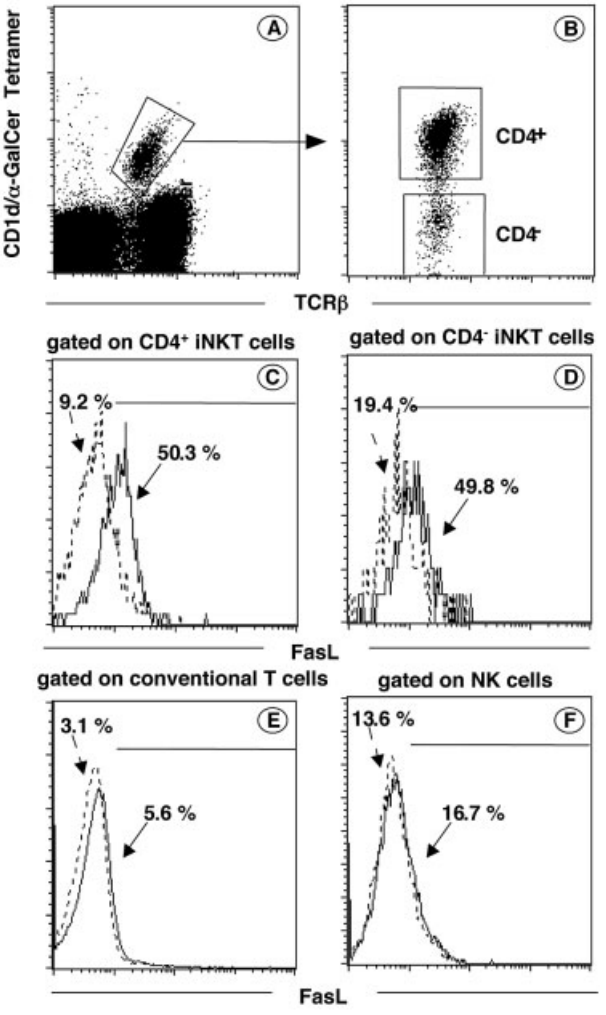


Fig. 3. iNKT lymphocytes express FasL 2 h after α-GalCer injection. Wild-type mice were injected with vehicle or α-GalCer and killed 2 h later. Total splenocytes were stained with CD1d/α-GalCer tetramer-APC, anti-TCRαβ-FITC or anti-NK1.1-FITC, anti-CD4-PerCP-Cy5.5 and with intracellular anti-FasL-PE. iNKT cells were gated as TCRαβ$^+$CD1d/α-GalCer tetramer$^+$ lymphocytes (A), and further gated on CD4$^+$ and CD4$^-$ iNKT cells (B). The histograms represent the expression of FasL on gated CD4$^+$ (C) and CD4$^-$ (D) iNKT cells as well as on gated conventional T cells (CD1d/α-GalCer tetramer TCRαβ$^+$ cells; E) and NK cells (CD1d/α-GalCer tetramer$^-$NK1.1$^+$ cells; F) after vehicle (broken line) or α-GalCer (solid line) injection. The percentage of FasL$^+$ cells among the different gated populations is represented in each histogram plot. Similar results were obtained when FasL expression was analyzed on the cell surface. Data represent a typical experiment out of three.

2.3 α-GalCer up-regulates FasL expression on iNKT lymphocytes

Flow cytometric analysis of spleen cells recovered 2 h after α-GalCer administration established that FasL expression was significantly enhanced on iNKT cells, but neither on NK nor spleen T cells (Fig. 3). This up-regulation took place in both CD4$^+$ and CD4$^-$ iNKT subsets (Fig. 3C, D). Yet, in contrast to CD4$^+$ iNKT cells, up to 20% of this CD4$^-$ counterpart from control mice already expressed FasL (Fig. 3D), and this percentage was only about 2.6-fold increased upon α-GalCer injection. Conversely, the proportion of FasL$^+$ cells among CD4$^+$ iNKT lymphocytes was markedly (fivefold) enhanced in the same conditions (Fig. 3C, D). These findings support the notion that iNKT lymphocytes activated *in vivo* with α-GalCer become effectively capable of killing target cells through Fas/FasL interactions.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

2.4 Fas-independent cytotoxicity increases 24 h after a single injection of α-GalCer

Considering the time delay between the activation of iNKT cells and the initiation of their cross-talk with NK cells, we chose a later time point, 24 h after α-GalCer injection, to evaluate the cytotoxic effect of both populations. The proportion of L1210Fas target cells killed by total splenocytes was similar to that observed 2 h post-treatment (Fig. 4A) but exceeded that of L1210 cells. However, in contrast to the earlier time point, the cytotoxicity of total splenocytes against L1210 cells was markedly increased at 24 h (Fig. 1A; 4A). Enhancement of cytotoxic activity against both L1210 and L1210Fas target cells was still visible at 48 h but drastically decreased at 72 h after α-GalCer injection (data not shown).

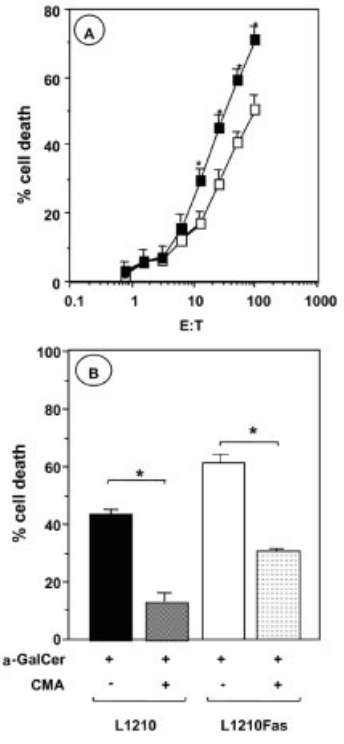


Fig. 4. Fas-independent cytotoxicity increases 24 h after a single injection of α-GalCer. Wild-type mice were treated with a single dose of α-GalCer and killed 24 h later. (A) Total spleen cells were then assayed for cytotoxicity on L1210Fas (filled squares) or L1210 (open squares) cells at different E/T ratios for 18 h. Data represent means ± SEM of three independent experiments. (B) Before the cytotoxicity assay, effector cells were incubated with concanamycin A (CMA; 100 μM). Only the 50:1 cell ratio is represented. Data represent means ± SEM from four mice; *$p < 0.05$.

It is therefore plausible that the cytotoxicity observed 24 h post-α-GalCer injection is no longer dependent on the Fas pathway. In accordance with this conclusion, the death of both L1210 and L1210Fas cells induced by total spleen cells was significantly diminished in the presence of concanamycin A, an inhibitor of the perforin-granzyme pathway, which does not affect Fas/FasL interactions (Fig. 4B). These results establish that a Fas-independent cytotoxicity was promoted secondarily, 24 h after α-GalCer injection.

2.5 NK cells stimulated *in vivo* by ligand-activated iNKT lymphocytes kill target cells in a Fas-independent manner

To identify the cytotoxic effector cells in the spleen 24 h after α-GalCer injection, we assayed FACS-sorted iNKT and NK cells for this biological activity. It turned out that sorted NK cells killed up to 70% and 40% of L1210Fas and L1210 cells, respectively, at an E/T ratio of 1:1 (Fig. 5). On the other hand, iNKT lymphocytes exerted their cytotoxic activity exclusively against L1210Fas cells

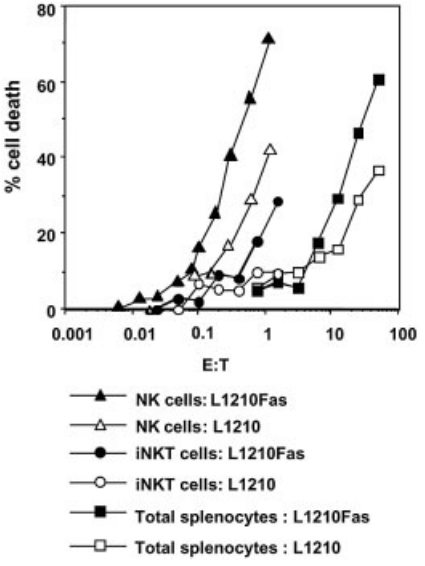


Fig. 5. NK cells stimulated *in vivo* by ligand-activated iNKT lymphocytes kill target cells in a Fas-independent manner. Wild-type mice were injected once with α-GalCer (2 μg/mouse) and killed 24 h later. After depletion of monocytes, granulocytes, CD8 and B lymphocytes, enriched splenocytes were stained with anti-TCRαβ-FITC, anti-NK1.1-PE and CD1d/α-GalCer tetramer-APC. Total splenocytes (squares), $TCR\alpha^{-}NK1.1^{+}$ (NK cells; triangles) or $TCR\alpha\beta^{+}CD1d/\alpha GalCer\ tetramer^{+}$ (iNKT cells; circles) cells were incubated with L1210Fas (filled symbols) or L1210 (open symbols) cells at different E/T ratios for 18 h using a JAM assay. Data represent a typical experiment out of two.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

(30% at an E/T ratio as low as 1:1; Fig. 5), even though the effect was less important at 24 h (Fig. 5) than at 2 h after α-GalCer injection (Fig. 2B). These results demonstrate that 24 h after α-GalCer injection, NK cells are the major cell type responsible for Fas-independent lysis of target cells.

2.6 NK cell cytotoxicity induced by α-GalCer-activated iNKT lymphocytes is blocked by anti-IFN-γ treatment

The transactivation of NK cells by IFN-γ induced by ligand-activated iNKT cells is a well-known feature [16]. We examined whether the NK cell cytotoxicity induced after α-GalCer injection was also dependent on IFN-γ. To this end, we evaluated the effect of the *in vivo* treatment in mice having received neutralizing anti-IFN-γ mAb before α-GalCer injection. Fig. 6 shows that *in vivo* treatment with anti-IFN-γ mAb reduces the lysis of L1210 and L1210Fas cells significantly, indicating that α-GalCer-induced IFN-γ, and thus iNKT cell activation, is necessary to promote the cytotoxic activity of NK cells.

3 Discussion

In the present study, we demonstrate that sorted iNKT splenocytes from mice having received a single α-GalCer injection 2 h before, have acquired the capacity to kill target cells in a Fas-dependent manner. At this time point NK cells did not contribute to the cytotoxic effect, but they could do so subsequently, once iNKT cells had activated them through their IFN-γ production. The cytotoxicity exerted by NK cells did not involve the Fas pathway.

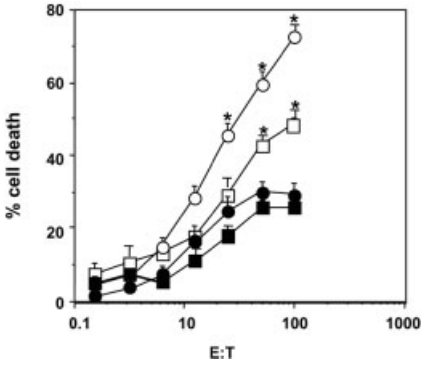


Fig. 6. NK cell cytotoxicity induced by α-GalCer injection is blocked by anti-IFN-γ treatment. Mice were injected intraperitoneally 24 h and 1 h before α-GalCer treatment with anti-IFN-γ mAb (filled symbols) or control Ig (1 μg/mouse; open symbols). Mice were killed 24 h after α-GalCer injection. Total splenocytes were incubated with L1210Fas (circles) or L1210 (squares) cells at different E/T ratios for 18 h and a JAM assay was performed. Data represent means ± SEM from three independent experiments; $^*p<0.05$ (as compared between treatment with control Ig and anti-IFN-γ).

We have previously shown that a single injection of α-GalCer induces activation-induced cell death of the majority of iNKT cells through Fas/FasL interactions [17]. Recent studies reported that TCR down-modulation also accounts for the failure to detect iNKT cells following α-GalCer injection [18, 19]. Here, we show that the administration of α-GalCer enabled iNKT cells to kill Fas$^+$ target cells. The maximal cytotoxic effect was attained shortly (2 h) after α-GalCer treatment. Thereafter, both the number ([17] and data not shown) and the cytotoxicity of iNKT were markedly reduced.

Before CD1d/α-GalCer tetramers capable of specifically recognizing iNKT cells became available, it had already been suggested that TCRαβ$^+$NK1.1$^+$ NKT cells exposed to α-GalCer could kill target cells [11]. However, these experiments were generally performed 24 h after α-GalCer injection, when NK and not iNKT cells were the preponderant cytotoxic effector cells [14, 20]. Using Vα14-transgenic mice, Taniguchi's group [11] demonstrated that splenocytes recovered 24 h after α-GalCer treatment could kill target cells in a Fas-independent manner. These results are in accordance with our findings because the capacity of iNKT cells to kill target cells through the Fas pathway was mainly observed at 2 h after α-GalCer injection. Later on, at 24 h, the cytotoxicity became Fas-independent. We have previously demonstrated that iNKT cells stimulated *in vitro* by IL-12 plus IL-18 were capable to kill Fas-transfected target cells [21]. In the present study, our results provide definite evidence that, very rapidly but not for long after *in vivo* α-GalCer treatment, iNKT cells acquire strong cytolytic functions, mediated through the Fas death pathway.

Recent reports suggested that iNKT cells cause hepatocyte injury following α-GalCer or concanavalin A treatment through the Fas pathway [22, 23]. The implication of this type of apoptosis in the potentially deleterious effect of iNKT cells was supported by experiments using *lpr/lpr* and *gld/gld* mice, even though no direct evidence for target cell lysis through Fas/FasL interactions was provided. In contrast to the liver, the spleen is a typical peripheral lymphoid organ where immune responses occur. Based on our findings and on the importance of Fas/FasL interactions in peripheral tolerance [24, 25], we assume that, in addition to their cytokine production, iNKT cells could accomplish some of these immunoregulatory functions by inducing the apoptosis of Fas$^+$ cells,

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

thus contributing to the maintenance of immune homeostasis.

Apparently, human $CD4^+$ and double-negative (DN) iNKT cells generate different cytokine profiles when stimulated [26]. Even though, in contrast to human iNKT cells [26], we observed no significant difference in FasL expression between $CD4^+$ and DN iNKT cells after *in vitro* PMA/ionomycin stimulation (data not shown), our data agree with this notion that distinct functional subsets of iNKT cells may exist, since we show that FasL expression is enhanced at least fivefold among $CD4^+$ iNKT cells compared to 2.6-fold increase in their DN counterpart following *in vivo* α-GalCer stimulation. Moreover, depletion of $CD4^+$ cells from total splenocytes abrogated the Fas-dependent cytotoxicity observed 2 h after α-GalCer injection (data not shown), pointing to a major implication of the $CD4^+$ subset in this biological activity.

In addition to their ability to produce cytokines [1, 2] and to kill target cells in a Fas-dependent manner, iNKT cells from α-GalCer-treated mice can also activate NK cells to render them cytotoxic. It is indeed well established that α-GalCer-activated iNKT cells secondarily induce the production of IFN-γ by NK cells [14, 16]. According to our data, NK cells become eventually the major effector population of the spleen in the long run, killing target cells independently of Fas/FasL interactions but depending on IFN-γ to express this biological activity.

The glycolipid α-GalCer acting on iNKT cells can reduce the severity of a set of experimental diseases such as autoimmune diabetes, EAE and infections [2, 6, 7, 13]. Moreover, it is well established that iNKT cells are required for the anti-metastatic effect of α-GalCer treatment [4, 11, 14]. In these models, NK cells, secondarily activated by IFN-γ-producing iNKT lymphocytes, killed tumor cells *in vitro* in a Fas-independent manner [14, 21]. Although NK cells are probably the primary effectors of α-GalCer-induced anti-tumor activity, recent reports suggest that the anti-metastatic activity of α-GalCer is initially dependent on the IFN-γ produced by iNKT cells, but does probably not require cytotoxic activity, because it was not abrogated in FasL-, perforin-, TNF- or TRAIL-deficient mice [14]. Conversely, it has recently been demonstrated that IFN-γ produced by iNKT or NK cells is necessary to inhibit tumor angiogenesis [27].

In conclusion, our findings provide the first clear evidence that *in vivo* activated iNKT lymphocytes can induce apoptosis of target cells though the Fas pathway. We established that *in vivo* treatment with α-GalCer sequentially induced Fas-dependent and -independent cytotoxicity exerted by iNKT cells and NK cells, respectively. These data contribute to improve the current understanding of the functional capacities of iNKT lymphocytes and could anticipate potential complications during therapeutic usage of α-GalCer.

4 Materials and methods

4.1 Mice and *in vivo* treatment

Six- to eight-week-old male C57BL/6 mice were bred in our own animal facilities. All mice were kept in well-controlled animal housing facilities and had free access to tap water and pellet food throughout the experimental period. Mice received a single i.v. injection of 2 μg of α-GalCer dissolved in PBS containing 0.025% polysolvate 20 (Kirin Brewery Co., Ltd., Gunma, Japan) [28] and were sacrificed 2, 24, 48 or 72 h later. In some experiments, mice were intraperitoneally injected with 500 μg of anti-IFN-γ (clone R4–6A2) or control rat IgG (Sigma-Aldrich, Stonheim, Germany) at 24 and 1 h before treatment with α-GalCer or vehicle.

4.2 Reagents

RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; TechGen, Les Ulis, France), 100 IU/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10 mM Hepes buffer (all from Gibco) and 5×10^{-5} M 2-ME was used as culture medium. Anti-IFN-γ mAb (AN18 and R46A2 clones) were purified in our laboratory. The anti-CD19 (clone 1D3) and the anti-FasL (clone Kay-10) mAb came from BD PharMingen (San Diego, CA). The following mAb used for cell depletion were purified in our laboratory: CD8 (clone 53.67), CD62L (clone Mel14), TER119 (clone TER119) and Mac1 (clone M1/70). The anti-FcγR/IgG2b mAb (clone 2.4G2) was purified in our laboratory. Anti-TCRαβ-FITC (clone H57–597), anti-NK1.1-PE (clone PK136), anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (clone RM4–5) and isotype controls were from BD PharMingen. Anti-rat Ig-coated magnetic beads were obtained from Dynal (Compiégne, France).

4.3 Purification and stimulation of invariant Vα14 NKT lymphocytes and NK cells

Freshly isolated splenocytes were enriched for NK and iNKT cells by depleting CD8, CD62L, Mac1, TER119 and CD19 cells labeled with the corresponding mAb and with anti-rat Ig-coated magnetic beads. The enriched NK and iNKT cell populations were further incubated with anti-TCRαβ, anti-NK1.1 mAb and CD1d/α-GalCer tetramers. Both iNKT ($TCR\alpha\beta^+CD1d/\alpha$-GalCer tetramer$^+$) and NK ($TCR\alpha\beta^+NK1.1^-$) cells were sorted using a FACSVantage sorter (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Purity was greater than 98% after re-analysis. Sorted cells were used for cytotoxic assays.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

4.4 Flow cytometric analysis

Cells were stained in PBS containing 2% FCS and 0.01 M sodium azide and incubated for 20 min with appropriate dilutions of various mAb coupled to biotin, allophycoerythrin, phycoerythrin (PE) or fluorescein. When mAb were biotinylated, streptavidin (SAV)-allophycocyanin (APC) or SAV-CyChrome was used as a second-step reagent. α-GalCer-specific lymphocytes were identified using CD1d/α-GalCer tetrameric complexes, as described previously [29], which were prepared and coupled to APC in our laboratory. Freshly isolated splenic lymphocytes were incubated with APC-labeled tetrameric complexes, anti-TCR$\alpha\beta$-FITC and anti-CD4-PerCP-Cy5.5 mAb. Intracellular staining was used to detect FasL expression because this ligand is rapidly cleaved from the cell surface by serum metalloproteinases. After surface staining, cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 5 min and further incubated with anti-FasL-PE diluted in PBS containing 2% FCS, 0.01 M sodium azide and 0.5% saponin. Dead cells were excluded on the basis of forward and side scatter. At least 10^5 live lymphoid cells were acquired in each run. Samples were analyzed on a FACSCalibur (Becton Dickinson).

4.5 Cytotoxic T lymphocyte assay

Target cell lysis by NK and NKT cells was measured by a Just Another Method (JAM) assay [30] using the L1210 cell line transfected with Fas (L1210Fas) and the non-transfected L1210 control cell line as target cells [21]. Briefly, effector cells were incubated with [^{3}H]thymidine (Amersham, Les Ulis, France)-labeled L1210 or L1210Fas cells (2.5×10^4) at various E/T ratios for 18 h. Assays were performed in 96-well U-bottom plates in a total volume of 200 μl/well. Maximal release was obtained with addition of 200 μg of DNase I. After incubation, cells were harvested and radioactivity was determined using a β-counter (LKB Wallac). Percent specific lysis was calculated as follows: 100 – (((experimental release – maximal release) × 100) / (spontaneous release – maximal release)). In some experiments, the assay was performed in the presence of concanamycin A (100 μM), or of neutralizing mouse anti-FasL mAb (1 μg/ml) or isotype control Ig (1 μg/ml).

4.6 Statistics

Data were expressed as means ± SEM, and differences between means were evaluated using Student's *t*-test.

Acknowledgments: We are grateful to Dr. A. Herbelin (CNRS UMR 8147) for helpful discussions and critical comments. We are especially indebted to Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co. We are grateful to Corinne Garcia-Cordier and Jérôme Mégret (IRNEM) for performing all cell sortings. This work was supported by institute funds from the CNRS, Université René Descartes – Paris V, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (4661) to M. C. Leite-de-Moraes; and AI-45053 to M. Kronenberg.

References

1 **Kronenberg, M. and Gapin, L.,** The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. **2:** 557–568.

2 **Lisbonne, M. and Leite-de-Moraes, M. C.,** Invariant Vα14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur. Cytokine Netw.* 2003. **14:** 4–14.

3 **Bendelac, A.,** Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 1995. **182:** 2091–2096.

4 **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M.,** CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 1997. **278:** 1626–1629.

5 **Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M. and Chapman, P. B.,** Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* 2003. **198:** 171–181.

6 **Hansen, D. S., Siomos, M. A., Buckingham, L., Scalzo, A. A. and Schofield, L.,** Regulation of murine cerebral malaria pathogenesis by CD1d-restricted NKT cells and the natural killer complex. *Immunity* 2003. **18:** 391–402.

7 **Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, J. M., Leite-de-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J. F. and Herbelin, A.,** Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat. Med.* 2001. **7:** 1057–1062.

8 **Mars, L. T., Laloux, V., Goude, K., Desbois, S., Saoudi, A., Van Kaer, L., Lassmann, H., Herbelin, A., Lehuen, A. and Liblau, R. S.,** Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 2002. **168:** 6007–6011.

9 **Lisbonne, M., Diem, S., Castro-Keller, A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J.-M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., Van Endert, P., Dy, M., Askenase, P., Russo, M., Vargaftig, B. B., Herbelin, A. and Leite-de-Moraes, M. C.,** Cutting edge: invariant Vα14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J. Immunol.* 2003. **171:** 1637–1641.

10 **Campos, R. A., Szczepanik, M., Itakura, A., Akahira-Azuma, M., Sidobre, S., Kronenberg, M. and Askenase, P. W.,** Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Vα14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J. Exp. Med.* 2003. **198:** 785–796.

11 **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., Tanaka, Y. and Taniguchi, M.,** Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998. **95:** 5690–5693.

12 **Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D. C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y. and Van Kaer, L.,** The natural killer T cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat. Med.* 2001. **7:** 1052–1056.

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

13 **Miyamoto, K., Miyake, S. and Yamamura, T.,** A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* 2001. **413:** 531–534.

14 **Smyth, M. J., Crowe, N. Y., Pellicci, D. G., Kyparissoudis, K., Kelly, J. M., Takeda, K., Yagita, H. and Godfrey, D. I.,** Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002. **99:** 1259–1266.

15 **Leite-de-Moraes, M. C., Lisbonne, M., Arnould, A., Machavoine, F., Herbelin, A., Dy, M. and Schneider, E.,** Ligand-activated natural killer T lymphocytes promptly produce IL-3 and GM-CSF in vivo: relevance to peripheral myeloid recruitment. *Eur. J. Immunol.* 2002. **32:** 1897–1904.

16 **Carnaud, C., Lee, D., Donnars, O., Park, S. H., Beavis, A., Koezuka, Y. and Bendelac, A.,** Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 1999. **163:** 4647–4650.

17 **Leite-de-Moraes, M. C., Herbelin, A., Gouarin, C., Koezuka, Y., Schneider, E. and Dy, M.,** Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NKT lymphocytes. *J. Immunol.* 2000. **165:** 4367–4371.

18 **Wilson, M. T., Johansson, C., Olivares-Villagomez, D., Singh, A. K., Stanic, A. K., Wang, C. R., Joyeux, I., Wick, M. J. and Van Kaer, L.,** The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003. **100:** 10913–10918.

19 **Crowe, N. Y., Uldrich, A. P., Kyparissoudis, K., Hammond, K. J. L., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. and Godfrey, D.,** Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NKT cells. *J. Immunol.* 2003. **171:** 4020–4027.

20 **Eberl, G. and MacDonald, H. R.,** Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur. J. Immunol.* 2000. **30:** 985–992.

21 **Leite-de-Moraes, M. C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A. and Dy, M.,** A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J. Immunol.* 1999. **163:** 5871–5876.

22 **Nakagawa, R., Nagafune, I., Tazunoki, Y., Ehara, H., Tomura, H., Iijima, R., Motoki, K., Kamishohara, M. and Seki, S.,** Mechanisms of the antimetastatic effect in the liver and of the hepatocyte injury induced by alpha-galactosylceramide in mice. *J. Immunol.* 2001. **166:** 6578–6584.

23 **Takeda, K., Hayakawa, Y., Van Kaer, L., Matsuda, H., Yagita, H. and Okumura, K.,** Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000. **97:** 5498–5503.

24 **Ju, S. T., Panka, D. J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D. H., Stanger, B. Z. and Marshak-Rothstein, A.,** Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T cell activation. *Nature* 1995. **373:** 385–386.

25 **Lee, H. O. and Ferguson, T. A.,** Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003. **14:** 325–335.

26 **Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. and Brenner, M. B.,** Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 2002. **195:** 625–636.

27 **Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Smyth, M. J., Van Kaer, L., Okumura, K. and Saiki, I.,** IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002. **100:** 1728–1733.

28 **Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E. and Fukushima, H.,** Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J. Med. Chem.* 1995. **38:** 2176–2187.

29 **Matsuda, J. L., Naidenko, O. V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C. R., Koezuka, Y. and Kronenberg, M.,** Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J. Exp. Med.* 2000. **192:** 741–754.

30 **Matzinger, P.,** The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J. Immunol. Methods.* 1991. **145:** 185–192.

Correspondence: Maria C. Leite-de-Moraes, CNRS UMR 8147, Paris V, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, F-75743 Paris Cedex 15, France
Fax: +33-1-4449-0676
e-mail: leite.de.moraes@necker.fr

© 2004 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol 2:725*.

Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med 8:1024*.

Akbari, O., P. Stock, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2003. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol 15:627*.

Akbari, O., and D. T. Umetsu. 2004. Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol 4:533*.

Akbari, O., J. L. Faul, E. G. Hoyte, G. J. Berry, J. Wahlstrom, M. Kronenberg, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2006. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med 354:1117*.

Apostolou, I., Y. Takahama, C. Belmant, T. Kawano, M. Huerre, G. Marchal, J. Cui, M. Taniguchi, H. Nakauchi, J. J. Fournie, P. Kourilsky, and G. Gachelin. 1999. Murine natural killer T (NKT) cells [correction of natural killer cells] contribute to the granulomatous reaction caused by mycobacterial cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A 96:5141*.

Arase, H., N. Arase, K. Nakagawa, R. A. Good, and K. Onoe. 1993. NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur J Immunol 23:307*.

Ballas, Z. K., and W. Rasmussen. 1990. NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol 145:1039*.

Baur, N., G. Nerz, A. Nil, and K. Eichmann. 2001. Expression and selection of productively rearranged TCR beta VDJ genes are sequentially regulated by CD3 signaling in the development of NK1.1(+) alpha beta T cells. *Int Immunol 13:1031*.

Baxter, A. G., S. J. Kinder, K. J. Hammond, R. Scollay, and D. I. Godfrey. 1997. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes 46:572*.

Bendelac, A., N. Killeen, D. R. Littman, and R. H. Schwartz. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science 263:1774*.

Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med 182:2091*.

Benlagha, K., A. Weiss, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2000. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med 191:1895*.

Benlagha, K., T. Kyin, A. Beavis, L. Teyton, and A. Bendelac. 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science 296:553*.

Benlagha, K., D. G. Wei, J. Veiga, L. Teyton, and A. Bendelac. 2005. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med 202:485*.

Bjorksten, B., P. Naaber, E. Sepp, and M. Mikelsaar. 1999. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy 29:342*.

Bostock J. 1819. Case of a periodical affection of the eyes and chest. *Medico-Chirurg Trans 10:161.*

Bousquet, J., P. K. Jeffery, W. W. Busse, M. Johnson, and A. M. Vignola. 2000. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med 161:1720*.

Boyce, J. A., and K. F. Austen. 2005. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J Exp Med 201:1869*.

Bremner, S. A., I. M. Carey, S. DeWilde, N. Richards, W. C. Maier, S. R. Hilton, D. P. Strachan, and D. G. Cook. 2003. Early-life exposure to antibacterials and the subsequent development of hayfever in childhood in the UK: case-control studies using the General Practice Research Database and the Doctors' Independent Network. *Clin Exp Allergy 33:1518*.

Brewster, C. E., P. H. Howarth, R. Djukanovic, J. Wilson, S. T. Holgate, and W. R. Roche. 1990. Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol 3:507*.

Brigl, M., L. Bry, S. C. Kent, J. E. Gumperz, and M. B. Brenner. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol 4:1230*.

Budd, R. C., G. C. Miescher, R. C. Howe, R. K. Lees, C. Bron, and H. R. MacDonald. 1987. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med 166:577*.

Burdin, N., L. Brossay, and M. Kronenberg. 1999. Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol 29:2014*.

Campbell, P., U. Weiss. 1999. Allergy and asthma. *Nature 6760:B1*

Campos, R. A., M. Szczepanik, A. Itakura, M. Akahira-Azuma, S. Sidobre, M. Kronenberg, and P. W. Askenase. 2003. Cutaneous immunization rapidly activates liver invariant Valpha14 NKT cells stimulating B-1 B cells to initiate T cell recruitment for elicitation of contact sensitivity. *J Exp Med 198:1785*.

Campos, R. A., M. Szczepanik, A. Itakura, M. Lisbonne, N. Dey, M. C. Leite-de-Moraes, and P. W. Askenase. 2006. Interleukin-4-dependent innate collaboration between iNKT cells and B-1 B cells controls adaptative contact sensitivity. *Immunology 117:536*.

Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, and A. Bendelac. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol 163:4647*.

Celedon, J. C., A. Fuhlbrigge, S. Rifas-Shiman, S. T. Weiss, and J. A. Finkelstein. 2004. Antibiotic use in the first year of life and asthma in early childhood. *Clin Exp Allergy 34:1011*.

Ceredig, R., F. Lynch, and P. Newman. 1987. Phenotypic properties, interleukin 2 production, and developmental origin of a "mature" subpopulation of Lyt-2- L3T4- mouse thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A 84:8578*.

Chang, D. H., K. Osman, J. Connolly, A. Kukreja, J. Krasovsky, M. Pack, A. Hutchinson, M. Geller, N. Liu, R. Annable, J. Shay, K. Kirchhoff, N. Nishi, Y. Ando, K. Hayashi, H. Hassoun, R. M. Steinman, and M. V. Dhodapkar. 2005. Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients. *J Exp Med 201:1503*.

Chapoval, S. P., E. V. Marietta, M. K. Smart, and C. S. David. 2001. Requirements for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in CD4-deficient and CD4-sufficient HLA-DQ transgenic mice. *J Allergy Clin Immunol 108:764*.

Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science 265:1237*.

Chun, T., M. J. Page, L. Gapin, J. L. Matsuda, H. Xu, H. Nguyen, H. S. Kang, A. K. Stanic, S. Joyce, W. A. Koltun, M. J. Chorney, M. Kronenberg, and C. R. Wang. 2003. CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med 197:907*.

Chung, Y., W. S. Chang, S. Kim, and C. Y. Kang. 2004. NKT cell ligand alpha-galactosylceramide blocks the induction of oral tolerance by triggering dendritic cell maturation. *Eur J Immunol 34:2471*.

Cohn, L., J. S. Tepper, and K. Bottomly. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol 161:3813*.

Coles, M. C., and D. H. Raulet. 2000. NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells. *J Immunol 164:2412*.

Collins, P. D., S. Marleau, D. A. Griffiths-Johnson, P. J. Jose, and T. J. Williams. 1995. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo. *J Exp Med 182:1169*.

Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature 402:B5*.

Crowe, N. Y., J. M. Coquet, S. P. Berzins, K. Kyparissoudis, R. Keating, D. G. Pellicci, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med 202:1279*.

Cui, J., N. Watanabe, T. Kawano, M. Yamashita, T. Kamata, C. Shimizu, M. Kimura, E. Shimizu, J. Koike, H. Koseki, Y. Tanaka, M. Taniguchi, and T. Nakayama. 1999. Inhibition of T helper cell type 2 cell differentiation and immunoglobulin E response by ligand-activated Valpha14 natural killer T cells. *J Exp Med 190:783*.

Dalton, D. K., S. Pitts-Meek, S. Keshav, I. S. Figari, A. Bradley, and T. A. Stewart. 1993. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science 259:1739*.

de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med 200:89*.

de Heer, H. J., H. Hammad, M. Kool, and B. N. Lambrecht. 2005. Dendritic cell subsets and immune regulation in the lung. *Semin Immunol 17:295*.

Djukanovic, R. 1996. Bronchoscopy as a research tool for the study of asthma pathogenesis and effects of antiasthma drugs. *J Allergy Clin Immunol 98:S41*.

Dubé, J., and L. P. Boulet. 1996. Role de l'inflammation et des modifications des structures bronchiques dans l'asthme allergique. *M/S 12:351*.

Dy, M., and E. Schneider. 2004. Histamine-cytokine connection in immunity and hematopoiesis. *Cytokine Growth Factor Rev 15:393*.

Eberl, G., R. Lees, S. T. Smiley, M. Taniguchi, M. J. Grusby, and H. R. MacDonald. 1999. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol 162:6410*.

Eberl, G., P. Brawand, and H. R. MacDonald. 2000. Selective bystander proliferation of memory CD4+ and CD8+ T cells upon NK T or T cell activation. *J Immunol 165:4305*.

Enerback, L. 1997. The differentiation and maturation of inflammatory cells involved in the allergic response: mast cells and basophils. *Allergy 52:4*.

Exley, M. A., N. J. Bigley, O. Cheng, S. M. Tahir, S. T. Smiley, Q. L. Carter, H. F. Stills, M. J. Grusby, Y. Koezuka, M. Taniguchi, and S. P. Balk. 2001. CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus. *J Leukoc Biol 69:713*.

Fahy, J. V. 2001. Remodeling of the airway epithelium in asthma. *Am J Respir Crit Care Med 164:S46*.

Faria, A. M., and H. L. Weiner. 2005. Oral tolerance. *Immunol Rev 206:232*.

Faveeuw, C., V. Angeli, J. Fontaine, C. Maliszewski, A. Capron, L. Van Kaer, M. Moser, M. Capron, and F. Trottein. 2002. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to Schistosoma mansoni glycoconjugates in mice. *J Immunol 169:906*.

Finotto, S., G. T. De Sanctis, H. A. Lehr, U. Herz, M. Buerke, M. Schipp, B. Bartsch, R. Atreya, E. Schmitt, P. R. Galle, H. Renz, and M. F. Neurath. 2001. Treatment of allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by antisense-induced local blockade of GATA-3 expression. *J Exp Med 193:1247*.

Finotto, S., M. F. Neurath, J. N. Glickman, S. Qin, H. A. Lehr, F. H. Green, K. Ackerman, K. Haley, P. R. Galle, S. J. Szabo, J. M. Drazen, G. T. De Sanctis, and L. H. Glimcher. 2002. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science 295:336*.

Foster, P. S., A. W. Mould, M. Yang, J. Mackenzie, J. Mattes, S. P. Hogan, S. Mahalingam, A. N. McKenzie, M. E. Rothenberg, I. G. Young, K. I. Matthaei, and D. C. Webb. 2001. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. *Immunol Rev 179:173*.

Fowlkes, B. J., A. M. Kruisbeek, H. Ton-That, M. A. Weston, J. E. Coligan, R. H. Schwartz, and D. M. Pardoll. 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature 329:251*.

Frew, A. J., and A. B. Kay. 1990. Eosinophils and T-lymphocytes in late-phase allergic reactions. *J Allergy Clin Immunol 85:533*.

Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito, and R. M. Steinman. 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med 199:1607*.

Fujimura, M., Q. Xiu, M. Tsujiura, H. Tachibana, S. Myou, T. Matsuda, and K. Matsushima. 1998. Role of leukotriene B4 in bronchial hyperresponsiveness induced by interleukin-8. *Eur Respir J 11:306*.

Furlan, R., A. Bergami, D. Cantarella, E. Brambilla, M. Taniguchi, P. Dellabona, G. Casorati, and G. Martino. 2003. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol 33:1830*.

Gadue, P., L. Yin, S. Jain, and P. L. Stein. 2004. Restoration of NK T cell development in fyn-mutant mice by a TCR reveals a requirement for Fyn during early NK T cell ontogeny. *J Immunol 172:6093*.

Gapin, L., J. L. Matsuda, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol 2:971*.

Gern, J. E., and W. W. Busse. 2002. Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol 2:132*.

Giaccone, G., C. J. Punt, Y. Ando, R. Ruijter, N. Nishi, M. Peters, B. M. von Blomberg, R. J. Scheper, H. J. van der Vliet, A. J. van den Eertwegh, M. Roelvink, J. Beijnen, H. Zwierzina, and H. M. Pinedo. 2002. A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res 8:3702*.

Giorda, R., W. A. Rudert, C. Vavassori, W. H. Chambers, J. C. Hiserodt, and M. Trucco. 1990. NKR-P1, a signal transduction molecule on natural killer cells. *Science 249:1298*.

Gleich, G. J., and C. R. Adolphson. 1986. The eosinophilic leukocyte: structure and function. *Adv Immunol 39:177*.

Glimcher, L., F. W. Shen, and H. Cantor. 1977. Identification of a cell-surface antigen selectively expressed on the natural killer cell. *J Exp Med 145:1*.

Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and L. Van Kaer. 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol 4:231*.

Gold, M. S., and A. S. Kemp. 2005. Atopic disease in childhood. *Med J Aust 182:298*.

Gombert, J. M., A. Herbelin, E. Tancrede-Bohin, M. Dy, C. Carnaud, and J. F. Bach. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol 26:2989*.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., C. de Oliveira, M. Tomaska, S. Hong, O. Bruna-Romero, T. Nakayama, M. Taniguchi, A. Bendelac, L. Van Kaer, Y. Koezuka, and M. Tsuji. 2000. alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A 97:8461*.

Gourdy, P., L. M. Araujo, R. Zhu, B. Garmy-Susini, S. Diem, H. Laurell, M. Leite-de-Moraes, M. Dy, J. F. Arnal, F. Bayard, and A. Herbelin. 2005. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-{gamma} production by invariant natural killer T cells. *Blood 105:2415*.

Grubor-Bauk, B., A. Simmons, G. Mayrhofer, and P. G. Speck. 2003. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol 170:1430*.

Grunig, G., M. Warnock, A. E. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D. M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. D. Donaldson, R. M. Locksley, and D. B. Corry. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science 282:2261*.

Hachem, P., M. Lisbonne, M. L. Michel, S. Diem, S. Roongapinun, J. Lefort, G. Marchal, A. Herbelin, P. W. Askenase, M. Dy, and M. C. Leite-de-Moraes. 2005. Alpha-

galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol 35:2793*.

Haggerty, C. L., R. B. Ness, S. Kelsey, and G. W. Waterer. 2003. The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol 90:284*.

Hammond, K. J., D. G. Pellicci, L. D. Poulton, O. V. Naidenko, A. A. Scalzo, A. G. Baxter, and D. I. Godfrey. 2001. CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol 167:1164*.

Hansen, G., J. J. McIntire, V. P. Yeung, G. Berry, G. J. Thorbecke, L. Chen, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2000. CD4(+) T helper cells engineered to produce latent TGF-beta1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest 105:61*.

Hargreave, F. E., J. Dolovich, P. M. O'Byrne, E. H. Ramsdale, and E. E. Daniel. 1986. The origin of airway hyperresponsiveness. *J Allergy Clin Immunol 78:825*.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol 6:1123*.

Hartert, T. V., and R. S. Peebles, Jr. 2000. Epidemiology of asthma: the year in review. *Curr Opin Pulm Med 6:4*.

Hawrylowicz, C. M., and A. O'Garra. 2005. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol 5:271*.

Hayakawa, Y., S. P. Berzins, N. Y. Crowe, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2004. Antigen-induced tolerance by intrathymic modulation of self-recognizing inhibitory receptors. *Nat Immunol 5:590*.

Hermans, I. F., J. D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, R. Schmidt, A. L. Harris, L. Old, and V. Cerundolo. 2003. NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J Immunol 171:5140*.

Hilman, B. 1997. NHLBI guidelines for biagnosis and management of asthma. Bethesda, Md: National Heart, Lung and Blood Institute; NIH publication. *97:4051.*

Hirasawa, R., R. Shimizu, S. Takahashi, M. Osawa, S. Takayanagi, Y. Kato, M. Onodera, N. Minegishi, M. Yamamoto, K. Fukao, H. Taniguchi, H. Nakauchi, and A. Iwama. 2002. Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development. *J Exp Med 195:1379*.

Ho, E. L., L. N. Carayannopoulos, J. Poursine-Laurent, J. Kinder, B. Plougastel, H. R. Smith, and W. M. Yokoyama. 2002. Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D. *J Immunol 169:3667*.

Hogan, S. P., A. Koskinen, K. I. Matthaei, I. G. Young, and P. S. Foster. 1998. Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med 157:210*.

Holgate, S. T., and G. Lack. 2005. Improving the management of atopic disease. *Arch Dis Child 90:826*.

Hong, S., M. T. Wilson, I. Serizawa, L. Wu, N. Singh, O. V. Naidenko, T. Miura, T. Haba, D. C. Scherer, J. Wei, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med 7:1052*.

Horwitz, R. J., and W. W. Busse. 1995. Inflammation and asthma. *Clin Chest Med 16:583*.

Huber, H. L., Koessler, K. K. 1922. The pathologie of fatal asthma. *Arch Intern Med 30:689.*

Humbles, A. A., C. M. Lloyd, S. J. McMillan, D. S. Friend, G. Xanthou, E. E. McKenna, S. Ghiran, N. P. Gerard, C. Yu, S. H. Orkin, and C. Gerard. 2004. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science 305:1776*.

Hurst, S. D., T. Muchamuel, D. M. Gorman, J. M. Gilbert, T. Clifford, S. Kwan, S. Menon, B. Seymour, C. Jackson, T. T. Kung, J. K. Brieland, S. M. Zurawski, R. W. Chapman, G. 2002. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol 169:443.*

Imai, K., M. Kanno, H. Kimoto, K. Shigemoto, S. Yamamoto, and M. Taniguchi. 1986. Sequence and expression of transcripts of the T-cell antigen receptor alpha-chain gene in a functional, antigen-specific suppressor-T-cell hybridoma. *Proc Natl Acad Sci U S A 83:8708*.

Ishimitsu, R., T. Yajima, H. Nishimura, H. Kawauchi, and Y. Yoshikai. 2003. NKT cells are dispensable in the induction of oral tolerance but are indispensable in the abrogation of oral tolerance by prostaglandin E. *Eur J Immunol 33:183*.

Ishizaka, K., T Ishizaka, M.M. Hornbrook. 1996. Physico-chemical propertiesof human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J Immunol 97:75*.

Iwasaki, H., S. Mizuno, R. Mayfield, H. Shigematsu, Y. Arinobu, B. Seed, M. F. Gurish, K. Takatsu, and K. Akashi. 2005. Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med 201:1891*.

Jahng, A. W., I. Maricic, B. Pedersen, N. Burdin, O. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and V. Kumar. 2001. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med 194:1789*.

James, A. 2005. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med 11:1*.

Jiang, S., D. S. Game, D. Davies, G. Lombardi, and R. I. Lechler. 2005. Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur J Immunol 35:1193*.

Jordan, M. S., A. Boesteanu, A. J. Reed, A. L. Petrone, A. E. Holenbeck, M. A. Lerman, A. Naji, and A. J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol 2:301*.

Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, P. D. Collins, D. T. Walsh, R. Moqbel, N. F. Totty, O. Truong, J. J. Hsuan, and T. J. Williams. 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J Exp Med 179:881*.

Justice, J. P., M. T. Borchers, J. R. Crosby, E. M. Hines, H. H. Shen, S. I. Ochkur, M. P. McGarry, N. A. Lee, and J. J. Lee. 2003. Ablation of eosinophils leads to a reduction of allergen-induced pulmonary pathology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:L169*.

Kakimi, K., L. G. Guidotti, Y. Koezuka, and F. V. Chisari. 2000. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med 192:921*.

Kalliomaki, M., S. Salminen, H. Arvilommi, P. Kero, P. Koskinen, and E. Isolauri. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet 357:1076*.

Kawaguchi, M., F. Kokubu, H. Kuga, S. Matsukura, H. Hoshino, K. Ieki, T. Imai, M. Adachi, and S. K. Huang. 2001. Modulation of bronchial epithelial cells by IL-17. *J Allergy Clin Immunol 108:804*.

Kawano, T., J. Cui, Y. Koezuka, I. Toura, Y. Kaneko, H. Sato, E. Kondo, M. Harada, H. Koseki, T. Nakayama, Y. Tanaka, and M. Taniguchi. 1998. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 95:5690*.

Kearley, J., J. E. Barker, D. S. Robinson, and C. M. Lloyd. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med 202:1539*.

Kennedy, M. K., M. Glaccum, S. N. Brown, E. A. Butz, J. L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C. R. Willis, K. Brasel, P. J. Morrissey, K. Stocking, J. C. Schuh, S. Joyce, and J. J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med 191:771*.

Kim, J. O., D. H. Kim, W. S. Chang, C. Hong, S. H. Park, S. Kim, and C. Y. Kang. 2004. Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model. *J Allergy Clin Immunol 114:1332*.

Kinjo, Y., D. Wu, G. Kim, G. W. Xing, M. A. Poles, D. D. Ho, M. Tsuji, K. Kawahara, C. H. Wong, and M. Kronenberg. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature 434:520*.

Kitamura, H., K. Iwakabe, T. Yahata, S. Nishimura, A. Ohta, Y. Ohmi, M. Sato, K. Takeda, K. Okumura, L. Van Kaer, T. Kawano, M. Taniguchi, and T. Nishimura. 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med 189:1121*.

Klenerman, P., V. Cerundolo, and P. R. Dunbar. 2002. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nat Rev Immunol 2:263*.

Koch, M., M. Witzenrath, C. Reuter, M. Herma, H. Schutte, N. Suttorp, H. Collins, and S. H. Kaufmann. 2006. Role of Local Pulmonary Interferon Gamma Expression in Murine Allergic Airway Inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. [Epub ahead of print].

Kojo, S., K. Seino, M. Harada, H. Watarai, H. Wakao, T. Uchida, T. Nakayama, and M. Taniguchi. 2005. Induction of regulatory properties in dendritic cells by Valpha14 NKT cells. *J Immunol 175:3648*.

Komai, M., H. Tanaka, T. Masuda, K. Nagao, M. Ishizaki, M. Sawada, and H. Nagai. 2003. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *Br J Pharmacol 138:912*.

Koo, G. C., and J. R. Peppard. 1984. Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma 3:301*.

Korsgren, M., C. G. Persson, F. Sundler, T. Bjerke, T. Hansson, B. J. Chambers, S. Hong, L. Van Kaer, H. G. Ljunggren, and O. Korsgren. 1999. Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J Exp Med 189:553*.

Kotsianidis, I., J. D. Silk, E. Spanoudakis, S. Patterson, A. Almeida, R. R. Schmidt, C. Tsatalas, G. Bourikas, V. Cerundolo, I. A. Roberts, and A. Karadimitris. 2006. Regulation of hematopoiesis in vitro and in vivo by invariant NKT cells. *Blood 107:3138*.

Kronenberg, M., and L. Gapin. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol 2:557*.

Kudlacz, E., C. Whitney, C. Andresen, A. Duplantier, G. Beckius, L. Chupak, A. Klein, K. Kraus, and A. Milici. 2002. Pulmonary eosinophilia in a murine model of allergic inflammation is attenuated by small molecule alpha4beta1 antagonists. *J Pharmacol Exp Ther 301:747*.

Kuperman, D., B. Schofield, M. Wills-Karp, and M. J. Grusby. 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*.

Lack, G., K. L. Bradley, E. Hamelmann, H. Renz, J. Loader, D. Y. Leung, G. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Nebulized IFN-gamma inhibits the development of secondary allergic responses in mice. *J Immunol 157:1432*.

Laloux, V., L. Beaudoin, D. Jeske, C. Carnaud, and A. Lehuen. 2001. NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J Immunol 166:3749*.

Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol 3:994*.

Lantz, O., and A. Bendelac. 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med 180:1097*.

Lantz, O., L. I. Sharara, F. Tilloy, A. Andersson, and J. P. DiSanto. 1997. Lineage relationships and differentiation of natural killer (NK) T cells: intrathymic selection and interleukin (IL)-4 production in the absence of NKR-P1 and Ly49 molecules. *J Exp Med 185:1395*.

Latour, S., and A. Veillette. 2004. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol 16:409*.

Lee, J. J., D. Dimina, M. P. Macias, S. I. Ochkur, M. P. McGarry, K. R. O'Neill, C. Protheroe, R. Pero, T. Nguyen, S. A. Cormier, E. Lenkiewicz, D. Colbert, L. Rinaldi, S. J. Ackerman, C. G. Irvin, and N. A. Lee. 2004. Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science 305:1773*.

Lee, J., W. H. Ho, M. Maruoka, R. T. Corpuz, D. T. Baldwin, J. S. Foster, A. D. Goddard, D. G. Yansura, R. L. Vandlen, W. I. Wood, and A. L. Gurney. 2001. IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *J Biol Chem 276:1660*.

Leite-de-Moraes, M. C., A. Herbelin, J. M. Gombert, A. Vicari, M. Papiernik, and M. Dy. 1997. Requirement of IL-7 for IL-4-producing potential of MHC class I-selected CD4-CD8-TCR alpha beta+ thymocytes. *Int Immunol 9:73*.

Leite-De-Moraes, M. C., G. Moreau, A. Arnould, F. Machavoine, C. Garcia, M. Papiernik, and M. Dy. 1998. IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur J Immunol 28:1507*.

Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, A. Arnould, F. Machavoine, Y. Koezuka, E. Schneider, A. Herbelin, and M. Dy. 1999. A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol 163:5871*.

Leite-De-Moraes, M. C., A. Hameg, M. Pacilio, Y. Koezuka, M. Taniguchi, L. Van Kaer, E. Schneider, M. Dy, and A. Herbelin. 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*.

Leite-de-Moraes, M. C., M. Lisbonne, A. Arnould, F. Machavoine, A. Herbelin, M. Dy, and E. Schneider. 2002. Ligand-activated natural killer T lymphocytes promptly produce IL-3

and GM-CSF in vivo: relevance to peripheral myeloid recruitment. *Eur J Immunol 32:1897*.

Leonard, W. J., E. W. Shores, and P. E. Love. 1995. Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development. *Immunol Rev 148:97*.

Lewkowich, I. P., N. S. Herman, K. W. Schleifer, M. P. Dance, B. L. Chen, K. M. Dienger, A. A. Sproles, J. S. Shah, J. Kohl, Y. Belkaid, and M. Wills-Karp. 2005. CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *J Exp Med 202:1549*.

Lisbonne, M., S. Diem, A. de Castro Keller, J. Lefort, L. M. Araujo, P. Hachem, J. M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. Taniguchi, P. Van Endert, M. Dy, P. Askenase, M. Russo, B. B. Vargaftig, A. Herbelin, and M. C. Leite-de-Moraes. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J Immunol 171:1637*.

Lisbonne, M., and M. C. Leite-de-Moraes. 2003. Invariant Valpha14 NKT lymphocytes: a double-edged immuno-regulatory T cell population. *Eur Cytokine Netw 14:4*.

Lisbonne, M., P. Hachem, M. B. Tonanny, J. M. Fourneau, S. Sidobre, M. Kronenberg, P. Van Endert, M. Dy, E. Schneider, and M. C. Leite-de-Moraes. 2004. In vivo activation of invariant V alpha 14 natural killer T cells by alpha-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity. *Eur J Immunol 34:1381*.

Liu, R., A. La Cava, X. F. Bai, Y. Jee, M. Price, D. I. Campagnolo, P. Christadoss, T. L. Vollmer, L. Van Kaer, and F. D. Shi. 2005. Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia. *J Immunol 175:7898*.

MacGlashan, D., Jr. 1994. Signal transduction: mechanisms in basophils. *J Allergy Clin Immunol 94:1146*.

Maddox, L., and D. A. Schwartz. 2002. The pathophysiology of asthma. *Annu Rev Med 53:477*.

Makino, Y., R. Kanno, T. Ito, K. Higashino, and M. Taniguchi. 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *Int Immunol 7:1157*.

Mallevaey, T., J. P. Zanetta, C. Faveeuw, J. Fontaine, E. Maes, F. Platt, M. Capron, M. L. de-Moraes, and F. Trottein. 2006. Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni. *J Immunol 176:2476*.

Mars, L. T., V. Laloux, K. Goude, S. Desbois, A. Saoudi, L. Van Kaer, H. Lassmann, A. Herbelin, A. Lehuen, and R. S. Liblau. 2002. Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol 168:6007*.

Marshall, G. D. 2004. Internal and external environmental influences in allergic diseases. *J Am Osteopath Assoc 104:S1*.

Matsuda, J. L., L. Gapin, S. Sidobre, W. C. Kieper, J. T. Tan, R. Ceredig, C. D. Surh, and M. Kronenberg. 2002. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol 3:966*.

Matsuda, J. L., and L. Gapin. 2005. Developmental program of mouse Valpha14i NKT cells. *Curr Opin Immunol 17:122*.

Matsuda, H., T. Suda, J. Sato, T. Nagata, Y. Koide, K. Chida, and H. Nakamura. 2005. alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol 33:22*.

Mattes, J., M. Yang, S. Mahalingam, J. Kuehr, D. C. Webb, L. Simson, S. P. Hogan, A. Koskinen, A. N. McKenzie, L. A. Dent, M. E. Rothenberg, K. I. Matthaei, I. G. Young, and P. S. Foster. 2002. Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J Exp Med 195:1433*.

Mattner, J., K. L. Debord, N. Ismail, R. D. Goff, C. Cantu, 3rd, D. Zhou, P. Saint-Mezard, V. Wang, Y. Gao, N. Yin, K. Hoebe, O. Schneewind, D. Walker, B. Beutler, L. Teyton, P. B. Savage, and A. Bendelac. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature 434:525*.

McNagny, K., and T. Graf. 2002. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med 195:F43*.

Metcalfe, D. D., D. Baram, and Y. A. Mekori. 1997. Mast cells. *Physiol Rev 77:1033*.

Meyer, E. H., S. Goya, O. Akbari, G. J. Berry, P. B. Savage, M. Kronenberg, T. Nakayama, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2006. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Mishra, A., S. P. Hogan, E. B. Brandt, N. Wagner, M. W. Crossman, P. S. Foster, and M. E. Rothenberg. 2002. Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking. *J Biol Chem 277:4406*.

Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura. 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature 413:531*.

Morishima, Y., Y. Ishii, T. Kimura, A. Shibuya, K. Shibuya, A. E. Hegab, T. Iizuka, T. Kiwamoto, Y. Matsuno, T. Sakamoto, A. Nomura, M. Taniguchi, and K. Sekizawa. 2005. Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol 35:2803*.

Morita, M., K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koezuka, E. Kobayashi, and H. Fukushima. 1995. Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med Chem 38:2176*.

Nakajima, H., I. Iwamoto, and S. Yoshida. 1993. Aerosolized recombinant interferon-gamma prevents antigen-induced eosinophil recruitment in mouse trachea. *Am Rev Respir Dis 148:1102*.

Nichols, K. E., J. Hom, S. Y. Gong, A. Ganguly, C. S. Ma, J. L. Cannons, S. G. Tangye, P. L. Schwartzberg, G. A. Koretzky, and P. L. Stein. 2005. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med 11:340*.

Nieuwenhuis, E. E., T. Matsumoto, M. Exley, R. A. Schleipman, J. Glickman, D. T. Bailey, N. Corazza, S. P. Colgan, A. B. Onderdonk, and R. S. Blumberg. 2002. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of Pseudomonas aeruginosa from lung. *Nat Med 8:588*.

Ninan, T. K., and G. Russell. 1992. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *Bmj 304:873*.

Norzila, M. Z., K. Fakes, R. L. Henry, J. Simpson, and P. G. Gibson. 2000. Interleukin-8 secretion and neutrophil recruitment accompanies induced sputum eosinophil activation in children with acute asthma. *Am J Respir Crit Care Med 161:769*.

O'Byrne, P. M., J. Dolovich, and F. E. Hargreave. 1987. Late asthmatic responses. *Am Rev Respir Dis 136:740*.

Oh, J. W., C. M. Seroogy, E. H. Meyer, O. Akbari, G. Berry, C. G. Fathman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2002. CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol 110:460*.

Ohteki, T., S. Ho, H. Suzuki, T. W. Mak, and P. S. Ohashi. 1997. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol 159:5931*.

O.M.S. La pollution de l'air. Genève. 1963.

Pal, E., T. Tabira, T. Kawano, M. Taniguchi, S. Miyake, and T. Yamamura. 2001. Costimulation-dependent modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by ligand stimulation of V alpha 14 NK T cells. *J Immunol 166:662*.

Pasquier, B., L. Yin, M. C. Fondaneche, F. Relouzat, C. Bloch-Queyrat, N. Lambert, A. Fischer, G. de Saint-Basile, and S. Latour. 2005. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med 201:695*.

Patel, K. D. 1998. Eosinophil tethering to interleukin-4-activated endothelial cells requires both P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood 92:3904*.

Pellicci, D. G., K. J. Hammond, A. P. Uldrich, A. G. Baxter, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway iInvolving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med 195:835*.

Pellicci, D. G., A. P. Uldrich, K. Kyparissoudis, N. Y. Crowe, A. G. Brooks, K. J. Hammond, S. Sidobre, M. Kronenberg, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2003. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol 33:1816*.

Pham-Thi, N., J. de Blic, M. Le Bourgeois, M. Dy, P. Scheinmann, and M. C. Leite-de-Moraes. 2006. Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma. *J Allergy Clin Immunol 117:217*.

Pope, S. M., N. Zimmermann, K. F. Stringer, M. L. Karow, and M. E. Rothenberg. 2005. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol 175:5341*.

Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner, and S. P. Balk. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med 178:1*.

Prausnitz, C., H. Küstner. 1921. Studien über Uberempfindlicht. CentralbBaketerial 1 Abt Orig 86:160.

Racila, D. M., and J. N. Kline. 2005. Perspectives in asthma: molecular use of microbial products in asthma prevention and treatment. *J Allergy Clin Immunol 116:1202*.

Ramsey, C. D., and J. C. Celedon. 2005. The hygiene hypothesis and asthma. *Curr Opin Pulm Med 11:14*.

Ranson, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, V. Laloux, A. Lehuen, and J. P. Di Santo. 2003. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A 100:2663*.

Redington, A. E. and P. H. Howarth. 1994. Mast cells, cytokines and asthma. *Can Respir J 1:118*.

Redington, A. E. 2000. Fibrosis and airway remodelling. *Clin Exp Allergy 30 Suppl 1:42*.

Resnick, M. B., and P. F. Weller. 1993. Mechanisms of eosinophil recruitment. *Am J Respir Cell Mol Biol 8:349*.

Rincon, M., J. Anguita, T. Nakamura, E. Fikrig, and R. A. Flavell. 1997. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med 185:461*.

Ronet, C., S. Darche, M. Leite-de-Moraes, S. Miyake, T. Yamamura, J. A. Louis, L. H. Kasper, and D. Buzoni-Gatel. 2005. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against Toxoplasma gondii. *J Immunol 175:899*.

Rothenberg, M. E., and S. P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol 24:147*.

Sagara, H., H. Matsuda, N. Wada, H. Yagita, T. Fukuda, K. Okumura, S. Makino, and C. Ra. 1997. A monoclonal antibody against very late activation antigen-4 inhibits eosinophil accumulation and late asthmatic response in a guinea pig model of asthma. *Int Arch Allergy Immunol 112:287*.

Salter, H. H. 1859. On some points in the treatment and clinical history of asthma. *Edinburgh Medical Journal 4:1109.*

Salter, H. H. 1990. The pathologie of asthma-it's absolute nature. In: Brewis RAL, editor. Classic papers in asthma. London: Science Press Limited. 106.

Schmidt-Supprian, M., J. Tian, E. P. Grant, M. Pasparakis, R. Maehr, H. Ovaa, H. L. Ploegh, A. J. Coyle, and K. Rajewsky. 2004. Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A 101:4566*.

Schmieg, J., G. Yang, R. W. Franck, and M. Tsuji. 2003. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med 198:1631*.

Sen, Y., B. Yongyi, H. Yuling, X. Luokun, H. Li, X. Jie, D. Tao, Z. Gang, L. Junyan, H. Chunsong, X. Zhang, J. Youxin, G. Feili, J. Boquan, and T. Jinquan. 2005. V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement. *J Immunol 175:4914*.

Sertl, K., T. Takemura, E. Tschachler, V. J. Ferrans, M. A. Kaliner, and E. M. Shevach. 1986. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med 163:436*.

Sharif, S., G. A. Arreaza, P. Zucker, Q. S. Mi, J. Sondhi, O. V. Naidenko, M. Kronenberg, Y. Koezuka, T. L. Delovitch, J. M. Gombert, M. Leite-De-Moraes, C. Gouarin, R. Zhu, A. Hameg, T. Nakayama, M. Taniguchi, F. Lepault, A. Lehuen, J. F. Bach, and A. Herbelin. 2001. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med 7:1057*.

Shi, F. D., M. Flodstrom, B. Balasa, S. H. Kim, K. Van Gunst, J. L. Strominger, S. B. Wilson, and N. Sarvetnick. 2001. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A 98:6777*.

Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol 3:135*.

Singh, N., S. Hong, D. C. Scherer, I. Serizawa, N. Burdin, M. Kronenberg, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 1999. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol 163:2373*.

Singh, A. K., M. T. Wilson, S. Hong, D. Olivares-Villagomez, C. Du, A. K. Stanic, S. Joyce, S. Sriram, Y. Koezuka, and L. Van Kaer. 2001. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med 194:1801*.

Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe, and D. I. Godfrey. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med 191:661*.

Smyth, M. J., N. Y. Crowe, and D. I. Godfrey. 2001. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol 13:459*.

Smyth, M. J., N. Y. Crowe, Y. Hayakawa, K. Takeda, H. Yagita, and D. I. Godfrey. 2002. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol 14:165*.

Spoelstra, F. M., D. S. Postma, H. Hovenga, J. A. Noordhoek, and H. F. Kauffman. 1999. Interferon-gamma and interleukin-4 differentially regulate ICAM-1 and VCAM-1 expression on human lung fibroblasts. *Eur Respir J 14:759*.

Stock, P., O. Akbari, G. Berry, G. J. Freeman, R. H. Dekruyff, and D. T. Umetsu. 2004. Induction of T helper type 1-like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyper-reactivity. *Nat Immunol 5:1149*.

Strachan, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj 299:1259*.

Suda, T., K. McCarthy, Q. Vu, J. McCormack, and E. E. Schneeberger. 1998. Dendritic cell precursors are enriched in the vascular compartment of the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol 19:728*.

Sudo, N., X. N. Yu, Y. Aiba, N. Oyama, J. Sonoda, Y. Koga, and C. Kubo. 2002. An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clin Exp Allergy 32:1112*.

Sykes, M. 1990. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol 145:3209*.

Tager, A. M., J. H. Dufour, K. Goodarzi, S. D. Bercury, U. H. von Andrian, and A. D. Luster. 2000. BLTR mediates leukotriene B(4)-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J Exp Med 192:439*.

Takahashi, T., S. Chiba, M. Nieda, T. Azuma, S. Ishihara, Y. Shibata, T. Juji, and H. Hirai. 2002. Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol 168:3140*.

Tillie-Leblond, I., C. Iliescu, and A. Deschildre. 2004. [Physiopathology of inflammatory events in asthma]. *Arch Pediatr 11 Suppl 2:58s*.

Toura, I., T. Kawano, Y. Akutsu, T. Nakayama, T. Ochiai, and M. Taniguchi. 1999. Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol 163:2387*.

Townsend, M. J., A. S. Weinmann, J. L. Matsuda, R. Salomon, P. J. Farnham, C. A. Biron, L. Gapin, and L. H. Glimcher. 2004. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity 20:477*.

Twentyman, O. P., J. P. Finnerty, and S. T. Holgate. 1991. The inhibitory effect of nebulized albuterol on the early and late asthmatic reactions and increase in airway responsiveness provoked by inhaled allergen in asthma. *Am Rev Respir Dis 144:782*.

Umetsu, D. T., J. J. McIntire, O. Akbari, C. Macaubas, and R. H. DeKruyff. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol 3:715*.

Umetsu, D. T., O. Akbari, and R. H. Dekruyff. 2003. Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol 112:480*.

van der Vliet, H. J., J. W. Molling, B. M. von Blomberg, N. Nishi, W. Kolgen, A. J. van den Eertwegh, H. M. Pinedo, G. Giaccone, and R. J. Scheper. 2004. The immunoregulatory role of CD1d-restricted natural killer T cells in disease. *Clin Immunol 112:8*.

Van Eerdewegh, P., R. D. Little, J. Dupuis, R. G. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. P. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. G. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. M. Allen, A. Pedan, M. R. Danzig, S. P. Umland, R. W. Egan, F. M. Cuss, S. Rorke, J. B. Clough, J. W. Holloway, S. T. Holgate, and T. P. Keith. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature 418:426*.

van Rijt, L. S., and B. N. Lambrecht. 2001. Role of dendritic cells and Th2 lymphocytes in asthma: lessons from eosinophilic airway inflammation in the mouse. *Microsc Res Tech 53:256*.

van Rijt, L. S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med 201:981*.

van Rijt, L. S., and B. N. Lambrecht. 2005. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy 35:1125*.

Vicari, A. P., A. Herbelin, M. C. Leite-de-Moraes, U. Von Freeden-Jeffry, R. Murray, and A. Zlotnik. 1996. NK1.1+ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int Immunol 8:1759*.

Walter, D. M., J. J. McIntire, G. Berry, A. N. McKenzie, D. D. Donaldson, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol 167:4668*.

Walter, D. M., C. P. Wong, R. H. DeKruyff, G. J. Berry, S. Levy, and D. T. Umetsu. 2001 b. Il-18 gene transfer by adenovirus prevents the development of and reverses established allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol 166:6392*.

Wang, B., Y. B. Geng, and C. R. Wang. 2001. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med 194:313*.

Wills-Karp, M., and C. L. Karp. 2004. Biomedicine. Eosinophils in asthma: remodeling a tangled tale. *Science 305:1726*.

Wu, D. Y., N. H. Segal, S. Sidobre, M. Kronenberg, and P. B. Chapman. 2003. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med 198:173*.

Yoshimoto, T., and W. E. Paul. 1994. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med 179:1285*.

Yoshimoto, T., A. Bendelac, J. Hu-Li, and W. E. Paul. 1995. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci U S A 92:11931*.

Zajonc, D. M., C. Cantu, 3rd, J. Mattner, D. Zhou, P. B. Savage, A. Bendelac, I. A. Wilson, and L. Teyton. 2005. Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor. *Nat Immunol 6:810*.

Zannolli, R., and G. Morgese. 1997. Does puberty interfere with asthma? *Med Hypotheses 48:27*.

Zhang, S., H. Smartt, S. T. Holgate, and W. R. Roche. 1999. Growth factors secreted by bronchial epithelial cells control myofibroblast proliferation: an in vitro co-culture model of airway remodeling in asthma. *Lab Invest 79:395*.

Zhou, D., J. Mattner, C. Cantu, 3rd, N. Schrantz, N. Yin, Y. Gao, Y. Sagiv, K. Hudspeth, Y. P. Wu, T. Yamashita, S. Teneberg, D. Wang, R. L. Proia, S. B. Levery, P. B. Savage, L. Teyton, and A. Bendelac. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science 306:1786*.

Zhu, Z., T. Zheng, R. J. Homer, Y. K. Kim, N. Y. Chen, L. Cohn, Q. Hamid, and J. A. Elias. 2004. Acidic mammalian chitinase in asthmatic Th2 inflammation and IL-13 pathway activation. *Science 304:1678*.

Zimmer, M. I., A. Colmone, K. Felio, H. Xu, A. Ma, and C. R. Wang. 2006. A cell-type specific CD1d expression program modulates invariant NKT cell development and function. *J Immunol 176:1421*.

Zlotnik, A., D. I. Godfrey, M. Fischer, and T. Suda. 1992. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol 149:1211*.

Zurawski, and R. L. Coffman. 2002. New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. *J Immunol 169:443*.

Asthma is a manifold syndrome consisting in eosinophil-rich airway inflammation, bronchospasm and airway hyperreactivity (AHR), which has recently increased dramatically in prevalence in the industrialized world. In the past few decades it has become clear that the pathogenesis and severity of asthma are mediated through T helper 2 (Th2) lymphocytes. However, the immunological mechanisms that downmodulate or amplify the development of this disease are poorly understood. In our study we highlighted the critical influence of invariant Natural Killer T (iNKT) cells in the severity of experimental allergic asthma. iNKT cells constitute a distinctive population of mature T lymphocytes positively selected by the non-polymorphic MHC class-I-like molecule, CD1d. These lymphocytes coexpress a highly restricted T-cell receptor (TCR) repertoire, composed of a single invariant Vα14Jα18 chain in mice and a Vα24Jα18 chain in humans, preferentially paired with a limited TCR Vβ chain repertoire. iNKT cells specifically recognize glycolipids such as the α-galactosylceramide (α-GalCer). The spectrum of actions attributed to iNKT cells is particularly broad. They are implicated in controlling immune responses against infections, autoimmune diseases, contact sensitivity and tumors.

Here, we found that Th2-type asthma was attenuated in iNKT cell-deficient $J\alpha18^{-/-}$ mice, which had been immunized and challenged with ovalbumin (OVA) to elicit hyperimmune allergic asthma. OVA airway-challenged iNKT-deficient ($J\alpha18^{-/-}$) mice had significantly reduced IL-4 and IL-5 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), decreased serum IL-5 and anti-OVA IgE antibodies, inhibited eosinophilic airway inflammation, and reduced airway hyperreactivity (AHR), the major symptom of asthma, compared to wild-type mice. Adoptive transfer of wild-type iNKT-enriched splenic cells into immunized and boosted $J\alpha18^{-/-}$ mice confirmed the involvement of iNKT cells in this model.

Based on our findings showing the requirement of iNKT cells in the severity of allergic asthma, we further examined whether α-GalCer treatment could influence asthma development. We found that a single i.v. injection of α-GalCer, 1 h before the first airway allergen challenge of OVA-sensitized mice, abrogates elicitation of AHR, airway eosinophilia, IL-4 and IL-5 production in BALF, and specific anti-OVA IgE antibodies. Further, α-GalCer administered intranasally also strongly inhibited the major symptoms of asthma in sensitized and challenged mice. This protection can be transferred to OVA-sensitized recipients mice by splenocytes from OVA-sensitized, α-GalCer treated mice. The role of IFN-γ from iNKT cells in protection was shown by adoptive transfer of sorted iNKT cells from OVA-sensitized and α-GalCer-treated mice which protected immunized recipients from manifesting asthma by an IFN-γ-dependent pathway.

In conclusion, our findings demonstrate that iNKT cells could either aggravate the symptoms of asthma intrinsically by promoting Th2-type cytokine production or exert a protective pro-Th1 effect when stimulated exogenously by α-GalCer, which induces a preferential production of IFN-γ. Therefore, our results raise the possibility that local α-GalCer treatment, acting specifically on iNKT cells, might provide novel therapeutic strategies to reduce allergic asthma.

Key words: Asthma, eosinophils, iNKT cell, α-GalCer, IFN-γ.

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes dont l'incidence a augmenté dramatiquement au cours de ces deux dernières décennies. Chez les individus sensibles, cette inflammation induit des épisodes de sifflements récurrents, une oppression thoracique, une sécrétion de mucus ainsi qu'une obstruction des voies respiratoires, un recrutement éosinophilique et une hyperréactivité broncho-pulmonaire (HRB). Les avancées dans la compréhension de la physiopathologie de l'asthme ont été réalisées grâce aux modèles expérimentaux murins. Ces travaux ont mis en évidence le rôle de différentes cellules dans l'immunorégulation de l'inflammation bronchique, notamment les lymphocytes T de type Th2. Toutefois, les mécanismes immunologiques impliqués dans la protection ou l'exacerbation de la maladie sont encore peu connus. Au cours de notre étude, nous avons mis en évidence l'influence de cellules Natural Killer T invariantes (iNKT) dans le développement de l'asthme allergique expérimental. Les cellules iNKT représentent une population immunorégulatrice de lymphocytes T, caractérisée par l'expression d'une chaîne alpha invariante du TCR (Vα14Jα18 et Vα24Jα18, respectivement chez la souris et chez l'homme) qui est positivement sélectionnée par la molécule CD1d. Ces cellules synthétisent rapidement et massivement de nombreuses cytokines, comme l'IL-4 et l'IFN-γ, lorsqu'elles sont simulées par l'α-galactosylcéramide (α-GalCer), glycolipide reconnu spécifiquement par les lymphocytes iNKT. Le spectre d'action attribué aux cellules iNKT est particulièrement large. Elles sont impliquées dans le contrôle des réponses immunes contre des infections, des maladies autoimmunes, des modèles de contact de sensibilité et des tumeurs.

En utilisant un modèle où les souris sont immunisées de façon systémique par l'ovalbumine (OVA) et ensuite stimulées au niveau des voies aériennes par ce même antigène (étape désignée comme « challenge »), nous avons démontré que les cellules iNKT sont impliquées dans la sévérité de l'asthme allergique expérimental. En effet, divers symptômes de l'asthme sont diminués chez les souris déficientes en cellules iNKT ($J\alpha18^{-/-}$), notamment, l'inflammation éosinophilique, la production de cytokines de type Th2, comme l'IL-4 et l'IL-5, la sécrétion d'IgE et l'HRB. L'implication des cellules iNKT dans la sévérité de l'asthme a été confirmée puisque le transfert adoptif des cellules iNKT à des souris $J\alpha18^{-/-}$ rétablit les symptômes décrits ci-dessus.

En nous basant sur ces résultats, nous nous sommes demandés si nous pourrions modifier la sévérité de l'asthme allergique en agissant sur les lymphocytes iNKT. Pour cela, nous avons traité des souris par l'α-GalCer. Nous avons ainsi démontré qu'une seule injection d'α-GalCer 1 h avant le premier challenge intranasal à des souris précédemment immunisées inhibait la totalité des symptômes de l'asthme. L'administration intranasal de l'α-GalCer inhibe les symptômes de l'asthme chez les souris immunisées et provoquées par l'OVA. Cette protection peut être transférée chez des souris immunisées grâce à des cellules en provenance de souris traitées par l'α-GalCer. L'implication de l'IFN-γ dans cette protection a été mise en évidence par des anticorps neutralisants, ainsi que par le transfert de cellules iNKT en provenance de souris IFN-$\gamma^{-/-}$.

En conclusion, nos résultats démontrent que les cellules iNKT sont impliquées dans la sévérité de l'asthme allergique expérimental en activant la sécrétion de cytokines de type Th2 et que le traitement par l'α-GalCer, qui agit spécifiquement sur les lymphocytes iNKT, inhibe le développement de la maladie en induisant la sécrétion d'IFN-γ. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'α-GalCer pourrait constituer un nouvel outil thérapeutique dans le traitement de l'asthme allergique.

Mots clés : Asthme, éosinophiles, cellules iNKT, α-GalCer, IFN-γ.