



Rôle de Fc epsilon RI, CD16 et PPAR-alpha dans la dermatite atopique

Georges Abboud

► To cite this version:

Georges Abboud. Rôle de Fc epsilon RI, CD16 et PPAR-alpha dans la dermatite atopique. Immunologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00285004

HAL Id: tel-00285004

<https://theses.hal.science/tel-00285004>

Submitted on 4 Jun 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université du Droit et de la Santé de Lille

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE 2

Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Georges Abboud

Le 15 mai 2008

Rôle de FcεRI, CD16 et PPAR- α dans la dermatite atopique

Devant le jury composé de :

Président Professeur Monique Capron

**Rapporteurs Docteur Marc Daëron
Docteur Renato Monteiro**

Examinateur Docteur David Dombrowicz

**Inserm U547 – Université Lille 2
Institut Pasteur de Lille
Professeur Monique Capron**

Thèse dirigée par le Docteur David Dombrowicz

A ma famille qui m'a soutenu tout au long de mes études

A mon papa, tu me manques...

A Madame le Professeur Monique Capron

Merci de m'avoir si chaleureusement accueilli au sein de votre laboratoire. Je ne saurais oublier votre soutien, vos compétences scientifiques et votre dynamisme qui m'ont été précieux pour l'accomplissement de ce travail. Je vous adresse ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur le Docteur David Dombrowicz

Je ne saurais jamais assez te remercier de m'avoir accueilli au sein du groupe que tu animes avec un grand professionnalisme. Pendant ces années de thèse tu m'as appris, le raisonnement scientifique essentiel pour mener à bien un projet de recherche, à être autonome et surtout de me communiquer ta passion pour la recherche. Que ce mémoire soit le témoignage de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Marc Daëron

Merci d'avoir accepté de porter votre jugement sur ce travail, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Renato Monteiro

Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse, soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Jamal Khalife

Merci pour ta gentillesse, pour ton aide et pour les conseils que tu m'as donnés tout au long de ma thèse.

A Madame le Docteur Colette Dissous

Merci pour les conseils que tu m'as donnés tout au long de ma thèse. Merci pour ta gentillesse.

Aux Messieurs les Docteurs Ray Pierce et Eric Viscogliosi

Merci pour votre gentillesse

Aux Mesdames les Docteurs Christelle Faveeuw, Christine Pierrot et Christine Coustau

Merci pour votre gentillesse

A tous mes collègues et mes amis : Marwan, Hussein, Fanny, Virginie, Sylvie, Estelle, Emilie, Richard, J2, Billy, Nadjoula, Wassoumeh, Helena, Gio, Clealita, Mimi, Jo, Jojo, Jacco, Ramirez, Nathalou, Maria, Claudine, Nadine, Pilou, Jean-Loup... aux agents de sécurité

Un grand merci du fond du coeur

Table des matières

RESUME.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCTION.....	3
I. Les Immunoglobulines et les Récepteurs au Fragment Fc (FcR).....	3
1. Les immunoglobulines.....	3
1.1. Synthèse des chaînes lourdes γ, α, ε et commutation isotypique.....	3
2. Les FcR.....	5
2.2. FcγR.....	6
2.3. FcαRI.....	6
2.4. Fcα/μR, pIgR et FcRn.....	7
2.5. FcRH.....	7
3. FcεRI.....	9
3.1. Structure.....	9
3.2. Interaction FcεRI/ IgE.....	10
3.3. Distribution cellulaire.....	13
3.3.1. Mastocytes et basophiles.....	13
3.3.1.1. Hypersensibilité immédiate.....	14
3.3.1.2. Hypersensibilité cutanée chronique.....	16
3.3.2. APC, Granulocytes, Plaquettes.....	16
3.3.2.1. Présentation antigénique.....	16
3.3.2.2 Immunité anti-parastitaire et anti-tumorale.....	17
3.4.3. Effets de FcεRI indépendants de l'antigène.....	18
3.4. Signalisation.....	19
3.5. Régulation négative de l'activité de FcεRI.....	21
4. CD23.....	22
4.1. Forme soluble et interaction avec l'IgE.....	22
4.2. Distribution cellulaire et rôle dans la présentation antigénique facilitée.....	24
4.3. Régulation de la synthèse d'IgE.....	25
4.4. CD23, transport de l'IgE à travers l'épithélium.....	27
4.5. Signalisation après activation du CD23 membranaire.....	27

5. FcγRIII/CD16.....	28
5.1. Interaction avec l'IgG₁.....	28
5.2. Distribution cellulaire et fonctions.....	29
5.2.1. Anaphylaxie et réaction d'Arthus.....	29
5.2.2. Présentation antigénique et rôle dans l'asthme allergique.....	30
5.2.3. Phagocytose et cytotoxicité.....	30
5.2.4. Pathologies autoimmunes.....	31
5.3. Signalisation et régulation.....	32
II. PPAR.....	33
1. Structure, interactions moléculaires et fonctions.....	33
2. PPAR et système immunitaire.....	35
3. PPAR et peau	36
III. La dermatite atopique.....	38
1. Immunopathologie.....	38
2. Dermatite atopique et gène de susceptibilité.....	40
3. Fc récepteurs et atopie.....	40
3.1. Polymorphismes de FcϵRIα et FcRβ.....	40
3.2. CD23, atopie et polymorphismes.....	41
3.3. CD16 et dermatite atopique.....	41
4. Dermatite atopique et barrière cutanée.....	41
5. Modèles animaux de dermatite atopique.....	42
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	44
RÉSULTATS.....	45
Résultats non présentés.....	49
DISCUSSION GENERALE.....	50
Perspectives.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	60

Publications

PPAR- α regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis

Delphine Staumont¹, **Georges Abboud**¹, Céline Brénuchon, Akira Kanda, Thomas Roumier, Céline Lavogiez, Sébastien Fleury, Patrick Rémy, Jean-Paul Papin, Justine Bertrand-Michel, François Tercé, Bart Staels, Emmanuel Delaporte, Monique Capron and David Dombrowicz. (¹: equal contribution)

The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 2008 Apr;121(4):962-8.e6. Epub 2008 Feb 4

Fc ϵ RI and Fc γ RIII/CD16 differentially regulate Atopic Dermatitis (submitted for publication)

Georges Abboud¹, Delphine Staumont-Sallé¹, Akira Kanda, Thomas Roumier, Nathalie Deruytter, Céline Lavogiez, Sébastien Fleury, Patrick Rémy, Emmanuel Delaporte, Monique Capron and David Dombrowicz. (¹: equal contribution)

Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice

Macia L., Delacre M., **Abboud G.**, Tan-Sothéra O., Delanoye A., Verwarede C., Saule P. and Wolowczuk I. **The Journal of Immunology.** 2006 Nov 1;177(9):5997-6006

IgE Receptors, Fc ϵ RI and CD23, Differentially Regulate Development of Atopic Dermatitis D. Staumont, **G. Abboud**, S. Fleury, P. Remy, J.P. Papin, E. Delaporte, M. Capron, D. Dombrowicz

Abstract of first Joint Meeting of European National Societies of Immunology, 16th European Congress of Immunology. 2006. (Abstract accepté, article en rédaction)

Abbréviations

AA	Acide aminé
Ag	antigène
APC	« antigen presenting cell », cellule présentatrice d'antigène
FcR	Récepteur pour la portion Fc de l'immunoglobuline
BCR	« B cell receptor », récepteur des cellules B
CD23 et sCD23	Récepteur de faible affinité pour l'IgE et sCD23 étant le CD23 soluble
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DC	« dendritic cell », cellule dendritique
IDEC	« Inflammatory Dendritic Epidermal Cell », DC épidermique inflammatoire
FAP	« Facilitated antigen presentation », présentation antigénique facilitée
FcγR	Récepteur aux IgG
FDC	« Follicular dendritic cell », cellule dendritique folliculaire
IFN-	interféron
Ig	Immunoglobuline
IL-	interleukine
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
LB	lymphocyte B
LC	cellules de Langerhans
LT	lymphocyte T
NF-κB	Nuclear factor- κ B
NK	cellules natural killer
pDC	DC plasmacytoïde
TCR	« T cell receptor », récepteur des cellules T
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
WT	« wild-type », sauvage
VH	« Variable Heavy », domaine variable de la chaîne lourde de l'Ig
VL	« Variable Light », domaine variable de la chaîne légère de l'Ig

Cadres du travail

Laboratoire d'accueil

Ce travail de doctorat a été réalisé à l’Institut Pasteur de Lille – Université Lille 2, au sein de l’unité Inserm 547 « Schistosomiase, Paludisme et Inflammation » dirigée par Madame le Professeur Monique Capron et plus particulièrement dans le groupe de recherche co-dirigé par le Docteur David Dombrowicz et Madame le Professeur Monique Capron.

La thématique de recherche de ce groupe de recherche est centrée sur l’analyse des mécanismes effecteurs et régulateurs de l’immunité au cours de différentes pathologies inflammatoires et allergiques.

Collaborations

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration avec le département de dermatologie, Hôpital Claude Huriez, Lille, ainsi que le Docteur Bart Staels (Institut Pasteur de Lille, Université Lille 2, Inserm U545). L’analyse de la composition lipidique de la peau a été réalisée en collaboration avec le Docteur François Tercé (Université Toulouse III, Inserm U363).

Financement

Ce travail de thèse a été financé par l’Inserm.

RESUME

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire chronique de la peau caractérisée par un épaississement épidermique et un infiltrat dermique de lymphocytes T mémoire activés, macrophages, mastocytes et éosinophiles avec des phases aiguë et chronique associées respectivement à des profils cytokiniques de type Th2 et Th1. Chez la majorité des patients atteints de DA, une augmentation de production d'IgE et IgG totales et spécifiques d'allergènes et d'antigènes microbiens est observée.

Les récepteurs de forte et de faible affinité pour l'IgE, Fc ϵ RI et Fc ϵ RII/CD23 et le récepteur de faible affinité pour l'IgG, Fc γ RIII/CD16, jouent un rôle essentiel dans les maladies allergiques. Dans la peau humaine, ces FcR sont exprimés par des cellules présentatrices d'antigène et des cellules effectrices résidentes ou recrutées au derme durant l'inflammation.

Au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle de ces FcR dans un modèle murin de DA, qui reproduit la pathologie humaine, en comparant des animaux déficients pour ces FcR aux animaux correspondants de type sauvage (WT). Les symptômes de la DA sont complètement absents chez les souris déficientes en FcR γ et partiellement inhibés dans les souris déficientes en Fc ϵ RI ou CD16. Cette inhibition est corrélée avec une augmentation de l'expression cutanée de l'IL-10 et Foxp3. Alors que Fc ϵ RI régule les réponses Th1 et Th2, le recrutement des mastocytes vers les ganglions drainants et la production d'IgE, CD16 régule uniquement la réponse Th2, la prolifération lymphocytaire et la production d'IgG₁. Fc ϵ RI et CD16 régulent spécifiquement la production de leurs ligands en contrôlant respectivement l'expression ganglionnaire d'IL-4 et d'IL-21. D'une façon importante, l'absence de CD23 aboutit à une inhibition drastique de la pathologie cutanée et, comme celle de Fc ϵ RI, à une diminution des réponses cutanées Th1 et Th2 ainsi que de la production sérique de l'IgE mais pas celle de l'IgG₁.

Par ailleurs, nous avons étudié le rôle régulateur du récepteur nucléaire PPAR- α dans ce modèle de DA. En effet, il est exprimé par plusieurs types cellulaires au sein du système immunitaire et possède des propriétés anti-inflammatoires dans d'autres pathologies. Suite à la sensibilisation cutanée, nous avons remarqué que les souris déficientes en PPAR- α montrent une exacerbation des réponses cutanée et pulmonaire, et de la production de l'IgE et IgG_{2a} par rapport aux souris WT. Ce phénomène est corrélé avec une exacerbation des réponses moléculaires cutanées Th2 et surtout Th1 ainsi qu'à une augmentation d'expression de NF- κ B. D'une façon intéressante, l'expression de PPAR- α a été diminuée dans les lésions cutanées de patients atteints de DA suggérant donc que cette diminution d'expression puisse contribuer à la pathologie. Enfin, l'application d'un agoniste spécifique de PPAR- α diminue significativement la pathologie expérimentale.

Nos travaux ont donc précisé la contribution des IgE/Fc ϵ R et IgG/Fc γ R à la physiopathologie de la DA. Ces derniers, comme PPAR- α , constituent des cibles thérapeutiques potentielles pour cette affection.

SUMMARY

Atopic dermatitis (AD) is a common chronic inflammatory skin disease characterized by increased epidermal thickness and a dermal infiltration with activated memory T cells, macrophages, mast cells and eosinophils as well as Th2- and Th1-associated cytokine profiles in acute and chronic skin lesions respectively. Most AD patients show elevated total and allergen- or microbe-specific IgE and IgG levels in serum.

The high and low affinity IgE receptors, Fc ϵ RI and Fc ϵ RII/CD23, and the low affinity IgG receptor, Fc γ RIII/CD16 play an essential role in allergic diseases. In human skin, those FcR are expressed by antigen presenting cells and effector cells resident or recruited into the inflamed dermis.

In this work, we have studied the role of those receptors in a mouse model of AD that mimics the human pathology by comparing FcR-deficient animals with their corresponding WT counterparts. Symptoms of AD are completely absent in FcR γ -deficient animals but only partially inhibited in either Fc ϵ RI- or Fc γ RIII/CD16-deficient animals. This inhibition is correlated with increased skin expression of regulatory IL-10 and Foxp3. While Fc ϵ RI controls both Th1 and Th2 skin response, mast cell recruitment into draining lymph nodes and IgE production, CD16 regulates only Th2 skin response, as well as T cell proliferation and IgG₁ production. This isotype-specific regulation by the cognate FcR is associated to a differential regulation of IL-4 and IL-21 expression in the draining lymph nodes. Importantly, CD23 deficiency also led to a drastic inhibition of the pathology and, like Fc ϵ RI, to decreased Th1 and Th2 skin responses and IgE but not IgG₁ production.

We also investigated the regulatory role of the nuclear receptor PPAR- α in this AD model. Indeed, it is expressed in several cells of the immune system and have anti-inflammatory activities in other pathologies. Upon antigen sensitization, we found that PPAR- α -deficient mice display increased skin and lung responses as well as IgE and IgG_{2a} production compared with their wild-type counterparts. This phenomenon is correlated with an enhancement of Th2 and, to a greater extent, Th1 responses as well as an increased skin expression of nuclear factor- κ B. Interestingly, PPAR- α expression was decreased in eczematous skin from patients with AD compared with skin from nonatopic donors, suggesting that defective PPAR- α expression might contribute to the pathology. Topical application of WY14.643, a specific PPAR- α agonist, significantly decreased antigen-induced skin inflammation in the AD model.

Thus, we have delineated the contribution of IgE/Fc ϵ R and IgG/Fc γ R to AD pathophysiology. Finally, targeting interactions between IgE and its 2 Fc ϵ R, IgG and Fc γ R as well as PPAR- α represent efficient therapeutic strategies for allergic diseases.

INTRODUCTION

I. Les immunoglobulines et les récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines (FcR)

1. Les immunoglobulines

Chez l'homme, il existe 5 classes d'immunoglobuline (Ig) : IgG, IgM, IgA_{1 et 2}, IgE et IgD. On distingue 4 sous-classes d'IgG : IgG₁, IgG₂, IgG₃ et IgG₄ (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} et IgG₃ chez la souris). Les Ig sont toutes des glycoprotéines ayant des structures similaires mais différentes par leur taille, charge, séquence d'acides aminés et leurs glycosylations (Arnold et al., 2006). Elles sont exprimées et sécrétées par les lymphocytes B (LB) activées (Gould and Sutton, 2008). Chaque Ig comporte deux chaînes lourdes identiques (50–77 kDa) et deux chaînes légères identiques (25 kDa) liées par des ponts disulfures et des liaisons non-covalentes. Les classes d'Ig se distinguent les unes des autres par leurs chaînes lourdes (γ , μ , α , ϵ and δ). Il existe deux isoformes de la chaîne légère (λ et κ) (Amzel and Poljak, 1979). Les chaînes lourdes et légères sont composées de domaines de 105–120 acides aminés (AA) arrangés en des structures secondaires (feuilles β).

Pendant la synthèse de l'Ig, des réarrangements géniques et des mutations somatiques produisent de grandes variations dans la séquence d'AA des domaines N-terminaux de la chaîne lourde (VH) et de la chaîne légère (VL) et génèrent une diversité quasi infinie (Odegard and Schatz, 2006). L'Ig comporte deux régions, la région Fab et la région Fc. Fab et Fc sont séparés par une région charnière chez l'IgG, IgA et IgD. La région charnière est remplacée par un domaine additionnel de la chaîne lourde chez l'IgE et l'IgM (Fig.1). Ainsi, par exemple, la chaîne lourde de l'IgE, comporte un domaine C ϵ 2 qui « correspond » à une région charnière pour l'IgG. Les domaines C ϵ 3 et C ϵ 4 sont homologues en séquence et en structure quaternaire aux domaines C γ 2 et C γ 3 de l'IgG (Gould and Sutton, 2008).

1.1. Synthèse des chaînes lourdes, γ , α , ϵ et commutation isotypique

Chez l'homme, les gènes des chaînes lourdes (locus IGH), les gènes des chaînes légères kappa (locus IGK) et les gènes des chaînes légères lambda (locus IGL), sont respectivement situés sur les chromosomes 14 (14q32.3), 2 (2p11.2) et 22 (22q11.2). La synthèse des immunoglobulines nécessite des réarrangements des gènes des loci IGH, IGK et IGL durant la différenciation des lymphocytes B. Juste avant la commutation isotypique,

des réarrangements VDJ du locus IGH de la chaîne lourde (μ) ont lieu. Lors de sa maturation, le lymphocyte passe d'une production d'IgM et d'IgD à la synthèse d'IgG, d'IgE ou d'IgA. Ce processus, qui permet le changement de la région constante de la chaîne lourde tout en maintenant l'expression de la même spécificité de reconnaissance et en renforçant même son affinité, est appelé la "commutation" de classe (ou "switch"). Ceci a lieu grâce à une séquence S (SWITCH) qui est en amont de chaque gène codant pour une chaîne lourde. La commutation de classe réalisée grâce à ces régions S entraîne la délétion des gènes IGHC situés entre l'ensemble V-D-J et le gène IGHC utilisé. Ceci se produit par la formation de boucles de délétion, à la suite du réarrangement entre la séquence $S\mu$ et une autre séquence S (S γ par exemple, dans le cas d'une commutation IgM-IgG). Lors d'une nouvelle commutation, ce gène C γ sera à son tour, éliminé et remplacé par un autre gène IGHC localisé plus en 3'.

L'interaction entre CD40 et CD40L (CD154) est indispensable à la commutation isotypique (Geha et al., 2003). Des cytokines spécifiques de la commutation vers telle ou telle classe ou sous-classe ont été décrites: par exemple IL-4 pour la commutation des IgG₄ et IgE (Homme), IL-4 et IL-13 pour la commutation vers l'IgE (souris) (Barner et al., 1998). La commutation vers l'IgG₁ chez la souris est induite par IL-4, cependant elle ne serait pas dépendante exclusivement de cette cytokine mais aussi de l'IL-21 qui régule différenciellement la production de l'IgE et l'IgG₁ chez la souris. Alors que la production d'IgG₁ est inhibée chez les souris déficientes en le récepteur à l'IL-21 (IL-21R), la production d'IgE est augmentée (Ozaki et al., 2002).

Les centres germinatifs (GC) sont connus en tant que lieu de différenciation de lymphocytes B mémoire. Récemment, il a été démontré que les B IgE⁺ sont exceptionnels car la majorité d'entre eux réside en dehors des GC. Ces cellules suivent un programme de différenciation unique qui comporte deux phases: une phase courte, "pre-IgE", avec production intermédiaire d'IgG₁, au cours de laquelle les hypermutations somatiques et la maturation ont lieu, et une phase de « post-commutation » en IgE avec différenciation des LB en plasmocytes (Erazo et al., 2007).

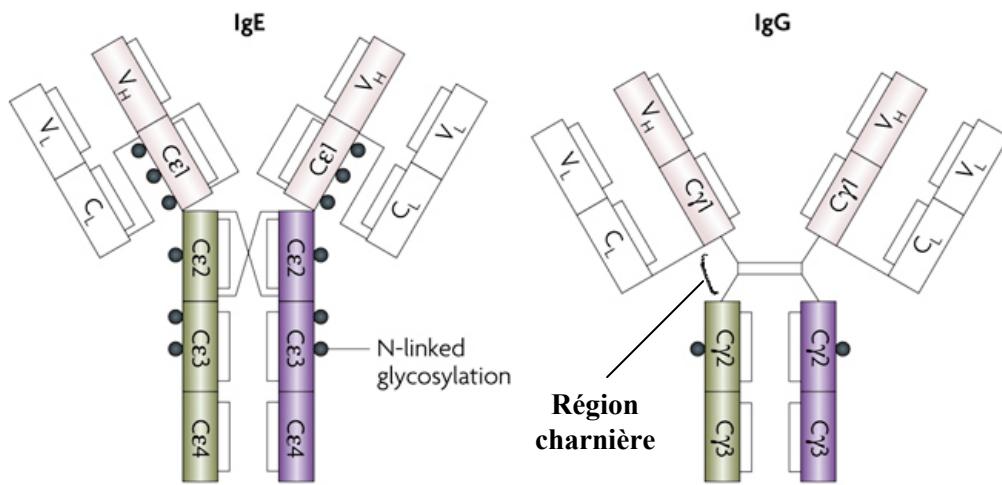


Fig.1. Représentation schématique des IgE et IgG (d'après(Gould and Sutton, 2008)).

Les deux immunoglobulines sont des tétramères composés de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L). Les parties Fab qui contiennent les domaines variables (notés V) des chaînes légères (VL) et lourdes (VH) sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène. Elles comportent également le domaine constant (noté C) de la chaîne légère (CL) et le premier domaine constant de la chaîne lourde (C ϵ 1 ou C γ 1). La partie Fc, site de fixation aux FcR, est uniquement formée des domaines constants des chaînes lourdes. Les IgE contiennent un domaine constant (C ϵ 2) qui remplace la région charnière des IgG. Les domaines C ϵ 3-C ϵ 4 sont les homologues des domaines C γ 2-C γ 3.

2. Les FcR.

L'Ig est bi-fonctionnelle, elle se lie à l'antigène grâce à la partie Fab et interagit avec les récepteurs pour la partie constante (FcR) grâce à sa partie Fc pour déclencher une variété de réponses cellulaires telles que la phagocytose et l'endocytose, la cytotoxicité dépendante des anticorps vis-à-vis de cellules étrangères et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (Gould and Sutton, 2008 ; Monteiro and Van De Winkel, 2003; Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Selon l'isotype d'Ig fixé, on distingue les Fc γ R, Fc ϵ R et Fc α R... Il s'agit généralement de structure multimérique comprenant une sous-unité α , fixant l'Ig et d'un dimère de sous-unités FcR γ essentiel pour la transduction des signaux activateurs (Ernst et al., 1993 ; Pfefferkorn and Yeaman, 1994; Ra et al., 1989 ; Wirthmueller et al., 1992). Les FcR appartiennent généralement à la superfamille des protéines à domaines Ig, à l'exception de CD23 qui est une lectine de type C. Les FcR sont généralement multimériques à l'exception de Fc ϵ RII/CD23, Fc γ RIII/CD16b, Fc γ RII/CD32, Fc α /μR, pIgR et FcRH qui sont constitués d'une seule chaîne (Tableau I).

2.1 Fc ϵ RI

Pour l’IgE, il existe deux FcR : Fc ϵ RI, le récepteur de haute affinité et Fc ϵ RII/CD23, le récepteur de faible affinité (voir plus bas).

2.2. Fc γ R

Chez la souris, la famille des Fc γ R comporte trois récepteurs activateurs Fc γ RI/CD64 (haute affinité), Fc γ RIII/CD16 et Fc γ RIV et un récepteur inhibiteur monomérique, Fc γ RIIb/CD32b (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Il existe deux isoformes prédominants de Fc γ RIIb, Fc γ RIIb1 et Fc γ RIIb2 qui résultent d’un épissage alternatif (Hibbs et al., 1986; Ravetch et al., 1986). CD16, Fc γ RIV et Fc γ RIIb ont une affinité moyenne à faible. Chez la souris, CD16, CD32b et Fc γ RIV peuvent se lier à l’IgE avec une faible affinité (Hirano et al., 2007 ; Takizawa et al., 1992). Fc γ RIV n’est pas présent chez l’homme mais il existe plusieurs autres Fc γ R monomériques: deux récepteurs activateurs Fc γ RIIa et c d’affinité faible à moyenne, et Fc γ RIIIb, inséré dans la membrane cytoplasmique par une ancre « glycosyl-phosphatidylinositol » (GPI), exprimé uniquement sur les neutrophiles, et qui ne transduit pas de signal (Lanier et al., 1989a). Chaque Fc γ R exerce son activité *in vivo* en fixant préférentiellement une sous-classe d’IgG : CD16 et Fc γ RIIb fixent l’IgG₁, CD64 fixe l’IgG_{2a} et Fc γ RIV fixe les IgG_{2a} et IgG_{2b} (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Les Fc γ R activateurs jouent un rôle dans la phagocytose, la présentation antigénique, l’ADCC, la dégranulation cellulaire et la synthèse de cytokines (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

2.3. Fc α RI

Fc α RI/CD89, qui n’existe pas chez la souris, fixe l’IgA monomérique avec une affinité intermédiaire. CD89 est exprimé sur les monocytes/macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules de Kupffer et les cellules dendritiques interstitielles (Monteiro and Van De Winkel, 2003). Ce récepteur sur les neutrophiles est capable de médier la phagocytose bactérienne (Hellwig et al., 2001). Suite à l’agrégation de CD89 sur les DC, ce récepteur est endocyté. Le CD89 permettrait donc aux DC de capter efficacement l’antigène. L’endocytose entraîne également l’activation de ces cellules en provoquant l’augmentation de l’expression membranaire de CD86, CMH II ainsi que la synthèse d’IL-10 (Geissmann et al., 2001). L’incubation en présence de cytokines pro-inflammatoires, de LPS ou du CD40L permet l’augmentation d’expression de CD89 sur les DC (Pasquier et al., 2004). Le CD89 confère aux cellules effectrices qui l’expriment la capacité de

participer à des réactions d'ADCC. Ainsi, les éosinophiles, en interagissant avec l'IgA, peuvent libérer des médiateurs toxiques comme l'ECP (eosinophil cationic protein) capable de tuer des larves de *Schistosoma mansoni* opsonisées par des anticorps (Nuttent et al., 1999).

2.4. Fc α /μR, pIgR et FcRn

Fc α /μR fixe l'IgA et l'IgM monomériques avec une forte affinité (Sakamoto et al., 2001). La structure de son domaine extracellulaire présente une homologie importante avec celle du pIgR, impliqué dans la fixation des IgA et IgM polymériques et leur transport transépithélial pour participer aux défenses immunitaires des muqueuses (Robinson et al., 2001). Fc α /μR est identifié sur une grande variété de tissus chez la souris, comme le thymus, rate, foie, les reins, intestins, testicules et placenta. Il est retrouvé sur les lymphocytes B et les macrophages humains et murins. Il est également présent au niveau transcriptionnel sur les cellules mésangiales humaines stimulées par l'IL-1 (McDonald et al., 2002). Ce récepteur conférerait, aux cellules qui l'expriment, la capacité d'endocytter les bactéries recouvertes d'IgM et son expression au niveau rénal lui permettrait de jouer un rôle dans le développement de la néphropathie à IgA en favorisant le dépôt de complexes immuns à ce niveau (McDonald et al., 2002).

FcRn joue un rôle dans le transport transépithélial des IgG depuis le lait maternel vers la circulation du nouveau-né et, chez l'adulte, régule le catabolisme des IgG (Ghetie and Ward, 2000).

2.5 FcRH

Une nouvelle famille de récepteurs homologues aux FcR a été découverte récemment chez l'homme. Il s'agit des récepteurs FcRH1 à 5, exprimés préférentiellement sur les lymphocytes B matures (Davis et al., 2001). Un sixième membre, FcRH6, est exprimé sur les lymphocytes B aux différents stades de différenciation (Davis et al., 2005).

Nous allons décrire plus en détail Fc ϵ RI, CD23 et Fc γ RIII/CD16, nos travaux ayant principalement porté sur ces récepteurs.

Receptor	Structure and apparent M_r	Affinity for immunoglobulin Mouse	Affinity for immunoglobulin Human	Expression
Fc γ RIIA (CD64)		10^7 – 10^8 M $^{-1}$ to IgG2a>>3,1,2b	10^7 – 10^9 M $^{-1}$ to IgG1>3>4>>2	Macrophage, monocyte, neutrophil, eosinophil, DC
Fc γ RIIA (CD32)		NF	< 10^7 M $^{-1}$ to IgG3>1,2>>4	Macrophage, neutrophil, eosinophil, platelet, DC, LC
Fc γ RIIB (CD32)		< 10^7 M $^{-1}$ to IgG1,2a,2b>>3 3×10^6 M $^{-1}$ to IgE	< 10^7 M $^{-1}$ to IgG3>1>4>2	B cell, mast cell, basophil, macrophage, eosinophil, neutrophil, DC, LC
Fc γ RIIIA (CD16)		< 10^7 M $^{-1}$ to IgG1,2a,2b>>3 5×10^6 M $^{-1}$ to IgE	2×10^7 M $^{-1}$ to IgG1,3>>2,4	Macrophage, monocyte, NK cell, mast cell, eosinophil, DC, LC, neutrophil (mouse)
Fc γ RIIIB (CD16)		NF	< 10^7 M $^{-1}$ to IgG1,3>>2,4	Neutrophil, eosinophil
Fc ϵ RI		> 10^{10} M $^{-1}$ to IgE	> 10^{10} M $^{-1}$ to IgE	Mast cell, basophil, eosinophil, LC (human), DC (human)
Fc ϵ RII (CD23)		10^6 M $^{-1}$ to IgE	10^6 M $^{-1}$ to IgE	Ubiquitous, platelet
Fc α RI (CD89)		NF	2×10^7 M $^{-1}$ to IgA1, IgA2	Macrophage, neutrophil, eosinophil
FcRn		10^6 M $^{-1}$ to rat IgG2a>2b,1,2c	2×10^6 M $^{-1}$ to IgG	Placenta, small intestine, monocyte, DC
Fc α /μR		ND	10^8 M $^{-1}$ to IgM, IgA	B cell, macrophage
Poly-IgR		High, but ND	High, but ND	Epithelium, liver, small intestine, lung
FcRH1–5*		ND	ND	B cell

Tableau 1 : structure et distribution cellulaire des FcRs (d'après (Takai, 2002)).

β2m, β2-microglobuline; DC, dendritic cell; FcRH, Fc-receptor homologue; FcRn, neonatal Fc receptor; GPI, glycosylphosphatidylinositol; Ig, immunoglobuline; LC, Langerhans cell; M_r, masse moléculaire relative; ND, non déterminé; NF, not found (non trouvé) chez la souris; NK, natural killer; poly-IgR, polymeric immunoglobulin receptor. *L'ADN complémentaire des FcRHs code une glycoprotéine transmembranaire type I ayant 3–6 domaines extracellulaires « immunoglobulin-like » et un domaine cytoplasmique contenant un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation) et/ou un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif).

3. Fc ϵ RI

Les IgE, produites par les lymphocytes B, se fixent à Fc ϵ RI avec une haute affinité ($K_D = 10^{-9}$ à 10^{-10} M), avec un rapport stœchiométrique 1 :1. C'est la fixation d'antigènes multivalents à l'IgE fixé à Fc ϵ RI qui permet, généralement l'activation cellulaire. Fc ϵ RI est principalement impliqué dans les réactions allergiques et l'immunité anti-parasitaire (Gould and Sutton, 2008).

3.1. Structure

Chez les rongeurs, Fc ϵ RI est un complexe membranaire tétramérique : Fc ϵ RI α , FcR β et 2 FcR γ ($\alpha\beta\gamma_2$) (Figure 2) (Blank et al., 1989; Kuster et al., 1992). Fc ϵ RI α fixe l'IgE. C'est une protéine transmembranaire formée d'une partie extracellulaire (EC α) qui contient le site de fixation de l'IgE, d'un segment transmembranaire et d'un court segment intracytoplasmique. FcR β et FcR γ représentent le module de signalisation. FcR β est une protéine très hydrophobe qui traverse quatre fois la membrane et dont les extrémités N- et C-terminales sont toutes les deux cytoplasmiques. FcR γ est une protéine transmembranaire dotée d'une très courte portion extracellulaire et d'une région cytoplasmique relativement longue. Les parties cytoplasmiques C-terminales de FcR β et FcR γ contiennent un motif ITAM (Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif) nécessaire à l'activation cellulaire (Daeron, 1997 ; Kraft and Kinet, 2007). FcR β peut également s'associer à Fc γ RIII/CD16 (Dombrowicz et al., 1997; Kurosaki et al., 1992), décrit ultérieurement. FcR γ est commune à Fc ϵ RI, Fc γ RI/CD64, Fc γ RIII/CD16, Fc α RI/CD89, Fc γ RIV. FcR γ peut s'associer au complexe TCR-CD3 (Rodewald et al., 1991). FcR γ est également associée, au niveau des plaquettes, au récepteur du collagène (Glycoprotéine VI-FcR) (Tsuji et al., 1997), et au niveau de la lignée myéloïde et du système osseux à de nombreux récepteurs comme les LIRs (Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor), PIR-A (Kubagawa et al., 1997), les ILT1 et 7 (Leucocyte Ig-like Receptors) (Cao et al., 2006; Nakajima et al., 1999), OSCAR (OSteoClast-Associated Receptor) (Merck et al., 2004) et NKp46 (p46 NK cell activating receptor) (Pessino et al., 1998).

Chez l'homme, Fc ϵ RI peut également exister sous la forme d'un trimère $\alpha\gamma_2$ en l'absence de FcR β sur les monocytes, DC, éosinophiles et plaquettes sanguines (Gounni et al., 1994b ; Joseph et al., 1997; Maurer et al., 1994 ; Maurer et al., 1996 ; Wang et al., 1992). Ces deux formes de Fc ϵ RI humain, $\alpha\gamma_2$ et $\alpha\beta\gamma_2$, ont des caractéristiques

fonctionnelles différentes. Le niveau d'expression du récepteur $\alpha\gamma_2$ à la surface cellulaire est moins important que celui du tétramère, en raison d'un transport intracellulaire du récepteur - du réticulum endoplasmique à la surface de la cellule - moins efficace (Donnadieu et al., 2000). De plus, la capacité du trimère de transmettre le signal d'activation est moindre que celle du tétramère (Dombrowicz et al., 1998; Lin et al., 1996). Ces observations permettent d'attribuer à FcR β un rôle amplificateur de l'expression et de la capacité de signalisation de Fc ϵ RI. Il existe également un variant FcR β_{var} , produit après épissage alternatif, ne contenant pas le motif intracytoplasmique ITAM (Donnadieu et al., 2003), qui inhibe l'expression membranaire du récepteur en inhibant l'expression de Fc ϵ RI α (Fiebiger et al., 2005).

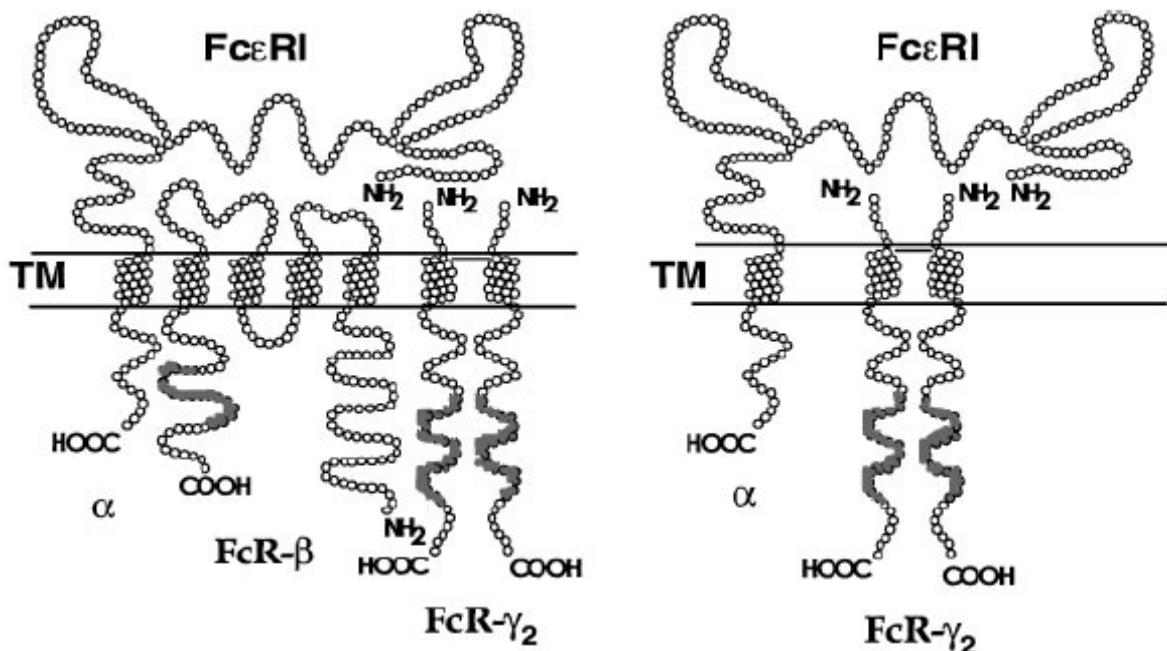


Fig.2. Structure de Fc ϵ RI. (d'après (Kinet, 1999)).

Ce récepteur se trouve sous forme trimérique (à droite) et tétramérique (à gauche) chez l'homme.

3.2. Interaction Fc ϵ RI/ IgE

Les parties C-terminales constantes des chaînes lourdes forment la région Fc de l'IgE et contiennent le site de liaison à Fc ϵ RI. Des études de mutagenèse ont montré qu'il se situe dans le domaine C ϵ 3 et à la jonction C ϵ 2-C ϵ 3 (Henry et al., 1997; Nissim et al., 1991 ; Presta et al., 1993). Sur le récepteur, le site de liaison de l'IgE a été identifié dans la partie extracellulaire de la chaîne α , EC α (Blank et al., 1991; Hakimi et al., 1990). EC α est composée de deux domaines apparentés aux Ig comportant chacun un pont disulfure intra-chaîne. EC α est fortement glycosylée (7 sites de glycosylations) et les chaînes

glycosidiques jouent un rôle lors de la maturation et du transport intracellulaire vers la surface de Fc ϵ RI α , mais n'affectent ni la stabilité de la molécule ni sa capacité à se lier à l'IgE (Blank et al., 1991 ; Letourneur et al., 1995).

La structure tridimensionnelle d'EC α a été déterminée par cristallographie, d'abord seule (Garman et al., 1998), puis en complexe avec l'IgE (Garman et al., 2000). EC α est constituée essentiellement de deux domaines de type immunoglobuline, D1 et D2, présents dans de nombreuses autres protéines (Figure 3A). Les domaines D1 et D2 forment un angle aigu très prononcé, en V inversé, et la surface convexe en partie constituée de D2 représente le site d'interaction avec l'IgE (Figure 3A). La conséquence de cet arrangement en V inversé est l'existence d'une large crevasse tournée vers la membrane plasmique. Les résidus qui en émergent, ont la possibilité d'interagir avec d'autres résidus, exposés à la surface cellulaire et appartenant, par exemple, aux deux boucles extracellulaires de FcR β ou à d'autres molécules et pourraient potentiellement influencer les signaux membranaires.

L'évaluation de la structure du complexe Fc ϵ RI-IgE (Garman et al., 2000) a confirmé que l'IgE se lie bien sur la structure prédictive mais que cette liaison implique deux sites distincts sur EC α (Figure 3B). Le premier site, situé dans D2, comporte, entre autres, un résidu tyrosine qui interagit avec une poche située dans l'un des deux domaines C ϵ 3 et l'une des jonctions C ϵ 2-C ϵ 3 de l'IgE (Figure 3C). Le deuxième site chevauche en partie le premier et se trouve dans D2 et la jonction D1-D2. Il forme une poche pour un résidu proline situé dans l'autre domaine C ϵ 3 de l'IgE. Ce résidu proline interagit en particulier avec deux résidus tryptophanes d'EC α (Figure 3C).

Des études antérieures avaient montré que l'interaction IgE-EC α était monovalente en dépit du fait que l'IgE est un dimère et comporte potentiellement deux sites de liaison identiques pour EC α , un dans chaque chaîne lourde (Mendoza and Metzger, 1976). La structure du complexe entre la portion Fc de l'IgE et d'EC α a fourni l'explication de cette monovalence. Elle est due au fait que les deux chaînes lourdes des IgE sont impliquées dans la liaison au Fc ϵ RI, chacune se liant sur un site distinct, ce qui rend impossible l'interaction avec une deuxième molécule Fc ϵ RI (Figures 3B, 3C).

D'autres caractéristiques de l'interaction IgE-Fc ϵ RI ont été également expliquées par l'étude structurale.

1. La forte affinité de la liaison IgE-Fc ϵ RI est due à la faible vitesse de dissociation, elle-même expliquée par la présence du double site de liaison. En effet, lorsque l'un des sites d'EC α se dissocie de l'IgE, statistiquement l'autre peut rester en place et permettre au premier de se réassocier, et la dissociation du complexe n'est observée que lorsque les

deux sites se détachent simultanément, événement beaucoup moins probable. La présence de nombreux résidus hydrophobes, en particulier de quatre résidus tryptophanes dans les sites d'EC α , et la surface importante de ces sites pourraient aussi contribuer à la forte affinité de l'interaction (Garman et al., 2000).

2. L'étude des cristaux du complexe EC α -IgE a montré que les nombreuses chaînes glycosydiques présentes dans EC α sont toutes situées à distance du site de liaison de l'IgE, ce qui explique pourquoi ces structures ne jouent aucun rôle dans l'interaction (Garman et al., 2000).

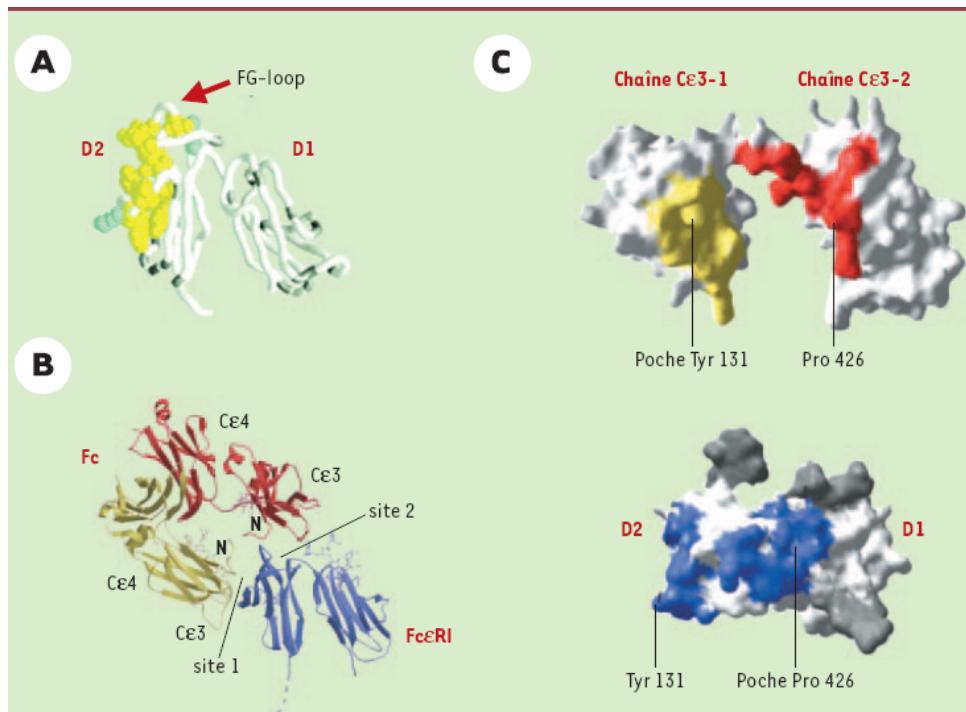


Figure 3. Structure tridimensionnelle du Fc ϵ RI α et du complexe C ϵ 3-C ϵ 4/Fc ϵ RI α (Reproduit de (Garman et al., 2000) et de *Cell* (Garman et al., 1998)). **A.** Structure tridimensionnelle modélisée du Fc ϵ RI α montrant l'angle aigu en V inversé formé par les deux domaines apparentés à la superfamille des Ig (D1 et D2). Les résidus identifiés, par des études de mutagenèse, comme étant impliqués dans la liaison à l'IgE sont représentés en jaune et en bleu. Les sites d'attachement des motifs glycaniques apparaissent en gris. Ils se trouvent tous en dehors de la région formant le site de liaison potentiel. **B.** Structure tridimensionnelle du complexe montrant que le C ϵ 3-C ϵ 4 se lie sur deux sites distincts (site 1 et site 2) du Fc ϵ RI α . L'IgE est représentée en jaune et en rouge, le récepteur en bleu. **C.** Représentation de la surface des deux domaines C ϵ 3 et du Fc ϵ RI α . Les résidus qui deviennent inaccessibles après formation du complexe sont représentés en jaune (site 1) ou en rouge (site 2) dans C ϵ 3. Dans le Fc ϵ RI α , la tyrosine Y131 (site 1) et la poche pour la proline P426 (site 2) sont représentées en bleu. Les résidus des motifs glycaniques sont en gris.

3. Si les études cristallographiques ont confirmé l'absence de changement de conformation d' $\text{EC}\alpha$ lors de la liaison à l'IgE, elles ont démontré au contraire un important changement de configuration de l'IgE (Figure 4) (Sechi et al., 1996 ; Wurzburg et al., 2000).

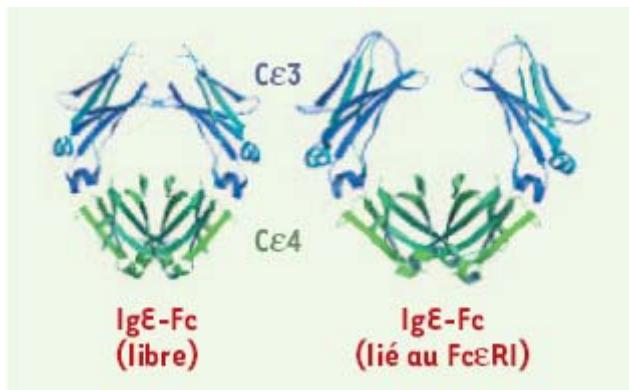


Figure 4. Comparaison des conformations de la portion Fc de l'IgE libre et lié au Fc ϵ RI α (Reproduit de (Wurzburg et al., 2000)). La conformation de l'IgE libre (dite fermée) diffère de celle de l'IgE liée à Fc ϵ RI (dite ouverte).

3.3. Distribution cellulaire

3.3.1. Mastocytes et basophiles

Chez la souris, l'IgE est abondamment et quasi exclusivement exprimée à la surface des mastocytes et des polynucléaires basophiles. Une expression de Fc ϵ RI α et de Fc γ a été récemment mise en évidence au niveau des pinéalocytes (Ganguly et al., 2007) et des neurones sensoriels (Andoh and Kuraishi, 2004), la fonctionnalité du récepteur au niveau de ces cellules n'a pas été démontrée.

Les mastocytes sont ubiquitaires et particulièrement abondants dans la peau et les muqueuses. Malgré une concentration sérique peu élevée (0,05 à 1 µg/ml contre 10 mg/ml pour les IgG) (Gould and Sutton, 2008), les IgE occupent en permanence une proportion appréciable de leurs récepteurs grâce à la haute affinité de leur liaison y compris chez les individus non allergiques (Gruber et al., 1988 ; Grattan et al., 1991). Cette observation a été reproduite chez des souris de type sauvage (WT) naïves, où l'IgE occupe environ 80% des récepteurs Fc ϵ RI à la surface des mastocytes. La fixation d'IgE stabilise la présence membranaire du son récepteur et régule positivement son expression membranaire (Kubo et al., 2001). Ainsi, six semaines après l'injection intraveineuse d'IgE, l'administration d'un anticorps anti-IgE provoque un choc anaphylactique malgré la quasi absence d'IgE circulant (Kubo et al., 2003). L'augmentation d'expression du récepteur sur les mastocytes

et basophiles cause une exacerbation de la production de médiateurs inflammatoires (comme le MIP-1 α) par ces cellules (Lantz et al., 1997; MacGlashan et al., 1998 ; Xia et al., 1997 ; Yano et al., 1997).

3.3.1.1. Hypersensibilité immédiate

L'activation cellulaire suite à l'agrégation des IgE provoquée par la fixation d'antigènes multivalents induit la libération de médiateurs inflammatoires (Fig. 5). C'est la réaction d'hypersensibilité immédiate. Cette réaction a lieu quelques minutes à quelques heures après l'exposition à l'allergène. Elle peut être localisée comme dans le cas de la rhiniconjonctivite aiguë, la crise d'asthme aiguë, l'urticaire et l'allergie alimentaire, ou systémique comme l'anaphylaxie, la forme la plus dramatique de réaction d'hypersensibilité immédiate pouvant causer un bronchospasme, un collapse cardiovasculaire et voire la mort (Bischoff, 2007; Galli et al., 2005).

Les médiateurs inflammatoires libérés sont soit préformés comme l'histamine, (la sérotonine chez les rongeurs), des enzymes comme la chymase, la tryptase et la carboxypeptidase A, des métalloprotéinases, des polypeptides comme l'endorphine, kinines, somatostatines, des protéoglycans comme la chondroitine sulfate et l'héparine. Les mastocytes activés libèrent également des médiateurs néo-synthétisés tels que des dérivés de l'acide arachidonique comme des leucotriènes (LTC4, LTB4 par exemple), PAF (platelet-activating factor) et des prostaglandines comme PGD2. Ces médiateurs inflammatoires causent la vasodilatation, l'oedème, la fièvre et la bronchoconstriction et le recrutement d'autres cellules inflammatoires aboutissant aux conditions cliniques mentionnées ci-dessus. Comme les mastocytes, les basophiles sont capables, après activation *via* Fc ϵ RI de libérer l'histamine et le leucotriène C4 ainsi que des cytokines Th2 surtout l'IL-4 et l'IL-13 (Lantz et al., 1997 ; MacGlashan et al., 1998).

Si Fc ϵ RI est essentiel pour l'anaphylaxie dépendant de l'IgE (Dombrowicz et al., 1993), les mastocytes joueraient le rôle le plus important dans cette dernière réaction (Galli et al., 2005). L'anaphylaxie peut également résulter de l'activation cellulaire par des complexes immuns à IgG. Ainsi, chez la souris l'activation de CD16, en fixant l'IgG₁, déclenche une réaction anaphylactique, principalement par libération du PAF (platelet-activating factor) (Hazenbos et al., 1996 ; Mukai et al., 2005 ; Tsujimura et al., 2008). La contribution des basophiles est essentielle au développement de cette réaction., celle des mastocytes ou des macrophages n'est pas indispensable (Tsujimura et al., 2008) (voir distribution et fonctions de CD16).

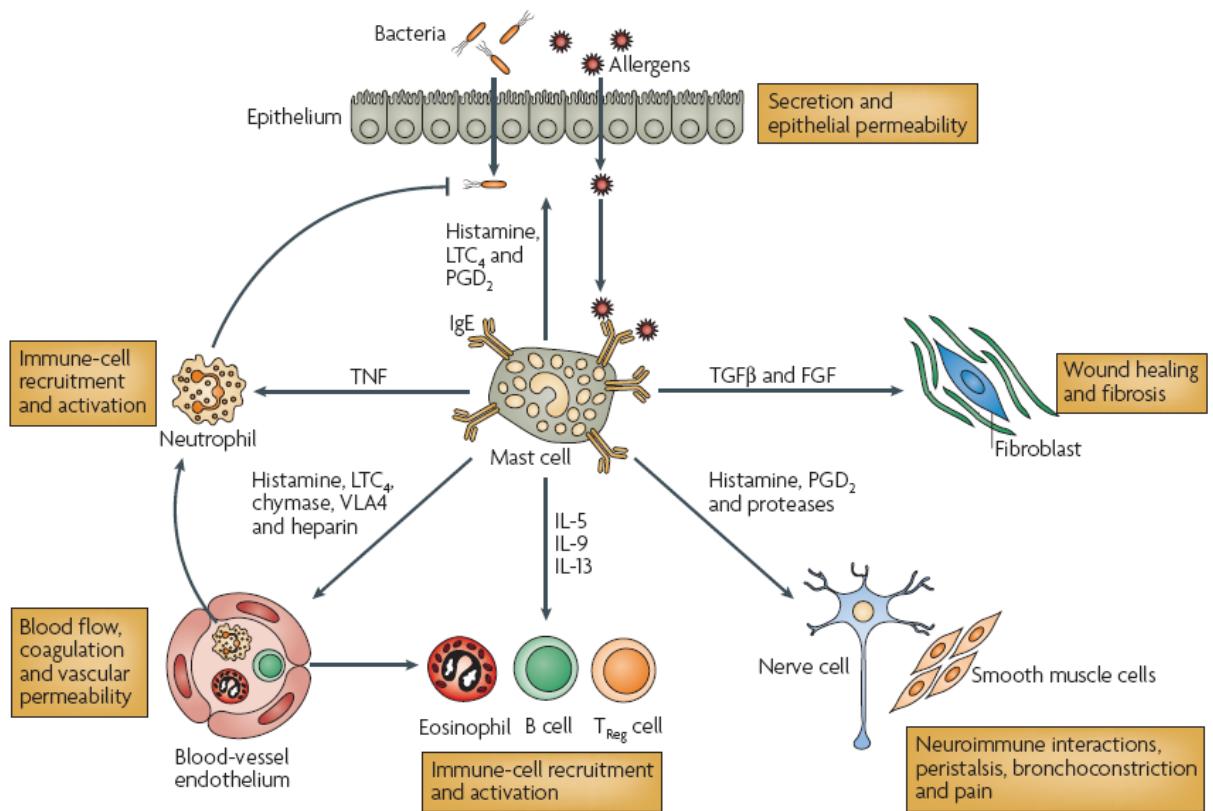


Figure 5 | Rôle des mastocytes (d'après (Bischoff, 2007)). Ces fonctions incluent la régulation des fonctions de cellules épithéliales (sécretion et perméabilité épithéliale), fonctionnement des muscles lisses (peristaltisme et bronchoconstriction), des cellules endothéliales (flux sanguin, coagulation et perméabilité vasculaire), recrutement et activation des neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes, fonctions neuronales (interactions neuroimmunes, péristaltisme et douleur) ainsi que la cicatrisation des plaies et la fibrose. Les facteurs de déclenchement peuvent être des facteurs de croissance, agents infectieux, neuropeptides, antigènes protéiques ainsi que les conditions physicochimiques comme le changement de PH ou de l'osmolarité. FGF, fibroblast growth factor; IL, interleukin; LTC4, leukotriene C4; PGD2, prostaglandin D2; TGFβ, transforming growth factor-β; TNF, tumour-necrosis factor; TReg cell, CD4+CD25+ regulatory T cell; VLA4, very late antigen 4.

Outre la libération rapide de médiateurs inflammatoires préformés ou néosynthétisés, les mastocytes produisent également de nombreuses cytokines, par exemple, IL-1, -3, -4, -5, -6, -9, -10, -13, -16, IFN-γ, MIF (macrophage activating factor) et TNF-α, des chimiokines (IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4, RANTES/CCL-5). Ces médiateurs sont libérés et entretiennent l'inflammation en attirant notamment des cellules de type inflammatoire comme les neutrophiles, basophiles, éosinophiles et les lymphocytes T (Bischoff, 2007), ce qui peut expliquer le rôle indirect joué par FcεRI dans les réactions d'hypersensibilité retardée qui résultent de l'activation des cellules effectrices par les

complexes immuns IgE/ ou IgG/allergène. Les manifestations cliniques sont observées quelques heures après la rencontre de l'allergène. Ces manifestations atteignent leur apogée après 6 à 9 heures puis diminuent significativement après 24 à 48 heures (Biedermann et al., 2000 ; Bryce et al., 2004; Williams and Galli, 2000a).

Dans un modèle expérimental d'asthme induit en l'absence d'adjuvant, le rôle important mais partiel des mastocytes et Fc ϵ RI a été mis en évidence dans plusieurs études (Kobayashi et al., 2000; Taube et al., 2004; Williams and Galli, 2000b). Toutefois, les auteurs n'excluent pas la contribution des basophiles à ce modèle.

3.3.1.2. Hypersensibilité cutanée chronique

Outre leur rôle dans l'anaphylaxie dépendant de l'IgG₁; les basophiles contribuent également à l'inflammation dans un modèle d'inflammation cutanée chronique dépendant de l'IgE (Mukai et al., 2005) (Obata et al., 2007).

3.3.2. APC, Granulocytes, Plaquettes

Chez l'Homme, la forme trimérique de Fc ϵ RI est exprimée par les cellules présentatrices d'antigène (APC : monocytes/macrophages, cellules dendritiques et cellules de Langerhans) ainsi que par les éosinophiles et les plaquettes. En l'absence de FcR β , ces autres cellules montrent une expression (très) faible. Cette expression est toutefois augmentée en présence de concentrations élevées d'IgE, comme c'est le cas dans les pathologies allergiques et parasitaires (Kraft and Kinet, 2007).

Un récepteur tétramérique serait également présent à la surface des neutrophiles. L'activation de ces cellules *via* Fc ϵ RI permettrait la facilitation de la présentation antigénique, comme c'est le cas des DC humaines, conduirait au développement et à l'aggravation de l'inflammation locale, notamment pulmonaire, grâce à leur capacité de produire l'IL-8 (Gounni et al., 2001). Ces résultats demandent cependant à être confirmés par d'autres équipes.

3.3.2.1. Présentation antigénique

Fc ϵ RI est impliqué dans la présentation antigénique et particulièrement des allergènes par les APC (Kraft and Kinet, 2007) L'agrégation de Fc ϵ RI à la surface par des complexes IgE/antigène conduit à l'endocytose du ce complexe formé avec le récepteur. Celui-ci est acheminé vers des compartiments riches en CMH II dans lesquels l'antigène est dégradé et les molécules de CMH II sont chargées de peptides antigéniques et

acheminées vers la surface. Les APC peuvent présenter les peptides de l'allergène aux lymphocytes T auxilliaires que ce soit au site inflammatoire ou au niveau des ganglions lymphoïdes drainants (Gould and Sutton, 2008).

Fc ϵ RI exprimé par les APCs exerce un effet pro-inflammatoire et contribue ainsi également au développement de pathologies allergiques comme la dermatite atopique (Novak et al., 2004). En effet, l'agrégation de ce récepteur sur les APC aboutit, outre à la présentation antigénique facilitée, à la production de cytokines comme IL-10, IL-12, IL-1 β et TNF- α et de chimiokines comme l'IL-16, CCL-2 et IL-8. L'agrégation de Fc ϵ RI sur les APC contribue donc à la polarisation de la réponse vers un profil Th2 ou Th1 en présentant l'allergène par exemple *via* les LCs et les IDECs aux lymphocytes Th2 et Th1 respectivement – les IDECs peuvent produire de l'IL-12 et orienter vers un profil Th1 – ainsi qu'à l'attraction de plusieurs cellules immunes vers le site de l'inflammation comme les éosinophiles, les DC et les LT (Novak et al., 2004).

3.3.2.2 Immunité anti-parastitaire et anti-tumorale

Si des corrélations épidémiologiques ont clairement établi un lien inverse entre les concentrations sériques d'IgE et l'immunité à la réinfection par certains helminthes notamment *Schistosoma* (Hagan et al., 1991), le rôle physiologique de Fc ϵ RI dans l'immunité anti-parasitaire ou anti-tumorale est beaucoup moins bien établi, faute de modèles expérimentaux appropriés (Gould and Sutton, 2008). Des études chez la souris d'infections par *Plasmodium chabaudi chabaudi* ont montré l'apparition, notamment au niveau splénique, de cellules exprimant Fc ϵ RI, probablement des basophiles, responsables d'une production rapide d'IL-4 (Poorafshar et al., 2000). Par contre l'infection par *S. mansoni* d'animaux déficients en Fc ϵ RI a montré que l'absence du récepteur affectait faiblement la pathologie (Jankovic et al., 1997) probablement en raison de la distribution cellulaire restreinte du récepteur chez la souris. En effet, malgré la faible expression de Fc ϵ RI sur les éosinophiles humains, ces cellules (Gounni et al., 1994a), comme les monocytes (Maurer et al., 1994) et les plaquettes (Joseph et al., 1997), sont capables, en présence d'IgE spécifiques du parasite, d'adhérer et d'exercer une activité cytotoxique *via* une réaction d'ADCC vis-à-vis des larves de *Schistosoma mansoni* *in vitro*.

Un rôle de Fc ϵ RI a également été dans l'immunité anti-tumorale. En effet, un anticorps IgE dirigé contre une tumeur ovarienne (MOv18 IgE), en combinaison avec des PBMC humains augmente la survie dans un modèle murin de xénogreffre d'une lignée de cancer ovarien. Les monocytes étaient les cellules essentielles exerçant cette activité

d'ADCC médiée par le Fc ϵ RI (Gould et al., 1999). Les éosinophiles humains se sont avérés également comme étant de puissantes cellules cytotoxiques *in vitro* exerçant en partie leur rôle via MOv18 IgE et Fc ϵ RI. (Karagiannis et al., 2007).

3.4.3. Effets de Fc ϵ RI indépendants de l'antigène

Dans les pathologies allergiques comme l'asthme allergique ou la dermatite atopique, caractérisées par des concentrations élevées d'IgE, une corrélation entre le taux d'IgE et le niveau d'expression de Fc ϵ RI sur les mastocytes, basophiles, APC et éosinophiles a été mise en évidence (Kraft and Kinet, 2007). L'expression de FcR γ , facteur limitant de l'expression de Fc ϵ RI est augmentée chez les patients allergiques (Kraft et al., 1998 ; Novak et al., 2003).

L'IgE monomérique se fixe sur Fc ϵ RI et augmente son expression (Furuichi et al., 1985) ainsi que celle de CD23 (Kisselgof and Oettgen, 1998) en le stabilisant à la surface cellulaire -dans le cas de Fc ϵ RI-, le protégeant ainsi de l'internalisation et la protéolyse. L'IgE monomérique exerce *via* Fc ϵ RI un effet anti-apoptotique sur les monocytes via une augmentation de Bcl-2 et Bcl-xl (Katoh et al., 2000). Ceci a été démontré aussi chez les mastocytes (Kalesnikoff et al., 2001) dans ce cas, le phénomène est accompagné soit par un maintien du taux de Bcl-xl et par la production autocrine de cytokines pouvant contribuer à la survie cellulaire comme l'IL-3 (Kalesnikoff et al., 2001 ; Kohno et al., 2005). Certains clones d'IgE, comme celui utilisé par Kalesnikoff, sont dits « cytokinergiques » et induisent l'aggrégation (d'une façon moins efficace qu'en présence d'un antigène multivalent) du récepteur, l'activation cellulaire, la production de cytokines comme l'IL-6, IL-13 et TNF- α mais pas la dégranulation cellulaire (Kraft and Kinet, 2007).

L'hypersensibilité de contact est drastiquement inhibée dans les souris déficientes en IgE. Une expression de plusieurs gènes associés aux mastocytes (MMCP-6) ou aux mastocytes et à l'hypersensibilité de contact (IL-6, IL-1 β , MCP-1, TNF α) est en effet diminuée. Elle est restorée après transfert de cellules sensibilisées provenant de souris WT ou administration d'IgE non spécifique de l'haptène (Bryce et al., 2004). Les souris déficientes en Fc ϵ RI ou en mastocytes montrent également une diminution de l'inflammation dans ce modèle. Les mécanismes permettant d'expliquer ces observations restent mal définis. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un possible changement conformationnel de l'IgE qui pourrait lui permettre d'acquérir une spécificité vis-à-vis d'un autre antigène, structurellement distinct, (James et al., 2003) (dans ce cas l'haptène

expérimental ou un auto-antigène) et ainsi de contribuer à la pathologie par activation cellulaire « classique » *via* un complexe multivalent..

3.4. Signalisation

La signalisation est une cascade d'événements complexes dont l'essentiel des voies d'activation est représenté dans la figure 6, tirée de (Kraft and Kinet, 2007) et explicité dans la légende. De manière succincte, après agrégation de Fc ϵ RI par un antigène multivalent, on distingue par commodité, deux voies de signalisation qui régulent la dégranulation cellulaire. La voie dépendant de FYN et la voie dépendant de LYN. Après agrégation du récepteur, FYN phosphoryle GAB2 ce qui aboutit à l'activation de PI3K, PDK1 et puis PKC δ . La voie médiée par LYN est cruciale pour la signalisation *via* le Ca $^{2+}$, alors que la voie médiée par FYN est essentielle pour la dégranulation cellulaire. Les deux voies LYN et FYN nécessitent SYK comme la mobilisation du Ca $^{2+}$ (Kraft and Kinet, 2007).

FcR β exerce un rôle amplificateur des signaux *in vitro* et *in vivo*. En effet, l'activation de Fc ϵ RI tétramérique induit une phosphorylation accrue de FcR γ et des tyrosines de SYK et une mobilisation de Ca $^{2+}$ plus rapide et plus importante que celle de Fc ϵ RI trimérique (Lin et al., 1996). La structure des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) de FcR β permet le recrutement efficace de LYN. En effet, FcR γ possède une séquence consensus d'un ITAM, (Asp/Glu)-X-X-Tyr-X-X-Leu-(X)₇₋₁₁-Tyr-X-X-(Leu/Ile), où X représente un acide aminé quelconque, alors que le motif ITAM de FcR β contient une troisième tyrosine entre les deux tyrosines d'un ITAM classique. Sur base d'expériences *in vitro*, certains auteurs ont montré que ce résidu tyrosine médian aurait un rôle inhibiteur sur la signalisation de ce récepteur en activant la SH2-domain-containing inositol-5-phosphatase (SHIP) (Furumoto et al., 2004). Xiao *et al.* (Xiao et al., 2005) ont suggéré que l'activation de la Tyr225 « inhibitrice » pourrait avoir lieu lors d'un mécanisme de rétrocontrôle négatif lors d'une stimulation intense de Fc ϵ RI.

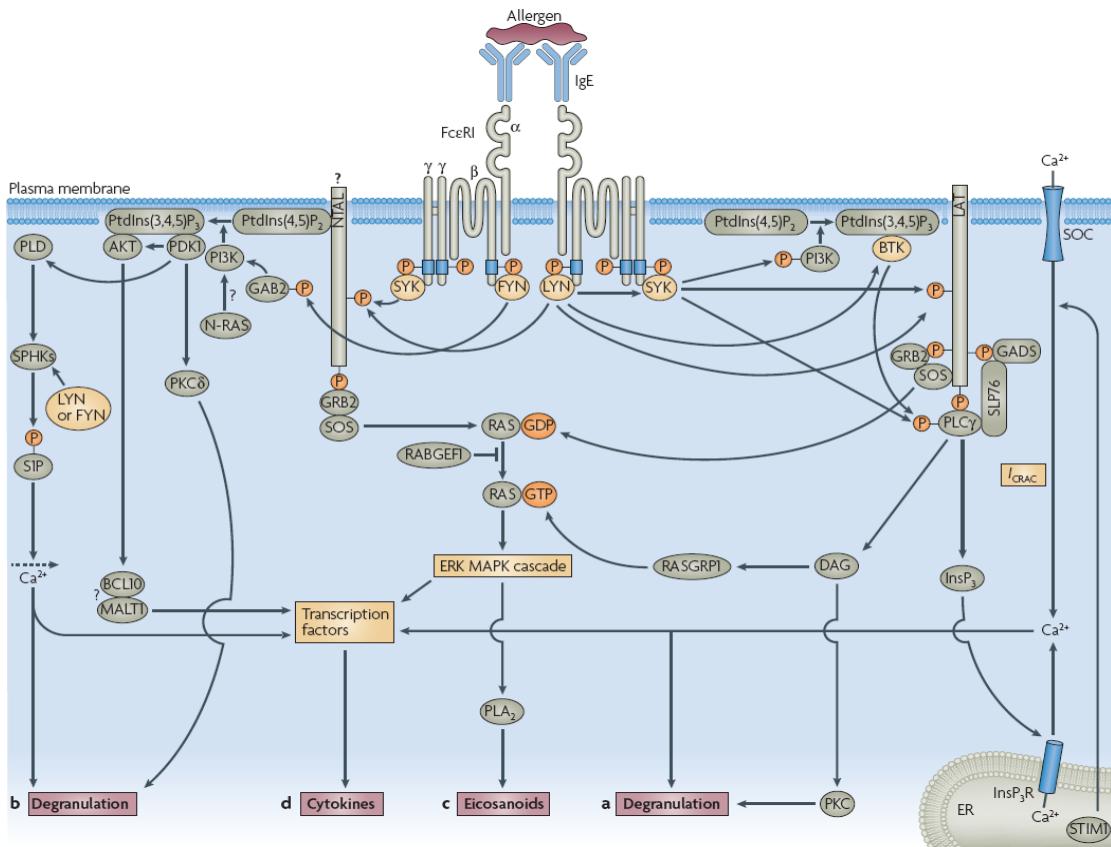


Figure 6 | Signalisation suite à l'activation de Fc ϵ RI (d'après (Kraft and Kinet, 2007))

a | Dans la première voie, LYN est activée et phosphoryle les motifs ITAM dans les chaînes FcR β et FcR γ de Fc ϵ RI, ce qui aboutit à l'association de SYK avec FcR γ et l'activation de SYK. SYK phosphoryle LAT (Linker for Activation of T cells), qui recrute les GAD (Growth-factor-receptor-bound protein 2 (GRB2)-Related Adaptor protein), SLP76 (SH2-domain-containing Leukocyte Protein of 76 kDa), VAV (qui n'est pas montré ici) et PLC γ (PhosphoLipase C γ). L'activation de PLC γ a lieu grâce à ce complexe et grâce au recrutement de BTK (Bruton's Tyrosine Kinase) vers la membrane par PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Là, PLC γ est phosphorylée par BTK. PLC γ activée produit le DAG (Diacylglycerol), qui active les PKC classiques (Protein Kinases C), et InsP₃ (Inositol-1,4,5-Trisphosphate), ce qui induit la libération du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique suite à la fixation de InsP₃ à son récepteur (InsP₃R) qui est présent à la surface du réticulum. L'épuisement des stocks de Ca²⁺ entraîne l'ouverture des canaux calciques membranaires (SOC: Store-Operated Channel) régulée par STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), et cet influx de Ca²⁺ extracellulaire génère un courant I_{CRAC} (Calcium-Release-Activated Current) qui maintient la [Ca²⁺] à un niveau élevé et régénère les stocks de Ca²⁺ du réticulum. L'activation de la PKC classique et la mobilisation du Ca²⁺ aboutissent à la dégranulation cellulaire. **b** | Dans la voie complémentaire, l'activation de FYN et SYK induit la formation d'un complexe avec VAV (qui n'est pas présent dans la figure), GRB2, GAB2 (GRB2-associated binding protein 2) et PI3K. Ce complexe est probablement organisé par NTAL (Non-T-cell Activation Linker). L'activation de PI3K aboutit au recrutement de PDK1 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1) vers la membrane, qui à son tour active PKC δ , ce qui mène à la dégranulation. Les sphingosine kinases (SPHK) peuvent être activées par PLD (Phospholipase D), LYN ou FYN. L'activation de SPHK aboutit à l'influx du calcium extracellulaire, probablement en empêchant l'effet

supresseur de la sphingosine sur I_{CRAC}. **c** | GRB2 et SOS (Son-Of-Sevenless homologue) sont associés avec les voies primaire et secondaire de la signalisation et induisent l'activation de RAS qui à son tour induit l'activation de la cascade de ERK (Extracellular-signal-Related Kinase) MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la production d'eicosanoïdes *via* PLA₂. **d** | La production de cytokines est régulée par plusieurs facteurs de transcription, dont l'activation dépend de [Ca²⁺], et des signaux provenant de PKC et AKT (probablement *via* BCL-10/MALT1). BCL-10, B-cell Lymphoma-10; MALT10, Mucosa-Associated-Lymphoid-Tissue lymphoma-translocation protein 1; PtdIns(3,4,5)P3, Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PtdIns(4,5)P2, phosphatidylinositol- 4,5-bisphosphate; RABGEF1, RAB Guanine-nucleotide-Exchange Factor 1; RASGRP1, RAS Guanylnucleotide- Releasing Protein 1; S1P, sphingosine 1-phosphate.

3.5. Régulation négative de l'activité de FcεRI

L'activation de FcεRI est négativement régulée par plusieurs molécules de signalisation (Katz, 2002; Malbec et al., 2002). Outre SHIP (Fluckiger et al., 1998 ; Scharenberg et al., 1998), Phosphatase and tensin homologue (PTEN) dégrade le PtdIns(3,4,5)P3 en PtdIns(4,5)P2 (Kraft and Kinet, 2007), le substrat de PLCγ. Tam *et al.* (Tam et al., 2004) ont identifié la molécule RAB guanine-nucleotide-exchange factor 1 (RABGEF1) qui est un régulateur négatif de la signalisation induite par FcεRI. RABGEF1 se lie à RAS et inhibe son activation et donc inhibe la cascade MAPK ERK.

Les fonctions effectrices des mastocytes et des basophiles médiées par FcεRI sont également négativement régulées par des récepteurs membranaires inhibiteurs comme CD32/FcγRIIb (Malbec et al., 1998) dont la coagrégation avec FcεRI en inhibe la signalisation (Katz, 2002). Parmi ces récepteurs inhibiteurs, on cite : CD32b, PIR-B (Paired Ig-like receptor-B), les LIR-1, -2, -3, -5 et -8 (Leukocyte Ig-like receptors), le gp49B1, LAIR-1, Siglec-5 et -8, SIRP-α et MAFA (Arm et al., 1997 ; Borges et al., 1997 ; Cella et al., 1997 ; Colonna et al., 1997 ; Cosman et al., 1997 ; Floyd et al., 2000 ; Ghannadan et al., 2002 ; Katz et al., 1989 ; Kubagawa et al., 1997 ; Meynard et al., 1997 ; Ortega et al., 1991; Samardis and Colonna, 1997). Ces récepteurs ont en commun un motif intracytoplasmique inhibiteur : le tyrosine-based inhibitory motif (ITIM). Le motif ITIM des récepteurs inhibiteurs permet le recrutement puis l'activation de tyrosine phosphatases comme SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase (SHP) dont SHP-1 et -2, ou SHIP-1 (Malbec et al., 2002). FcγRIIB recrute SHIP-1 à la membrane cellulaire grâce à son motif ITIM. SHIP-1 dégrade PtdIns(3,4,5)P3 en PtdIns(3,4)P2. SHIP peut aussi agir via la molecule adaptatrice docking protein 1 (DOK1) qui se lie à une « RAS GTPase-activating protein » qui inhibe la mobilisation du Ca²⁺ et l'activation de ERK (Isnardi et al., 2004 ; Kepley et al., 2004).

CD89/Fc α RI, qui s'associe à FcR γ , inhibe la dégranulation mastocytaire médiée par le Fc ϵ RI (Pasquier et al., 2005). L'administration d'un anticorps (Fab) spécifique de Fc α RI diminue l'intensité de l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique dans un modèle murin (Pasquier et al., 2005). Dans ce cas, l'inhibition est due au recrutement de SHP1 par Fc α RI. Ceci mécanisme pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire de l'IgA et l'augmentation de la susceptibilité des individus ayant des déficiences en IgA aux pathologies allergiques et autoimmunes.

Des molécules membranaires n'ayant pas de motifs de signalisation intracytoplasmiques peuvent aussi inhiber l'activation cellulaire médiée par le Fc ϵ RI. Citons CD200R (un récepteur pour CD200 connu aussi sous le nom de OX2) (Cherwinski et al., 2005) et les tétraspanines CD63 et CD81. Des anticorps dirigés contre ces dernières molécules ou CD200R inhibent la dégranulation mastocytaire et l'anaphylaxie (Fleming et al., 1997 ; Kitani et al., 1991 ; Nishikata et al., 1992).

4. CD23

4.1. Forme soluble et interaction avec l'IgE

CD23 appartient à la superfamille des lectines de type C dépendant du calcium. CD23 membranaire comporte 3 domaines ou « têtes » lectiniques extracellulaires séparés de la membrane plasmique par un axe qui est un trimère d'hélices α (triple α helical coiled-coil ‘stalk’) (Figure 7a). Ce dernier pied ou « stalk » est susceptible à la protéolyse, libérant différents fragments solubles (sCD23) ayant des fonctions dépendant de leur état d'oligomérisation. La protéase endogène principale qui libère le sCD23 est l'ADAM10 (A Disintegrin And Metalloproteinase 10) (Lemieux et al., 2007; Weskamp et al., 2006) (Fig 8c). De cette protéolyse, résultent des fragments solubles (sCD23) des tailles variées. Les fragments contenant l'axe forment des trimères à partir d'une certaine concentration ou suite à la liaison à l'IgE, alors que les sCD23 n'ayant pas d'axe restent toujours monomériques (McCloskey et al., 2007). Outre le fait que la région “stalk” favorise l'oligomérisation, elle aurait d'autres fonctions. Ainsi, le peptide qui se trouve à la base de cette région est impliqué dans la liaison au CMH II (Kijimoto-Ochiai and Noguchi, 2000). Chez l'Homme mais pas la souris, à la base des domaines lectiniques, le CD23 possède une ramification ou « queue » C-terminale grâce à laquelle il se lie à CD21.

L'IgE se lie au domaine ou “tête” lectinique. Bien que l'affinité d'une seule tête lectinique pour l'IgE soit faible ($K_a \approx 10^6\text{--}10^7 \text{ M}^{-1}$), celle d'un trimère de têtes lectiniques

est assez forte ($K_a \approx 10^8\text{--}10^9 \text{ M}^{-1}$) et approche celle de Fc ϵ RI (Hibbert et al., 2005; McCloskey et al., 2007). Il existe deux variantes de CD23, CD23a et CD23b, dont les séquences N-terminales intracellulaires diffèrent par leurs premiers AA. Ces deux variantes ont différents distributions cellulaires : CD23a est exprimé par les lymphocytes activés par l'antigène avant leur différenciation en plasmocytes, alors que l'expression de CD23b est induite par l'IL-4 sur une variété de cellules inflammatoires, telles que les lymphocytes et les cellules épithéliales. CD23a et b ont des rôles différents dûs à leurs séquences N-terminales intracytoplasmiques différentes. Les résidus cruciaux pour l'activité de CD23a et b ont été identifiés (Montagnac et al., 2005; Yokota et al., 1992).

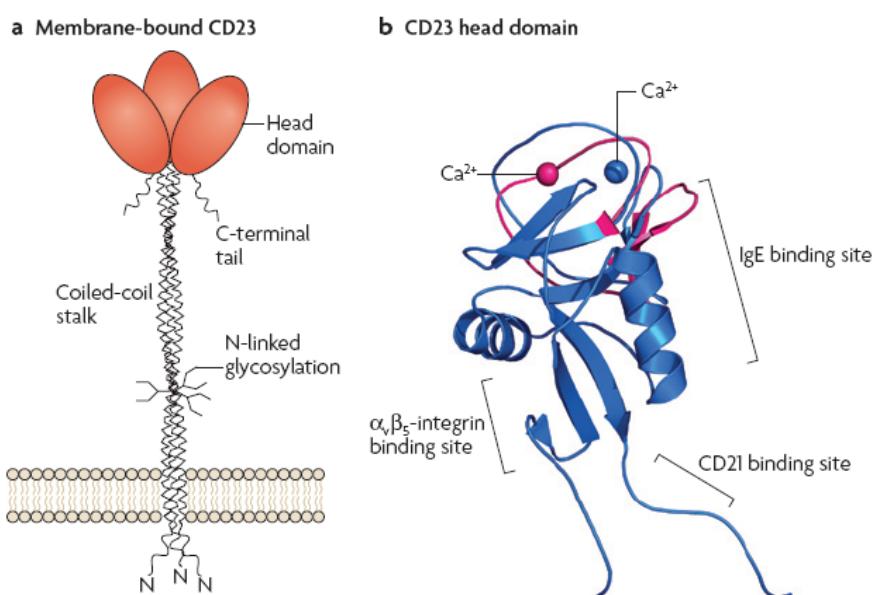


Figure 7. La structure de CD23 (D'après (Gould and Sutton, 2008)). a | une représentation schématique du CD23 membranaire, montrant l'axe ou « stalk » extracellulaire qui est un trimère d'hélices α , les trois domaines ou « têtes » lectiniques de type C ainsi que les sites de N-glycosylation à proximité de la base du « stalk ». b | la structure tridimensionnelle d'une tête lectinique. La structure fournie par NMR (en bleu) et la structure cristallographique obtenue par diffraction de rayons X sont superposées, et la dernière structure est visible (en rouge) seulement dans les régions où les deux structures sont très différentes; d'autres différences ont lieu dans les régions N- et C-terminales du domaine lectinique. Le seul ion de Ca^{2+} observé dans chaque structure est représenté par une sphère (bleue pour la structure donnée par NMR et rouge pour la structure cristallographique). Les sites de liaison à C ϵ 3 de l'IgE, aux domaines 1 et 2 du CD21 (proche de la queue C-terminale) et à l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ (dans la région N-terminale proche de l'axe) sont indiqués.

D'une façon surprenante pour une lectine, CD23 se lie à l'IgE indépendamment de sa capacité de fixer un motif glycanique (Vercelli et al., 1989a). Il se fixe également au CD21/CR2, un récepteur du complément, d'une façon glycane-dépendante (Aubry et al.,

1994; Aubry et al., 1992). La structure du domaine lectinique du CD23 monomérique a été déterminée par résonance magnétique nucléaire et (NMR) et analyse cristallographique par diffraction de rayons X (Hibbert et al., 2005 ; Wurzburg et al., 2006). Les deux structures résultant des deux analyses diffèrent au niveau de la/des région(s) fixatrice(s) du calcium (Fig. 7b). En effet, la structure donnée par NMR montre un seul site de liaison au calcium alors que celle donnée par diffraction de rayons X montre un autre site de liaison au calcium. L'analyse par NMR a permis de localiser les sites de liaisons à l'IgE (en utilisant le Cε3 monomérique) et au CD21 (en utilisant les domaines N-terminaux 1 et 2) (Hibbert et al., 2005). Les sites de liaison à l'IgE et CD21 sont éloignés l'un de l'autre (Figure 7b). Des études supplémentaires montrent que l'IgE et CD21 peuvent se lier simultanément à CD23 (Hibbert et al., 2005).

4.2. Distribution cellulaire et rôle dans la présentation antigénique facilitée.

CD23 possède une large distribution cellulaire. Il est fortement exprimé sur les lymphocytes où il joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'IgE et peut ainsi moduler la réaction allergique. Il peut être exprimé par certaines populations de lymphocytes (Vercelli et al., 1989b). Il est également exprimé sur les éosinophiles humains activés, les neutrophiles, les mastocytes (Gounni et al., 2001; Vercelli and Geha, 1989 ; Yuen et al., 1990).

Les complexes allergène/IgE, fixés à CD23, exprimé par les lymphocytes B – mais aussi par les APC tels les DC, monocytes/macrophages et LC (Buckley et al., 1992 ; Vercelli et al., 1988)– activés par l'allergène au niveau des muqueuses, peuvent faciliter la présentation antigénique aux lymphocytes T (Carlsson et al., 2007; Heyman et al., 1993). Ce phénomène est appelé présentation antigénique facilitée. Chez l'homme, l'interaction entre CD23 et le HLA-DR à la surface membranaire est impliquée dans l'acheminement des complexes allergène/IgE/CD23 vers les endosomes, où les molécules HLA-DR sont chargées par les peptides dérivés de l'allergène pour les présenter à la surface des lymphocytes (Karagiannis et al., 2001). Contrairement à la présentation antigénique *via* le BCR, où la spécificité est assurée, au niveau de chaque cellule, par l'IgE membranaire, la spécificité lors de la présentation antigénique facilitée par le CD23 est assurée par l'IgE (soluble). Dans ce cas, chaque lymphocyte B est capable d'acquérir une spécificité vis-à-vis de plusieurs antigènes et contribuer au phénomène d'« epitope spreading » et ainsi contribuer au développement et à l'entretien de la pathologie allergique. Des mutations dans la région “stalk” du CD23 murin sont associées avec la déstabilisation de cette région,

une diminution d'expression à la surface cellulaire ainsi qu'une augmentation de la commutation vers l'IgE (Kaminski and Stavnezer, 2007; Lewis et al., 2004). Récemment, des polymorphismes découverts dans le gène de *CD23* pourraient être liés aux phénomènes de présentation antigénique facilitée par CD23. Un polymorphisme (Arg62Trp), à la base de la région “stalk”, qui concerne une séquence peptidique impliquée dans l'interaction des molécules de CMH II et CD23 (Kijimoto-Ochiai and Noguchi, 2000), rend en même temps le CD23 membranaire résistant au clivage enzymatique (Meng et al., 2007).

4.3. Régulation de la synthèse d'IgE

Si CD23 est impliqué dans la régulation de la synthèse de l'IgE, son rôle positif et/ou négatif est controversé (Conrad et al., 2007). Selon l'école de Gould, CD23 augmente la synthèse de l'IgE lorsque sa concentration est faible et inhibe sa synthèse lorsque sa concentration est élevée (Fig. 8a). Le sCD23, obtenu après clivage du CD23 membranaire qui n'est pas protégé de la protéolyse lorsque la concentration d'IgE est faible, stimule l'augmentation de la synthèse d'IgE en fixant simultanément l'IgE membranaire et le CD21 à la surface d'un lymphocyte B (Fearon and Carroll, 2000; Gould and Sutton, 2008). A fortes concentrations, l'IgE se lie au CD23 membranaire et le stabilise empêchant la libération de sCD23 et ainsi l'augmentation de la synthèse de l'IgE. La même école propose que sCD23 stimule la synthèse d'IgE en se liant à CD21 sans se lier en même temps à l'IgE membranaire et que l'IgE, en l'absence l'allergène, se lie seulement au CD23 membranaire pour inhiber la synthèse d'IgE (Gould and Sutton, 2008).

Chez la souris, sCD23 ne possède pas de site de liaison (queue C-terminale) au CD21, ce qui pourrait expliquer que CD23 est parfois considéré dans cette espèce comme un récepteur exclusivement inhibiteur de la synthèse d'IgE (Conrad et al., 2007). Ainsi, chez les souris déficientes en CD23, la production d'IgE est fortement augmentée de la synthèse d'IgE (Yu et al., 1994).

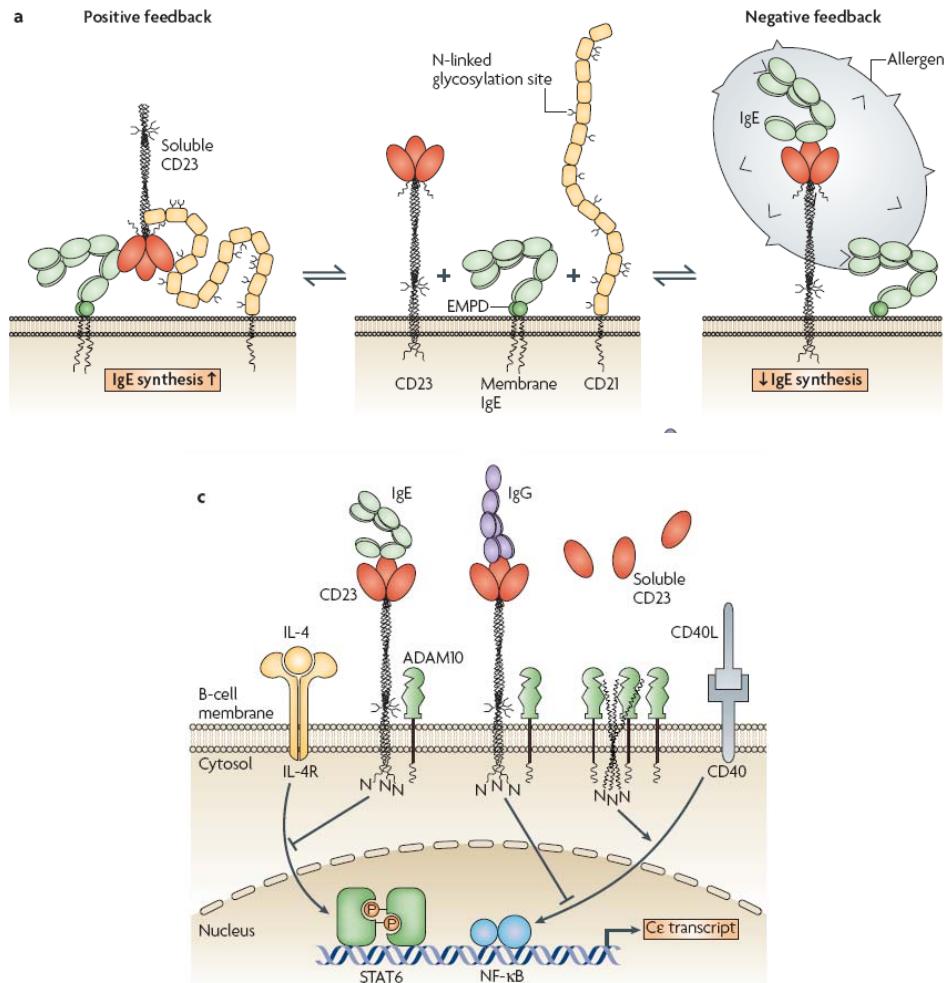


Figure 8. Régulation de la synthèse de l'IgE par CD23 (d'après (Gould and Sutton, 2008)). **a |** Régulation positive et négative de la synthèse d'IgE par le CD23 humain. Dans ce modèle, la régulation positive de la synthèse d'IgE résulte de la co-ligation du sCD23 par l'IgE membranaire et le CD21 à la surface d'un LB humain activé pour la synthèse de l'IgE, qui est alors augmentée grâce à une synergie de signalisation via le complexe membranaire IgE–Ig α –Ig β et le complexe CD21–CD19. Régulation négative de la synthèse d'IgE a lieu suite à la co-ligation de l'IgE et CD23 membranaires par le complexe immun IgE-allergène. La compétition entre CD21 et CD23 pour l'IgE membranaire aboutit à l'homeostasie. **c |** Dans ce schéma, la liaison de l'IgE au CD23 membranaire trimérique (n'ayant pas la « queue » C-terminale présente chez l'homme et qui permet la liaison du CD23 trimérique à CD21) empêche l'augmentation de la commutation vers l'IgE induit par l'IL-4 et le CD40 ligand (CD40L). CD23 trimériques n'est pas stable à surface des LB. La région “stalk” est clivée par ADAM10 libérant le sCD23. Ce phénomène permet le processus de synthèse d'IgE par défaut. La liaison de l'IgE ou certains IgG spécifiques du domaine lectinique de CD23 à ce récepteur membranaire (comme le lumiliximab), stabilise le CD23 trimérique à la surface et favorise la régulation négative de la synthèse d'IgE par un mécanisme encore inconnu. L'IL-4 and CD40L agissent via STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) et NF-κB (nuclear factor-κB), respectivement, pour stimuler la transcription de C ϵ et le switch vers IgE. EMPD, extracellular membrane-proximal domain; IL-4R, IL-4 receptor.

4.4. CD23, transport de l'IgE à travers l'épithélium

Chez l'homme et les rongeurs, CD23 est exprimé par les cellules épithéliales intestinales (Kaiserlian et al., 1993). Il joue un rôle dans le transport de l'IgE et des complexes allergènes/IgE à travers la barrière épithéliale (fig. 9). De plus, l'IgE est également synthétisé au niveau de la muqueuses et sécrété dans la lumière intestinale (Berin et al., 2006; Tu et al., 2005) où il se fixe à l'allergène. Les complexes immuns résultants activent mastocytes présents dans les muqueuses et initient une réaction allergique (fig. 9). La libération de médiateurs pro-inflammatoires par les mastocytes activés, les cellules épithéliales et les autres cellules attirées vers le site de l'inflammation, causent éventuellement une altération de la barrière épithéliale ce qui entraîne une exacerbation de la pathologie (Yu and Perdue, 2001). Enfin, les APC exprimant Fc ϵ RI et CD23, qui facilite aussi la présentation antigénique médiée par l'IgE (Gould and Sutton, 2008), peuvent aussi capturer les complexes allergènes/IgE, présenter les peptides de l'allergène aux lymphocytes Th2 locaux et favoriser la synthèse de l'IgE (fig. 9). Ces mécanismes peuvent rendre compte au moins en partie de la sensibilisation vis-à-vis d'allergènes alimentaires vis-à-vis desquels l'individu est généralement tolérant (Bieber, 2007; Weiner, 1997).

4.5. Signalisation après activation du CD23 membranaire

Nous avons vu que le CD23 peut jouer un rôle dans la régulation négative de la synthèse de l'IgE en inhibant la voie STAT6, il peut aussi inhiber la voie NF κ -B. Toutefois, le mécanisme de ces inhibitions demeure mal connu. Récemment, il a été démontré que l'activation du CD23 humain, par les complexes IgE-antigène ou par des anti-CD23 et un anticorps secondaire, induit la phosphorylation des MAP kinases ERK et JNK (mais pas celles de p38 MAP kinase ou de NK- κ B) et résulte de l'activation de AP-1 et de la sécrétion des chimiokines CCL-20, qui attire surtout les cellules dendritiques immatures, les lymphocytes T mémoires et B, et l'IL-8, chimioattractant pour les neutrophiles et les éosinophiles (KleinJan et al., 1999 ; Zacharasiewicz et al., 2005; Zweiman et al., 1997).

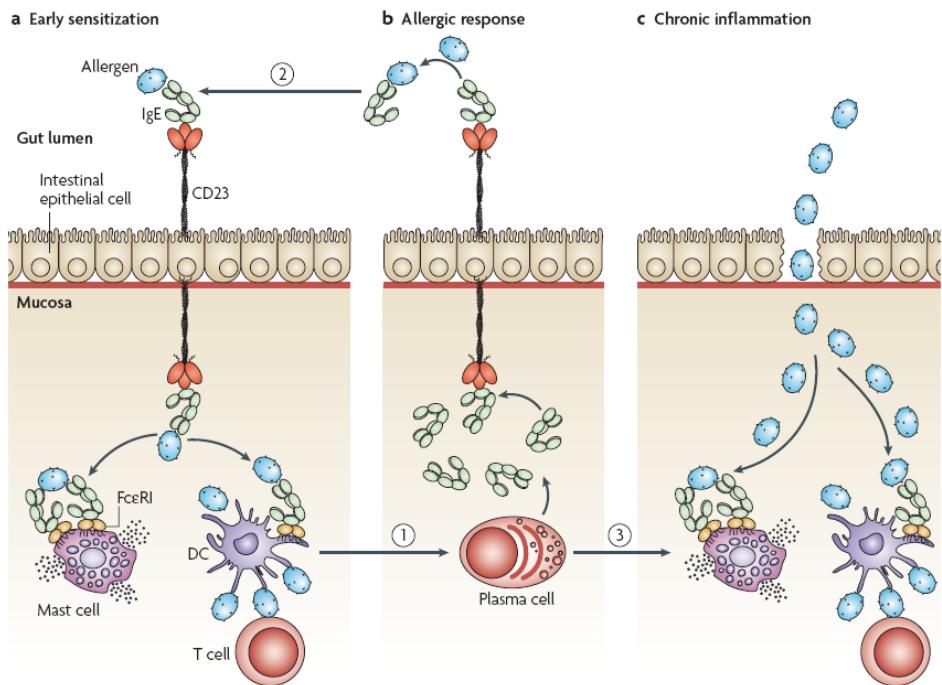


Figure 9. Rôle de CD23 sur les cellules épithéliales dans les pathologies allergiques (d'après (Gould and Sutton, 2008)) **a** | Les complexes allergène/IgE sont capturés par le CD23 du côté luminal et sont transportés au sein de la muqueuse intestinale, où ils se lient au Fc ϵ RI sur les mastocytes et les DC, causant l'inflammation allergique, la commutation locale vers l'IgE par les LB (étape 1). **b** | L'IgE synthétisé par les plasmocytes dans la muqueuse intestinale est transporté par le CD23 depuis la muqueuse vers la lumière intestinale où il capture des allergènes et se lie au CD23 exprimé à la surface des cellules épithéliales intestinales (étape 2). Les complexes allergènes-IgE sont délivrés, dans les muqueuses, aux mastocytes et aux DCs. **c** | L'inflammation résultant de la réaction allergique médiée par l'IgE dans les muqueuses altère l'épithélium intestinal en particulier les jonctions serrées entre cellules épithéliales, facilitant la traversée des allergènes libres, vers les muqueuses, qui seront capturés par les mastocytes et les DCs ayant fixé de l'IgE spécifique ce qui l'exacerbation de la réaction allergique (étape 3).

5. Fc γ RIII/CD16

5.1. Interaction avec l'IgG₁

CD16 est un récepteur activateur ($K_A \sim 10^6\text{-}10^7 \text{ M}^{-1}$), tétramérique ou trimérique comme Fc ϵ RI humain. En effet, il peut s'associer à FcR β (Kuroski et al., 1992). Fc γ RIII mais pas FcR β est essentielle pour l'expression membranaire de CD16 (Alber et al., 1992). CD16 peut lier l'IgE avec une faible affinité (Takizawa et al., 1992). Chez la souris, CD16 exerce son activité physiologique *in vivo* en fixant préférentiellement l'IgG₁. Chez l'Homme, plusieurs études montrent que le CD16 peut exercer son activité via l'IgG₁ *in vitro* (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

La structure de CD16 (complexé à l'IgG), a été déterminée par cristallographie (Sondermann et al., 2000). La partie extracellulaire (EC) de la chaîne α de CD16 comporte deux domaines de type immunoglobuline (D1 et D2) qui forment un V inversé. L'angle entre D1 et D2 est de 50-55°. Le site de liaison de CD16 avec l'IgG₁ a une topologie semblable au site de fixation de l'IgE pour Fc ϵ RI, impliquant également deux sites distincts (contact asymétrique et stoechiométrie 1 :1). Il existe cependant des différences, notamment en raison de la structure différente du ligand. L'interaction se fait avec les domaines C γ 2 et C γ 3 de l'IgG₁ qui forment un angle moins aigu que les domaines C ϵ 3 et C ϵ 4 homologues de l'IgE (Wurzburg et al., 2000). Le premier site de fixation de CD16 dans le domaine D2 d'EC α ne comporte pas la tyrosine cruciale de Fc ϵ RI et interagit avec une région qui n'est pas conservée dans les IgE. Le deuxième site de CD16 dans D2 et la jonction D1-D2 est moins hydrophobe et contient de nombreuses modifications d'acides aminés. Les chaînes latérales glycosidiques de CD16 sont impliquées dans l'interaction, alors qu'elles ne le sont pas dans le cas du Fc ϵ RI. En plus les glycosylations, qui ont lieu sur l'asparagine 297 (N297) dans le domaine C γ 2 de l'IgG₁, jouent aussi un rôle dans cette interaction et ont un impact sur l'activité de CD16 *in vitro et in vivo*. Enfin, CD16 subit un réarrangement notable lors de sa liaison avec l'IgG₁, contrairement à Fc ϵ RI (Garman et al., 2000). De plus, la liaison au CD16 n'entraîne que des légers changements de conformation de l'IgG₁ qui perd un peu de sa symétrie alors que l'angle D1-D2 devient légèrement plus grand (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

5.2. Distribution cellulaire et fonctions

Bien que ce récepteur soit capable de fixer plusieurs sous-classes d'IgG *in vitro*, l'activité de ce récepteur *in vivo* est médiée par l'IgG₁ (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). CD16 possède une très large distribution cellulaire : NK, granulocytes, monocytes, macrophages, DC, mastocytes et basophiles. Cette diversité se reflète dans les nombreuses fonctions remplies par CD16.

5.2.1. Anaphylaxie et réaction d'Arthus

CD16 est essentiel pour les réactions l'anaphylaxie passive médiée par l'IgG₁ (Dombrowicz et al., 1997; Finkelman, 2007; Miyajima et al., 1997). Comme nous l'avons mentionné, l'expression de CD16 par les basophiles, mais pas par les mastocytes est essentielle à cette réaction (Tsujimura et al., 2008).

La réaction d'Arthus est causée par la formation de complexes immuns qui adhèrent à l'endothélium des vaisseaux et qui sont entourés de fibrine et de plaquettes. La formation locale de complexes immuns insolubles entraîne une activation du complément par la voie classique et une accumulation de neutrophiles dépendante de CD16 avec thrombose vasculaire locale. Les mastocytes et les macrophages sont également impliqués dans cette réaction. Cette réaction est, au moins en partie, indépendante du complément (Hazenbos et al., 1996; Kohl and Gessner, 1999; Sylvestre and Ravetch, 1994).

5.2.2. Présentation antigénique et rôle dans l'asthme allergique

CD16 facilite la présentation antigénique : en effet, au niveau des DC, les peptides dérivés du matériel endocyté ou phagocyté sont présentés efficacement par les systèmes du CMH I et CMH II (Regnault et al., 1999). La capture de l'antigène par le CD16, *via* des complexes immuns, induit une réponse immune beaucoup plus importante que la capture d'un antigène non complexé (Herrada et al., 2007). De plus, dans un modèle d'asthme expérimental, il a été récemment démontré que l'expression de CD16 par les DC, en association avec l'expression de TLR4, régulait l'hyperréactivité bronchique et la réponse Th2 associée à la pathologie mais n'affectait pas la réponse Th1. Cet effet est indépendant de la présentation antigénique et régulé par l'IL-10 (Bandukwala et al., 2007).

5.2.3. Phagocytose et cytotoxicité

CD16 exprimé par les macrophages, joue un rôle dans la cytotoxicité cellulaire médiée par l'IgG₁ (ADCC) (Fossati-Jimack et al., 2000 ; Hamaguchi et al., 2006 ; Hazenbos et al., 1996 ; Ji et al., 2002 ; Meyer et al., 1998; Nimmerjahn and Ravetch, 2005) qui participe notamment à l'immunité anti-tumorale (Clynes et al., 2000). Ainsi certains patients présentent un polymorphisme de CD16 (Fc γ RIIIa) qui augmente l'affinité de ce récepteur pour l'IgG₁ (Cartron et al., 2002 ; Weng et al., 2004 ; Weng and Levy, 2003) et qui améliore leur réponse à un traitement basé sur l'administration d'IgG₁ anti-CD20.

CD16 joue un rôle important dans l'endocytose de protéines solubles ou la phagocytose de microorganismes opsonisés par des IgG₁, par les granulocytes, monocytes et macrophages qui les inactivent dans les compartiments lysosomiaux.(Stuart and Ezekowitz, 2005 ; Swanson and Hoppe, 2004). Compte tenu de ces observations et de manière inattendue, il vient d'être démontré que FcR γ jouait un rôle délétère dans le choc septique. En effet des souris déficientes en FcR γ présentaient un taux de survie supérieur

dans des modèles de péritonite à *E. coli* notamment grâce une phagocytose plus importante des bactéries et à une réduction de la production de TNF- α (Pinheiro da Silva et al., 2007). Cet effet est du à l'expression de CD16 qui inhibe la phagocytose d'*E. coli* par les macrophages. La fixation à *E. coli* induit la phosphorylation et le recrutement de la phosphatase SHP-1 par CD16. Celle-ci déphosphoryle et inactive alors la PI3K qui conduit à une diminution de la phagocytose et une augmentation de la production de TNF- α dépendante de TLR4. La diminution de la phagocytose est due à l'inhibition du récepteur scavenger de classe A MARCO par SHP-1 (Pinheiro da Silva et al., 2007).

Le rôle délétère de CD16 a également été démontré dans le cas d'infection par *Leishmania* où la stimulation du récepteur exprimé par les macrophages induit la production d'IL-10 immunorégulatrice (Maasho et al., 1998). Par contre, il exerce un rôle protecteur dans le cas d'une infection par *Pseudomonas* (Rhein et al., 2008).

5.2.4. Pathologies autoimmunes

CD16 est impliqué dans plusieurs pathologies autoimmunes expérimentales. Dans un modèle d'arthrite autoimmune passive induite par transfert de sérum, la contribution des macrophages, mastocytes, des neutrophiles (Binstadt et al., 2006), des NKT (Kim et al., 2006) ainsi que le rôle de CD16 médié par les IgG autoréactives ont été étudiés. Dans ce modèle, le sérum provient d'un modèle d'arthrite spontanée chez les souris KRN transgéniques (K/BxN), où la pathologie est due d'une part à l'autoréactivité du TCR mais également à l'induction d'anticorps dirigés contre la glucose-6-phosphate isomérase (IgG anti-G6PI) (Mangialao et al., 1999). Le transfert de ces anticorps se traduit par l'apparition d'arthrite dans la plupart des souches murines et le catabolisme systémique des anticorps transférés diminue l'œdème, causé par une modification de la perméabilité vasculaire au niveau des articulations des membres inférieurs (Binstadt et al., 2006). L'absence de CD16 résulte d'une diminution significative des symptômes de la pathologie et l'inactivation de FcR γ inhibe l'apparition de synovite après l'injection de sérum provenant de souris K/BxN. Des signes cliniques de lésions érosives au niveau des os ont néanmoins été observées chez les souris déficientes en FcR γ (Corr and Crain, 2002). L'expression de l'EAE et de la sclérose en plaque est également en partie dépendante de CD16 (Pedotti et al., 2003).

Un polymorphisme de CD16 a été associé à la glomérulonéphrite autoimmune (Aitman et al., 2006) dans laquelle la nécrose des cellules mésangiales et endothéliales est

dépendante des macrophages et est due à une réaction d'ADCC *via* CD16. Chez des rats susceptibles Wistar Kyoto (WK), la glomérulonéphrite est due à une augmentation de la cytotoxicité des macrophages liée à un polymorphisme de *Fcgr3* affectant le nombre de copies du gène ainsi et à un polymorphisme de délétion d'un seul nucléotide dans la séquence codante ($\Delta G129$). D'une façon intéressante, le faible nombre de copies de *FCGR3B* (codant le Fc γ RIII/CD16b, orthologue de CD16 du rat) chez l'homme est associé à la glomérulonéphrite autoimmune (Aitman et al., 2006).

5.3. Signalisation et régulation

CD16, après agrégation, transduit le signal grâce au motif ITAM contenu dans la chaîne FcR γ . La signalisation *via* ce récepteur est donc similaire à celle de Fc ϵ RI. Dans les cellules NK, ce récepteur peut s'associer aussi à CD3 ζ qui aurait un rôle régulateur de l'expression et du fonctionnement du récepteur (cytotoxicité naturelle) (Lanier et al., 1989b).

Comme Fc ϵ RI, l'activité de CD16 peut être régulée par Fc γ RIIb, ainsi que par une variété d'autres récepteurs inhibiteurs co-exprimés avec le CD16 sur les cellules effectrices, comme PIR-B, LIRs et le gp49B1 (Katz, 2002).

L'inhibition de l'activité de CD16, comme celle de Fc ϵ RI, par Fc γ RIIb par exemple, a souvent été confirmée en utilisant des modèles de souris déficientes pour récepteur inhibiteur. Ces modèles ont démontré une exacerbation de l'inflammation médiée par CD16/IgG₁. Par exemple, l'agrégation de CD16 à la surface des DC en l'absence de ce récepteur inhibiteur, augmente leur capacité à présenter l'antigène (Desai et al., 2007 ; Samsom et al., 2005). De plus, les mastocytes péritonéaux, en l'absence de Fc γ RIIb, produisent significativement plus de médiateurs inflammatoires que les mastocytes de souris de type sauvage (Malbec et al., 2002).

II. PPAR

Les peroxisome proliferator-activated receptors ou PPAR(s) sont des molécules appartenant à la super-famille des récepteurs nucléaires. Ils participent à de nombreux processus métaboliques et cellulaires, les PPARs existent sous trois isoformes identifiées chez de nombreux vertébrés, et dont la distribution tissulaire différentielle reflète des fonctions spécifiques : PPAR- α (encore appelé NR1C1), PPAR- β/δ (ou NR1C2) et PPAR- γ (NR1C3).

1. Structure, interactions moléculaires et fonctions

Les trois isoformes présentent une forte homologie de séquence et de structure. Elles comprennent plusieurs domaines : AF1 (Activation Function 1), modulateur en N-terminal, DBD (DNA-Binding Domain) très conservé, LBD (Ligand Binding Domain) et AF2, responsable des changements conformationnels en présence de co-répresseurs ou co-activateurs, dans leur partie C-terminale (Glass and Ogawa, 2006)

Pour médier leurs effets biologiques, ces facteurs de transcription partagent tous la propriété de former des hétérodimères avec le récepteur X à l'acide rétinoïque (RXR). Cette interaction occasionne une modification conformationnelle des récepteurs et permet la fixation du complexe PPAR-RXR sur des éléments de réponse nommés PPRE (PPAR Response Element) dans la région promotrice de gènes cibles sur une séquence consensus (AGGTCAXAGGTCA). D'une manière générale, les gènes impliqués codent des protéines remplissant des fonctions associées à l'homéostasie lipidique et glucidique ainsi qu'à l'inflammation (Glass and Ogawa, 2006; Kota et al., 2005) (Fig 10).

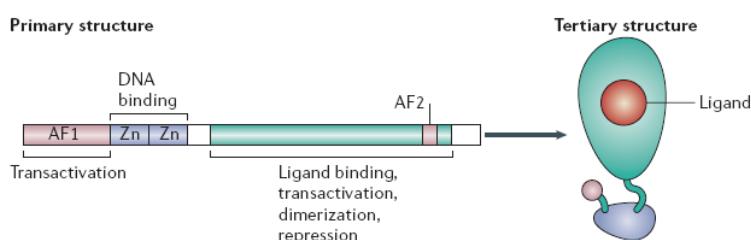


Figure 10 | Structure des PPAR (récepteur nucléaires en général) (d'après (Glass and Ogawa, 2006)). Cette structure consiste en un domaine d'activation amino-terminal (connu souvent sous « activation function 1 » (AF1)), un domaine central de liaison à l'ADN et un domaine de liaison au ligand carboxy-terminal (LBD). Ce dernier domaine est essentiel aussi pour l'interaction ligand-dépendante avec des co-activateurs et des co-répresseurs dans la courte région hélicoïdale connue sous AF2. Le domaine LBD contribue à l'homodimérisation et l'hétérodimérisation des PPARs et de plusieurs récepteurs nucléaires. Zn, domaine en doigt de zinc.

En l'absence de ligand, le complexe PPAR-RXR se lie au complexe co-répresseur NcoR/SMRT (Nuclear receptor corepressor/Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors). Ces derniers sont dégradés dès la fixation du ligand et remplacés par certains complexes co-activateurs comme SRC1 (Steroid Receptor Coactivator 1) et CBP/p300 (cAMP response element Binding (CREB)-binding Protein/p300) pour favoriser la transcription de certains gènes. Il s'agit d'une régulation positive (Glass and Ogawa, 2006) (Fig 11).

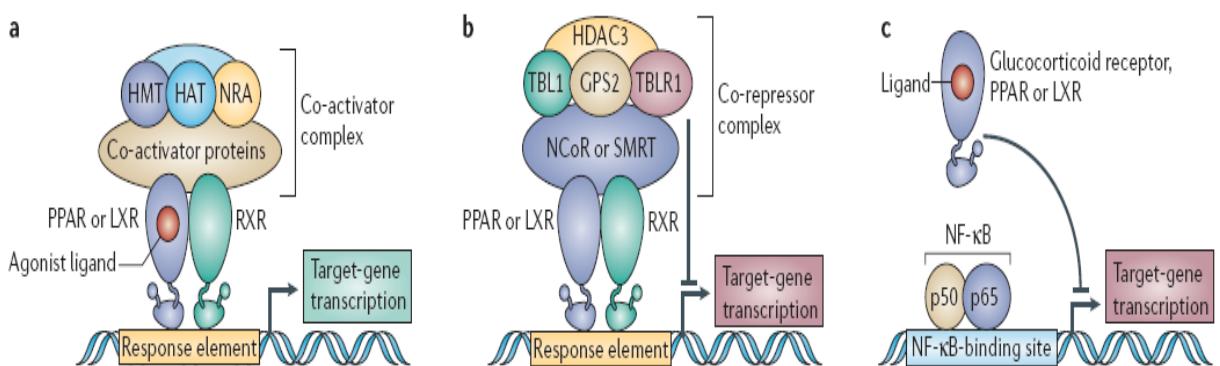


Figure 11 | Activités transcriptionnelles des PPARs (d'après (Glass and Ogawa, 2006)).

Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires peuvent réguler positivement et négativement la transcription par plusieurs mécanismes. **a** | activité transcriptionnelle dépendante du ligand. Il s'agit d'une liaison à un élément de réponse (sur l'ADN) spécifique dans le gène cible. La liaison de l'agoniste au PPAR aboutit au recrutement de complexes coactivateurs qui contiennent des activités enzymatiques nécessaires pour le remodelage de la chromatine, des modifications spécifiques des histones, et le recrutement de la RNA polymerase II, par exemple NRA (Nucleosome Remodelling Activity), HAT (Histone AcetylTransferase) et la HMT (Histone MethylTransferase). **b** | Répression active indépendante du ligand. Des hétérodimères comme LXR et PPAR sont capables de se fixer sur un élément de réponse sur l'ADN en absence du ligand et sans recruter un complexe corépresseur qui va exercer une répression active. Un complexe corépresseur bien défini contient NcoR (nuclear-receptor co-repressor) ou SMRT (silencing mediator of retinoic-acid and thyroid-hormone receptor), HDAC3 (histone deacetylase 3), TBL1 (Transducin-β-Like 1), TBLR1 (TBL1-like Related protein 1) et le GPS2 (G-Protein-pathway Suppressor 2). Ce complexe antagonise les actions des coactivateurs et maintient les gènes dans un état de répression en absence de ligand. **c** | Transrépression dépendante du ligand. Les LXR et PPAR, comme d'autres récepteurs nucléaires, inhibent la transcription d'une manière dépendante du ligand en antagonisant les actions d'autres facteurs de transcription signal-dependents comme le NF-κB.

Le processus de régulation transcriptionnelle repose également sur la fixation aux PPAR de ligands de spécificité variable. Les agonistes endogènes sont représentés par les

acides gras insaturés, ainsi que les éicosanoïdes dérivés du métabolisme de l'acide arachidonique (leucotriènes, prostaglandines). En effet, le LTB4 se fixe préférentiellement sur PPAR- α , la PGJ2 se fixe sur PPAR- β alors que des éicosanoïdes comme le 15d-PGJ2 et l'acide 13-hydroxyoctadecadienoïque se fixent sur PPAR- γ . Il existe également des composés synthétiques liant les PPAR. Ainsi le fénofibrate et le WY 14.643 se lient préférentiellement à PPAR- α . La carbaprostacycline est un analogue de la prostaglandine I2 souvent utilisée dans l'étude des fonctions biologiques de PPAR- β , mais présente une faible affinité pour l'isoforme α . Le GW501516 est plus spécifique de PPAR- β que la carbaprostacycline. Enfin les thiazolidinediones, classées comme molécules anti-diabétiques, activent sélectivement le PPAR- γ .

Les PPAR exercent également des effets transrépresseurs, en privant les facteurs de transcription de leurs co-activateurs, ou en inhibant les voies des MAP kinases. L'activation de PPAR- α est capable d'inhiber les voies de signalisation de NF- κ B et AP-1 par interaction directe avec p65 et JUN (Delerive et al., 1999). Celle de PPAR- γ est capable de bloquer l'activation de JNK (c-JUN N-terminal Kinase) et p38 MAP kinase (Desreumaux et al., 2001).

2. PPAR et système immunitaire

Le rôle régulateur de PPAR- α et PPAR- γ a été mis en évidence au niveau du système immunitaire *in vitro* et *in vivo* (Glass and Ogawa, 2006). En effet, les PPARs sont exprimés par de nombreux types cellulaires au sein du système immunitaire.

Au niveau des lymphocytes T (LT), PPAR- α et PPAR- γ diminuent la production d'IL-2 via l'inhibition de NF- κ B et NFAT (Cunard et al., 2002). Ils diminuent aussi la production d'IFN- γ . PPAR- α inhibe l'expression de T-bet qui est un facteur de polarisation Th1 (Jones et al., 2002). L'expression de PPAR- α est plus élevée dans les lymphocytes de souris mâles que chez les femelles. L'inactivation génique de PPAR- α conduit, chez les mâles, à une production accrue d'IFN- γ et de TNF- α et une réduction concomitante de la production de cytokines Th2 par les lymphocytes. L'induction d'une encéphalomyélite autoimmune expérimentale conduit à une exacerbation de la pathologie par rapport à des animaux WT uniquement chez les mâles (Dunn et al., 2007 ; Hontecillas and Bassaganya-Riera, 2007). PPAR- γ contrôle également l'activité des lymphocytes régulateurs CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ dans un modèle de colite (Dunn et al., 2007 ; Hontecillas and Bassaganya-Riera, 2007). Enfin, l'activation de PPAR- γ inhibe la prolifération des lymphocytes B normaux et malins (Padilla et al., 2000).

PPAR- γ joue également un rôle dans la maturation des DCs (Gosset et al., 2001). Son activation augmente l'expression de CD36 et CD86 et diminue celle de CD80 sur les DCs activées par le LPS et le CD40L. Cet isoforme affecte le phénotype des DCs en altérant le métabolisme lipidique (Szatmari et al., 2007). Il module aussi l'expression de CD1d *via* la synthèse accrue d'acide rétinoïque et l'activation du RXR, pouvant ainsi augmenter l'activité stimulatrice des DC vis-à-vis des iNKT (Szatmari et al., 2006). PPAR- γ est impliqué dans la régulation de l'expression de CD36 expression dans les monocytes humains (Boyer et al., 2007) : effet de l'IL-13 via PPAR gamma sur les macrophages ou monocytes (Berry et al., 2007) et IL-13 et iNOS par les monocytes/macrophages (Authier et al., 2008).

Les mastocytes expriment PPAR- β et γ qui régulent négativement leur dégranulation (Sugiyama et al., 2000). PPAR- α et PPAR- γ sont exprimés dans les éosinophiles et leur activation inhibe le chimiotactisme et la cytotoxicité dépendante des anticorps (Woerly et al., 2003).

Les PPAR diminuent l'inflammation dans des modèles d'asthme (Honda et al., 2004; Woerly et al., 2003), de colite (Desreumaux et al., 2001), de rectocolite hémorragique (Dubuquoy et al., 2003) et d'arthrite (Setoguchi et al., 2001). Les animaux déficients en PPAR- α présentent une absence de régulation de la production spontanée de cytokines inflammatoires en vieillissant (Spencer et al., 1997), une réponse exacerbée des explants aortiques à des stimuli proinflammatoires, une augmentation de la production d'IgE (Woerly et al., 2003).

4. PPAR et peau

Chez l'embryon, les PPAR sont exprimés dans l'épiderme puis disparaissent après la naissance, sauf dans les follicules pileux. Cependant, au cours d'une cicatrisation consécutive à une blessure cutanée, l'expression de PPAR- α et PPAR- β dans les kératinocytes de l'épiderme peut être réactivée (Michalik et al., 2001). Les PPARs sont aussi exprimés par les cellules recrutées dans la peau lors d'une réaction inflammatoire (voir plus haut).

Le rôle anti-apoptotique de PPAR- β sur les kératinocytes est bien décrit (Di-Poi et al., 2002). En effet, il active Akt1 (aussi appelé protein kinase B- α) *via* l'augmentation de transcription d'ILK (Integrin-Linked Kinase) et de PDK1 (3-Phosphoinositide-Dependent Kinase 1), deux éléments de la voie de signalisation d'Akt1. L'activation de cette dernière molécule prolonge la survie des kératinocytes suite à la phosphorylation et à l'inhibition

des protéines pro-apoptotiques comme Bad et FKHR (ForKHead family of transcription factor). D'autre part, Akt1 active NF-κB qui stimule la production de MMP-9 (Matrix MetalloProtease-9). Cette dernière est capable de réguler la migration des kératinocytes. A l'opposé, PPAR- β atténue la prolifération des kératinocytes par modulation de l'activité de PKC α /Raf/MEK/ERK (Kim et al., 2005).

PPAR- β joue également un rôle dans la différenciation des kératinocytes « granuleux » en régulant la synthèse du cholestérol (Calleja et al., 2006). Pendant la phase tardive de la différenciation de ces cellules, PPAR- β favorise la formation, dans le cytosol, des granules lamellaires, qui comprennent des lipides, des enzymes hydrolytiques et des protéines. Au pôle appical des kératinocytes, la dégranulation libère ces substances et contribue à la formation des couches lipidiques autour des cornéocytes et à la génération de la barrière imperméable de la peau.

Les propriétés immunomodulatrices des PPAR au niveau cutané ont été initialement mises en évidence à l'aide d'animaux déficients en PPAR- α et d'un modèle d'inflammation induite par le LTB₄, son principal ligand naturel (Devchand et al., 1996). Angeli *et al* ont démontré le rôle bénéfique de PPAR- γ dans un modèle de d'hypersensibilité de contact induite par le FITC dans lequel un agoniste de PPAR- γ inhibe la migration des LC de la peau vers les ganglions drainants (Angeli et al., 2003). Sheu *et al* ont montré un rôle bénéfique d'un agoniste de PPAR- α dans un modèle où la barrière cutanée est lésée suite à un traitement à l'acétone ou le SDS (sodium dodecyl sulfate) (Sheu et al., 2002); PPAR- β exerce également rôle bénéfique dans ce modèle (Schmuth et al., 2004)

L'utilisation d'agonistes de PPAR- γ (la rosiglitazone) dans le traitement du psoriasis résulte en une diminution de la pathologie chez les patients atteints (Kuenzli and Saurat, 2003).

III. La dermatite atopique

1. Immunopathologie

L'atopie est la prédisposition génétique aux maladies allergiques. Le terrain atopique se transmet génétiquement sans affecter systématiquement tous les membres de la famille (Bieber, 2008; Leung et al., 2004). La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui toucherait 15% de la population occidentale. Elle survient surtout chez les enfants et les jeunes adultes et serait la première étape de l'atopie qui amènerait dans plus que 30% des cas à l'asthme et la rhinite. Les signes cutanés sont caractérisés par un prurit, une sécheresse cutanée et un eczéma évoluant par poussées. L'éruption se présente sous forme de placards érythémateux, souvent oedémateux, avec une évolution vésiculo-suintante. Les lésions, dans le stade chronique, deviennent sèches, parfois hyperkératosiques et fissuraires. Il s'agit de lichénification.

La DA se caractérise par l'existence d'une réponse immunitaire vis-à-vis d'allergènes environnementaux ou atopènes comme les pneumoallergènes, pollens, poils d'animaux... La DA peut être exacerbée par une sensibilisation cutanée ou intestinale à des allergènes alimentaires contenus par exemple dans le lait, l'œuf et le soja (Leung et al., 2004). Cette maladie apparaît également sous la dépendance de facteurs microbiens, comme la colonisation cutanée par le *Staphylococcus aureus*. Celui-ci sécrète des toxines dont l'effet superantigénique amplifie et prolonge la réponse inflammatoire. Sans être la cause de l'eczéma, il peut conduire à la synthèse d'IgE spécifiques du staphylocoque dont le taux est correlé à la sévérité de la pathologie (Leung et al., 1993).

D'un point de vue immunologique, la physiopathologie de la DA s'articule en deux phases comme ci-dessous (Fig. 12) : elle débute par une inflammation de type Th2 puis s'oriente progressivement vers un phénotype Th1 en phase chronique.

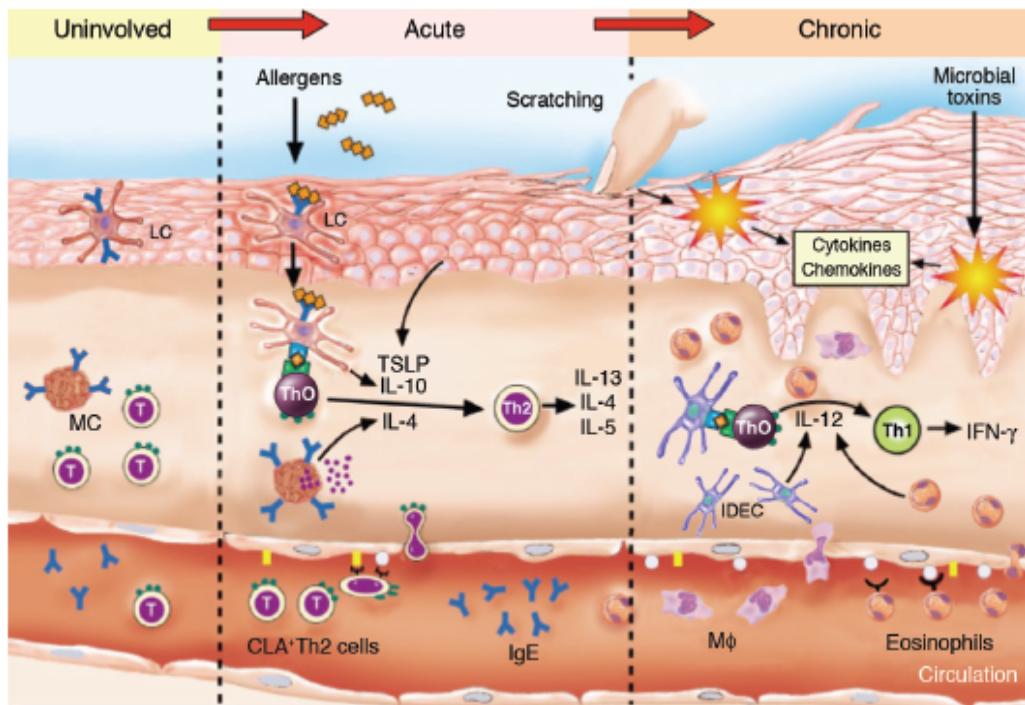


Figure 12. Immunopathologie de la dermatite atopique (d'après (Leung et al., 2004)).

Dans le sang périphérique de patients atteints de DA, les LTh2 circulant induisent une forte réponse IgE et une éosinophilie. Ces LTh2 expriment le récepteur, CLA (Cutaneous Lymphocyte Antigen), qui va les guider vers la peau où ils participent à la réaction allergique. Les mastocytes et les LCs chargées d'IgE vont contribuer également au développement d'une réponse Th2 cutanée. Après le contact de la peau avec des allergènes ou produits bactériens, ou après lésion cutanée, les kératinocytes sont activés et produisent des cytokines et chimiokines proinflammatoires qui induisent l'expression de molécules d'adhérence sur l'endothélium vasculaire et facilitent ainsi l'infiltration cutanée de cellules inflammatoires depuis la circulation sanguine. La TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) dérivée des kératinocytes favorise aussi la différenciation des LT naïfs en des LTh2. Les lésions aigues sont associées à un profil cytokinique Th2 prédominant avec une infiltration prédominante de LTh2, alors que les lésions chroniques sont associées à un profil Th1 prédominant avec une infiltration de IDEC (Inflammatory Dendritic Epithelial Cells), macrophages ainsi que des éosinophiles. C'est la production d'IL-12 par les éosinophiles et les APCs qui résulte de la commutation vers le profil cytokinique Th1 associé avec une augmentation d'expression de l'IFN- γ .

De nombreux éléments sont en faveur d'un processus aboutissant à une pathologie auto-immune, caractérisée par la production d'anticorps IgE dirigés spécifiquement contre des protéines autologues de l'épiderme (Yokozeki et al., 2000). Autoantigène Hom s 1 à 5 (Schmid-Grendelmeier et al., 2005; Seiberler et al., 1999) (Hom s 1 à 5). Des autoanticorps spécifiques d'une SuperOxide Dismutase à manganèse (MnSOD) ont été mis en évidence (Aichberger et al., 2005).

Il existe également une forme minoritaire de la DA « intrinsèque » qui n'est pas associée à une production sérique accrue d'IgE contrairement à la DA « extrinsèque »(Leung et al., 2004).

2. Dermatite atopique et gène de susceptibilité

La transmission héréditaire de la DA reste actuellement hypothétique (transmission autosomique dominante). Plusieurs gènes candidats ont été identifiés. En effet, des polymorphismes dans ces gènes ont été associés avec la DA. Parmi ces gènes, susceptibles de jouer un rôle important dans la physiopathologie de la DA, citons :

- MCC1 (Mast cell chymase 1) sur le chromosome 14q11, impliquée dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'accumulation tissulaire d'une variété de cellules effectrices ainsi que dans le remodelage tissulaire (Mao et al., 1996).
- RANTES (ou CCL-5), sur le chromosome 17q11.2-q12, qui peut stimuler la sécrétion d'histamine à partir des basophiles, activer les éosinophiles, et attirer les monocytes, éosinophiles et les LT mémoires vers le site de l'inflammation (Nickel et al., 2000).
- Eotaxine 1, sur le chromosome 17q21.1-q21.2, un chimioattractant et un activateur des éosinophiles et des lymphocytes Th2 (Tsunemi et al., 2002).
- Le groupe de gènes codants des médiateurs de la réponse immune (IL-4 (Kawashima et al., 1998), IL-13 (Liu et al., 2000), TIM-1 (T-cell Immunoglobulin domain Mucin domain protein 1) ainsi que SPINK5 (Serine Protease Inhibitor Kazal type 5) (Kato et al., 2003) sur le chromosome 5q31-33 (Beyer et al., 2000).

3. Fc récepteurs et atopie

3.1. Polymorphismes de Fc ϵ RI α et FcR β

Des polymorphismes de Fc ϵ RI ont été correlés avec l'atopie en général et plus particulièrement avec la dermatite atopique. Ainsi, Hasegawa *et al* ont démontré la présence d'un polymorphisme dans le promoteur du gène de la chaîne Fc ϵ RI α (chromosome 1q21) associé à la dermatite atopique chez des patients japonais (Hasegawa et al., 2003). Comme Fc ϵ RI α est essentiel à la fixation de l'IgE, les polymorphismes qui l'affectent peuvent modifier l'affinité de la liaison de l'IgE, soit en la rendant encore plus forte, ce qui pourrait résulter en une réponse inflammatoire exacerbée, soit en déstabilisant la fixation de l'IgE, ce qui induit probablement des mécanismes de compensation *via* d'autres FcR (comme les Fc γ Rs) qui contribueraient d'une façon « exagérée » à la réponse inflammatoire. A ce jour, un tel impact fonctionnel n'a cependant pas été démontré.

Des polymorphismes (d'un seul nucléotide) dans le gène de *FcRβ* (chromosome 11q12-13) ont également été associés à l'atopie (Morar et al., 2006) (Cox et al., 1998)(Cookson et al., 2001) (polymorphisme commun pour psoriasis et DA) (Moffatt et al., 1992). Les auteurs ont suggéré, mais pas démontré, que ces polymorphismes pourraient contribuer à l'atopie *via* une augmentation d'expression de FcεRI (Morar et al., 2006). Le polymorphisme dans *FcRβ* pourrait aggraver l'inflammation soit en affectant le niveau d'expression de FcεRI, soit en affectant la signalisation *via* FcεRI et CD16.

3.2. CD23, atopie et polymorphismes

Une association entre des polymorphismes (d'un seul nucléotide) dans le gène de CD23 (*FCER2*) et les taux élevés d'IgE ainsi que la sévérité de la pathologie chez des enfants asthmatiques ont été montrées (Conrad et al., 2007; Tantisira et al., 2007). Aucun polymorphisme dans le gène de CD23 n'a été cependant été associé spécifiquement à la dermatite atopique.

Chez les patients atteints de DA, le nombre de DC dermiques exprimant CD23 augmente dans les lésions (Buckley et al., 1992), le nombre des lymphocytes T cutanés CD23⁺ (surtout CD8⁺) ainsi que le sCD23 (CD23 soluble) sérique augmentent également (Sakamoto et al., 1990) (Bujanowski-Weber et al., 1990). Banerjee *et al* ont démontré une expression aberrante de ce récepteur sur les monocytes circulants mais surtout une augmentation des taux de sCD23 chez les patients atteints de DA (Banerjee et al., 1998). Selon Muller *et al*, CD23 serait absent sur les monocytes/macrophages chez les patients atteints de DA mais toujours présent sur les lymphocytes B (Muller et al., 1991). La sévérité de la DA est accompagnée en général par une augmentation des PBMC CD23⁺, qui comportent des lymphocytes T (majoritairement CD8⁺), B et des monocytes (Takigawa et al., 1991).

3.3. CD16 et dermatite atopique

Une étude très récente, chez des enfants turcs atteints de dermatite atopique, a montré que le génotype V158V du CD16 pourrait constituer un facteur de risque génétique pour le développement de la dermatite atopique (Zeyrek et al., 2008).

4. Dermatite atopique et barrière cutanée

La dermatite atopique est caractérisée par un dysfonctionnement de la barrière cutanée. Des études récentes montrent que les mutations (R501X et 2282del4) sur le

chromosome 1q21.3 qui réduisent ou suppriment l'expression de la filaggrine constituent un facteur de prédisposition majeur à la dermatite atopique (Palmer et al., 2006; Smith et al., 2006). La filaggrine est indispensable pour la formation d'une barrière protéolipidique cutanée imperméable. Les mutations dans le gène de la filaggrine rendent la barrière cutanée perméable à des antigènes ou des pathogènes susceptibles d'exacerber la dermatite atopique.

5. Modèles animaux de dermatite atopique

Divers modèles animaux développent une pathologie cutanée (ou systémique à manifestations cutanées) proche de la dermatite atopique humaine. Il s'agit pour l'essentiel de modèles de souris génétiquement modifiées qui développent spontanément une dermatite.

- Souris transgénique pour l'IL-4 : ces souris développent spontanément non seulement des symptômes d'une dermatite atopique humaine mais aussi une infection cutanée par *Staphylococcus aureus* et une conjonctivite (Chan et al., 2001).
- Souris NC/Nga qui, sont susceptibles au choc anaphylactique à l'OVA et qui développent spontanément des lésions de DA sur la face, le cou, les oreilles et la peau dorsale lorsqu'elles sont élevées dans une animalerie conventionnelle, confirmant l'implication des facteurs de l'environnement dans cette pathologie (Matsuda et al., 1997).
- Souris transgéniques pour la TSLP développent spontanément des lésions de DA qui sont, d'une façon intéressante, indépendantes des lymphocytes T (Yoo et al., 2005).
- Les souris transgéniques pour IL-18 et qui développent une dermatite « atopique » exacerbée par rapport à des souris sauvages après sensibilisations répétées au trinitrochlorobenzene (Kawase et al., 2003).
- Souris déficientes en RXR- α et β dans les kératinocytes qui développent spontanément une dermatite atopique dépendante de la TSLP. Cette pathologie n'est cependant pas limitée à la sphère cutanée (splénomégalie à éosinophile) (Li et al., 2005).
- Souris transgéniques pour la SCCE (stratum corneum chymotryptic enzyme) encore appelée kallikréine 7, une sérine protéase nécessaire pour la desquamation. Ces souris développent spontanément une dermatite atopique (Hansson et al., 2002).
- Souris transgéniques pour l'IL-31 qui présentent une alopecie et développent une DA spontanée prurigineuse avec une hyperkératose, acanthose et une infiltration de cellules inflammatoires ainsi qu'une mastocytose (Dillon et al., 2004).

- Application épicutanée d'ovalbumine en l'absence d'adjuvant. Il s'agit d'un modèle de dermatite induite, initialement développée par le laboratoire de R. Geha (Boston) (Spergel et al., 1998). Ce modèle, que nous avons choisi pour nos études, présente les intérêts suivants :
 - sur le plan pratique : cette pathologie est développée vis-à-vis d'un antigène expérimental couramment utilisé, elle est inductible chez la souris (et le rat) génétiquement modifiée ou non, quel que soit son fond génétique.
 - sur le plan physiopathologique : cette inflammation cutanée est accompagnée d'une inflammation des voies aériennes, très fréquente chez les jeunes enfants atteints de dermatite, elle est associée à une réponse mixte Th2/Th1, comme dans la pathologie humaine.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

FcR et dermatite atopique

Comme nous l'avons mentionné, Fc ϵ RI et Fc γ RIII/CD16 jouent un rôle important dans les pathologies allergiques. Cependant, Le rôle de ces deux récepteurs dans ces pathologies a souvent été examiné dans des études distinctes. De plus, les données, concernant leur implication précise dans la dermatite atopique, proviennent avant tout d'études sur des patients atopiques ayant une expression accrue de ces récepteurs au niveau cutané.

La première partie de notre travail a donc été consacrée à l'étude de la contribution de Fc ϵ RI et de CD16 dans un modèle murin reproduisant fidèlement, en l'absence d'adjuvant, la physiopathologie de la dermatite atopique humaine (DA) y compris la présence d'inflammation des voies aériennes. Des animaux génétiquement déficients pour ces récepteurs ont été utilisés.

PPAR et dermatite atopique

Les PPAR ont été identifiés comme des régulateurs importants de l'immunité et l'inflammation. Ils sont en effet exprimés dans des nombreuses cellules immunitaires recrutées au niveau cutané lors d'une réaction inflammatoire. Les effets d'agonistes des diverses isoformes des PPAR ont été étudiés dans divers modèles d'inflammation d'origine non-immune. Il a de plus été démontré que PPAR- α et PPAR- β sont impliqués dans les processus cicatriciels.

Nous avons donc souhaité déterminer le rôle régulateur joué par PPAR- α dans un modèle d'inflammation cutanée d'origine immune : la dermatite atopique. Outre des animaux déficients pour PPAR- α , nous avons également étudié les effets, dans ce modèle, d'un agoniste. De plus, afin d'examiner la relevance potentielle pour la pathologie humaine de l'utilisation thérapeutique de ces agonistes, nous avons examiné l'expression de PPAR- α chez des patients atopiques.

RÉSULTATS

Article 1.

Fc ϵ RI and Fc γ RIII/CD16 differentially regulate atopic dermatitis

Introduction

Dans cet article, les effets de l'induction d'une dermatite atopique chez des souris déficientes en Fc ϵ RI ou en CD16 ont été comparés à ceux observés chez des animaux de type sauvage (WT). Par ailleurs, nous avons également étudié des animaux déficients pour FcR γ qui, outre ces deux récepteurs précités, ne possèdent ni CD64, ni Fc γ RIV.

Nos résultats mettent en évidence la contribution distincte de Fc ϵ RI et CD16 à la réponse immune associée à la pathologie.

Conclusion

L'absence FcR γ conduit à une inhibition pratiquement totale de la dermatite atopique et de la réponse immune associée. Cette absence d'inflammation est accompagnée d'une expression accrue d'IL-10 et de Foxp3 au niveau cutané. L'absence de Fc ϵ RI ou de CD16 n'inhibe que partiellement la pathologie.

Cependant les effets sur la réponse immune sont distincts. Les symptômes de la DA sont complètement absents chez les souris déficientes en FcR γ et partiellement inhibés chez les souris déficientes en Fc ϵ RI ou CD16. Fc ϵ RI régule les réponses Th1 et Th2, le recrutement des mastocytes vers les ganglions drainants et la production d'IgE, CD16 régule uniquement la réponse Th2, la prolifération lymphocytaire et la production d'IgG₁. La régulation différentielle de la production des deux isotypes Th2 d'Ig a été associée à une régulation différentielle de l'expression ganglionnaire d'IL-4 et d'IL-21.

La distribution cellulaire différente des deux récepteurs peut expliquer, au moins en partie ces effets différentiels. Un mécanisme bidirectionnel de régulation Ig-FcR semble également avoir été mis en évidence.

Article 2

Peroxisome proliferator-activated receptor α regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis

Introduction

Le rôle de PPAR- α dans un modèle d'inflammation cutanée d'origine immunitaire a été étudié à la fois par une approche génétique et une approche pharmacologique.

Dans le modèle de dermatite atopique précédemment décrit, PPAR- α joue un rôle régulateur majeur de la pathologie et de la réponse immune associée.

Dans cet article, nous démontrons également que, dans ce modèle expérimental, les altérations de la barrière cutanée ne sont pas à l'origine de la pathologie.

Enfin, nous montrons également un déficit de l'expression cutanée de PPAR- α dans des biopsies de patients atopiques.

Conclusion

Suite à la sensibilisation cutanée, les souris déficientes en PPAR- α montrent une exacerbation des réponses cutanée et pulmonaire, des réponses cellulaires ganglionnaires et spléniques spécifiques de l'ovalbumine, ainsi que de la production de l'IgE et IgG_{2a} par rapport aux souris de type sauvage. Ce phénomène est associé à une exacerbation des réponses moléculaires cutanées Th2 et surtout Th1 ainsi qu'à une augmentation de l'expression de NF- κ B.

D'une façon intéressante, l'expression de PPAR- α a été diminuée dans les lésions cutanées de patients atteints de DA suggérant que cette diminution d'expression peut contribuer à la pathologie. Enfin, l'application de WY 14,643, un agoniste spécifique de PPAR- α , inhibe de manière importante la réponse cutanée que ce soit au niveau cellulaire ou moléculaire. Ceci démontre que le PPAR- α constitue une cible thérapeutique importante dans les pathologies allergiques cutanées.

Résultats non présentés

Contribution majeure de CD23 dans la dermatite atopique

L'absence de Fc ϵ RI n'inhibe que partiellement la dermatite atopique et la production d'IgE. Nous avons voulu déterminer si CD23, l'« autre » récepteur pour l'IgE dont la contribution est souvent négligée pouvait également contribuer à la pathologie. En effet, bien que le CD23 soit connu pour son action inhibitrice dans la régulation de la réponse IgE chez la souris, quelques rares publications ont émis l'hypothèse d'un rôle pro-inflammatoire de ce récepteur dans des modèles animaux de colite ou d'arthrite (Kleinau et al., 1999; Yu et al., 2001).

Nous avons donc étudié le rôle de CD23 dans le modèle de dermatite atopique précédemment décrit, en comparant la réponse induite par l'ovalbumine chez des souris déficientes pour CD23 et des souris de souche sauvage. De façon surprenante, nous avons observé une inhibition complète des réponses cutanée et humorale chez les animaux déficients. CD23 joue donc un rôle activateur dans ce protocole expérimental. De plus, l'expression de CD23 est fortement augmentée dans des biopsies cutanées de patients atteints de dermatite atopique par rapport à l'expression mesurée dans des biopsies d'individus sains.

CD23 pourrait donc constituer une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de la dermatite atopique.

DISCUSSION GENERALE

Contribution de Fc ϵ RI et CD16 dans la dermatite atopique

Choix des modèles

Nous nous sommes basés sur plusieurs données pour étudier la contribution de ces deux récepteurs dans le modèle murin de DA.

1. Les données disponibles sur l'augmentation de l'expression de ces récepteurs chez l'homme.
2. Les études de polymorphismes impliquant ces récepteurs chez l'homme.
3. Le rôle connus de ces récepteurs dans l'asthme expérimental.
4. Le fait que notre modèle de DA est caractérisé par une augmentation de la production humorale essentiellement d'IgE et d'IgG₁ spécifiques de l'OVA. En effet, CD16 *in vivo* fixe préférentiellement l'IgG₁ sous forme de complexe immuns. Comme dans ce modèle, les concentrations d'IgG_{2a} et _{2b}, essentielles pour les activités physiologiques de Fc γ RI/CD64 et Fc γ RIV (Kraft and Kinet, 2007 ; Nimmerjahn and Ravetch, 2008), sont au dessous du niveau de détection de notre méthode ELISA, ceci laisse penser que la contribution de ces deux Fc γ R n'est pas majeure. Les souris déficientes en FcR γ nous ont donc permis d'estimer, au moins de manière grossière, la contribution conjointe de Fc ϵ RI et CD16 à la pathologie.

Limites des modèles et relevance pour la pathologie humaine

Nous avons déjà mentionné l'intérêt du modèle pour l'étude de la physiopathologie humaine (absence d'adjuvant, inflammation pulmonaire, réponse mixte Th2/Th1...). Une des hypothèses physiopathologiques rendant compte de la dermatite atopique humaine est une altération primaire ou secondaire de la barrière cutanée (Bieber, 2008; Gupta et al., 2008). Nous avons cependant montré que l'induction de la dermatite atopique, dans le modèle expérimental que nous avons choisi, n'était pas directement lié à une altération de la barrière cutanée. En effet, les mesures de perméabilité transcutanée (TEWL) ont montré que celle-ci était uniformément augmentée suite aux multiples étapes d'« emballage et déballage » par rapport à celle mesurée sur des animaux dont la peau abdominale a été rasée mais qui n'ont jamais été « emballés ». Cette augmentation est indépendante de la sensibilisation par l'ovalbumine. De même, la composition lipidique de la peau et la localisation des protéines de structure (filaggrine, loricrine et involucrine) est différente de celle d'animaux non manipulés, mais indépendante de la sensibilisation par l'ovalbumine.

Si ce modèle ne peut donc pas rendre compte d'une altération de la barrière cutanée dépendante de l'antigène, il permet *a contrario*, d'isoler la composante immune de la pathologie.

Si l'utilisation d'animaux génétiquement déficients représente une approche élégante, les effets observés ne rendent compte que de la contribution de ces récepteurs à la pathologie murine et leur impact sur la pathologie humaine peut être sensiblement différent. Ainsi, la distribution cellulaire plus étendue de Fc ϵ RI chez l'homme, en particulier au niveau des cellules présentatrices d'antigène -DC, cellules de Langerhans- et des éosinophiles pourrait conférer à ce récepteur un rôle plus important chez l'homme que celui que nous avons mis en évidence chez la souris.

Il est également possible que la contribution réelle de Fc ϵ RI à la pathologie murine elle-même, ait été minimisée suite à une compensation partielle, due à CD16, comme nous l'avons mentionné dans l'article 2. En effet, il a été démontré que les animaux déficients en Fc ϵ RI présentaient, suite à une disponibilité accrue de FcR β , une augmentation de l'expression mastocytaire de CD16 et des réactions d'anaphylaxie dépendant de l'IgG₁ (Dombrowicz et al., 1997).

La diversité plus grande des Fc γ R chez l'homme et les différences entre sous-classes d'immunoglobulines chez l'homme et la souris incitent également à la prudence quant à une extrapolation directe des résultats expérimentaux à la pathologie humaine.

L'étude de souris exprimant les récepteurs humains avec une distribution cellulaire comparable à celle observée chez l'homme représente, malgré la difficulté à les générer et à les caractériser, une première réponse à ces limitations, mais a parfois conduit, notamment dans le cas de Fc ϵ RI, à des résultats paradoxaux (Staumont et Dombrowicz, résultats non publiés). L'humanisation simultanée des récepteurs et de leur(s) ligand(s) permettra sans doute de progresser significativement dans ce domaine.

FcR γ

Chez les souris déficientes en FcR γ , les symptômes de la maladie sont absents, la réponse immune est complètement inhibée. Une abolition complète de la réponse locale a été déjà été observée dans d'autres modèles d'allergie chronique comme l'asthme (Kitamura et al., 2007).

Immunorégulation

L'originalité dans ce travail réside dans le fait que nous avons pu corrélérer l'inhibition de la réponse cutanée chez les souris déficientes en Fc γ R avec une augmentation d'expression locale d'IL-10 et de Foxp3 suggérant l'existence de mécanismes régulateurs «naturels» qui seraient réprimés suite à l'activation via Fc γ R. Compte tenu de la très forte homologie de séquence au niveau des domaines extracellulaires de CD16 et CD32 chez la souris (Brooks et al., 1989), les complexes immuns IgG₁-Ag activent à la fois CD16 et CD32b inhibiteur. *In vivo*, l'IgG₁ exercerait une activité inhibitrice, *via* CD32b, 10 fois supérieure à son activité activatrice, *via* CD16 (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). En absence de signaux provenant des Fc γ R activateurs (essentiellement CD16) et Fc ϵ RI, ces signaux inhibiteurs provenant de CD32b, fortement exprimé sur les DC, deviendraient prépondérants et établiraient cet état de «tolérance» vis-à-vis de l'allergène.

CD32b est aussi exprimé sur d'autres cellules présentatrices d'antigène, comme les lymphocytes B ainsi que des cellules effectrices comme les mastocytes (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Comme les DC, les mastocytes peuvent également contribuer à la production d'IL-10 et/ou l'induction des Treg (Grimbaldeston et al., 2007; Lu et al., 2006 ; Malbec and Daeron, 2007). Ainsi, comme il a été démontré dans un modèle de tolérance au niveau des muqueuses (Samsom et al., 2005), l'activation de CD32b -par les complexes IgG₁-Ag- sur les DC induit la production d'IL-10 ainsi que la génération de lymphocytes T régulateurs spécifiques de l'antigène qui contribuent à l'état de tolérance locale vis-à-vis de cet antigène. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence, par immunohistochimie, une augmentation du nombre de cellules Foxp3⁺ au niveau des lésions cutanées des souris déficientes en Fc γ R. Il s'agit probablement d'un manque de sensibilité de la technique utilisée.

Fc ϵ RI

Chez la souris déficiente en Fc ϵ RI, la pathologie a été partiellement inhibée. Cette inhibition est également accompagnée d'une augmentation de l'expression cutanée d'IL-10 et de Foxp3. Au niveau humorale, seule la production d'IgE est affectée.

Les mastocytes

La mastocytose est également fortement diminuée. Ceci peut être expliqué par le fait que les mastocytes abondants dans la peau, exercent principalement leurs activités

effectrices *via* Fc ϵ RI et leur rôle important médié par ce récepteur est décrit dans des modèles d'asthme en absence d'adjuvant (Mayr et al., 2002 ; Taube et al., 2004). L'inhibition partielle de la réponse inflammatoire dans les souris déficientes en Fc ϵ RI est vraisemblablement due à l'activité de CD16 qui subsiste, non seulement sur les APC, mais également sur les mastocytes. Le nombre de mastocytes migrant vers les ganglions drainants semble être contrôlé par Fc ϵ RI. En effet, les souris déficientes pour ce récepteur, comme les souris déficientes en FcR et contrairement aux souris déficientes en CD16, ne présentent aucune augmentation de l'infiltat mastocytaire suite à la sensibilisation allergénique. Il a été démontré que les mastocytes sont capables de chimiotactisme dépendant de Fc ϵ RI, de l'IgE et de l'antigène de sensibilisation (Kitaura et al., 2005). Ce phénomène n'a jamais été décrit pour aucune sous-classe d'IgG.

Les basophiles

Les basophiles ne sont pas traditionnellement considérés comme des cellules cutanées. Cependant, dans un modèle d'inflammation cutanée chronique dépendant de l'IgE, un rôle prépondérant des basophiles a été mis en évidence (Mukai et al., 2005 ; Obata et al., 2007). A côté de la contribution (partielle) des mastocytes à la pathologie, démontrée à l'aide de souris déficientes en mastocytes (Alenius et al., 2002), nous ne pouvons exclure un rôle potentiel des basophiles dans la contribution de Fc ϵ RI à notre modèle expérimental de dermatite atopique. En effet, ces cellules expriment fortement Fc ϵ RI et libèrent, très rapidement après activation, non seulement de l'histamine et des leucotriènes, mais aussi des cytokines Th2, en particulier de l'IL-4 (Min et al., 2004; Voehringer et al., 2004). De plus, il a été récemment démontré, grâce à un anticorps déplétant spécifique (BA-103), que les basophiles jouaient un rôle capital dans l'anaphylaxie dépendant des IgG chez les animaux déficients en mastocytes (Tsujimura et al., 2008). Les basophiles pourraient donc également contribuer aux effets dépendants de CD16 dans la dermatite atopique.

Nous allons donc tenter de mettre en évidence la présence de basophiles dans la peau des diverses souches d'animaux déficients en FcR et chez les animaux de type sauvage après induction d'une dermatite atopique. Une localisation par immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques de Fc ϵ RI et de DX5, et si nous l'obtenons, à l'aide de l'anticorps « anti-basophiles », sera tentée. Si les résultats montrent un recrutement de basophiles, nous confirmerons leur implication dans la pathologie par une expérience de déplétion.

Autres populations cellulaires : effets indirects.

Par la libération de diverses cytokines, chimiokines et médiateurs inflammatoires suite à l'activation de Fc ϵ RI, les mastocytes peuvent contribuer au recrutement indirect d'autres cellules inflammatoires qui n'expriment pas ce récepteur. Ce recrutement peut être partiellement inhibé chez les animaux déficients en Fc ϵ RI. L'histamine, se fixe sur le récepteur H2 exprimé par les cellules de Langerhans et favorise leur migration vers les ganglions drainants (Jawdat et al., 2004). Ainsi, l'IL-5, cytokine-clé de la différenciation, l'activation et la survie des éosinophiles, contribue aussi à l'épaississement épidermique (Spergel et al., 1999). MIP-1 β attire les lymphocytes T (Wang et al., 1998). La diminution du nombre de lymphocytes T dans la peau peut être également due, en partie, à la diminution de production du CCL-5 par les mastocytes (Homey et al., 2006).

Nos résultats concernant la contribution partielle de Fc ϵ RI à la dermatite atopique concordent avec les résultats obtenus par d'autres équipes dans un modèle d'asthme en l'absence d'adjuvant (Taube et al., 2004). Même si nos résultats montrent également une contribution importante de l'IgG₁ et de CD16 à la physiopathologie de la dermatite atopique, ils restent cependant difficilement conciliables avec ceux obtenus par le groupe de R. Geha (Spergel et al., 1999) qui montrent que les souris déficientes en IgE (sur fond génétique B6.129) présentent une dermatite atopique comparable à celle induite chez des animaux de type sauvage. Cette absence de contribution significative (ou la redondance) de l'IgE à la dermatite atopique décrite par ces auteurs nous semble surprenante à la fois dans le contexte connu de la physiopathologie humaine et compte tenu que la délétion de l'« autre » récepteur à l'IgE, CD23, conduit, elle aussi à une inhibition profonde de la pathologie.

CD16

Chez les souris déficientes en CD16, la pathologie cutanée et pulmonaire est également inhibée. Cette inhibition est associée à une augmentation de l'expression de Foxp3 et d'IL-10 qui est plus modérée que celle retrouvée chez les souris déficientes en Fc ϵ RI. Ceci peut être expliqué en partie par la diminution du taux d'IgG₁ anti-OVA chez ces souris, et donc d'une activation moins efficace de CD32b et en partie par le fait que la réponse Th1, en particulier l'expression d'IFN- γ , reste intacte. Par contre la réponse Th2

est inhibée, comme cela a récemment été démontré dans un modèle d'asthme (Bandukwala et al., 2007).

Contrairement aux souris déficientes en Fc ϵ RI, les souris déficientes en CD16 présentent une prolifération lymphocytaire ganglionnaire fortement diminuée en comparaison avec les animaux de type sauvage correspondants. Cette observation est concordante avec l'expression de CD16 mais pas de Fc ϵ RI sur les cellules présentatrices d'antigène murines.

Si nous pensons que les comparaisons qualitatives entre l'effet de la délétion de Fc ϵ RI et de CD16, que nous avons effectuées, sont valides, les comparaisons quantitatives entre ces deux souches d'animaux sont difficiles en raison du fond génétique différent des animaux utilisés : Balb/c pour les premiers, C57Bl/6 pour les seconds. En effet, si la sensibilisation épicutanée par l'ovalbumine induit une dermatite atopique dans les deux fonds génétiques, la pathologie, en particulier l'épaississement épidermique est plus prononcé sur le fond Balb/c, probablement en relation avec la contribution importante de la réponse Th2 à ce paramètre.

Fc ϵ RI et CD16 régulent la production de leurs ligands

Une autre originalité dans ce travail est la mise en évidence d'une régulation de la production d'IgE et d'IgG₁ par leurs FcR correspondant. En effet, ces deux isotypes sont associées à une réponse Th2 et il était attendu que leur production serait modulée de manière comparable suite à l'absence de l'un ou l'autre des FcR. La production d'IgE est induite par l'IL-4 et l'IL-13 (Barner et al., 1998 ; Geha et al., 2003). Par contre, la production d'IgG₁ ne semble pas strictement dépendante de l'IL-4. En effet, l'IgG₁ est retrouvée chez des souris déficientes en IL-4. L'IL-21 serait la cytokine essentielle pour la production de l'IgG₁ mais pas de l'IgE (Ozaki et al., 2002). Dans notre modèle, au moment du sacrifice, c'est-à-dire en phase chronique de la pathologie, l'expression ganglionnaire de l'IL-13 n'est pas augmentée par rapport à des animaux non sensibilisés, qu'ils soient de type sauvage ou déficients en FcR. Par contre, dans les souris déficientes en Fc ϵ RI, la diminution de la production d'IgE, est accompagnée d'une diminution de l'expression de l'IL-4 et les concentrations sériques en IgG₁, comparables à celles mesurées chez les animaux de type sauvage, sont à rapprocher d'une expression (induite) et comparable de l'IL-21 et de son récepteur. A l'opposé, dans les souris déficientes en CD16, la diminution de la production d'IgG₁, est associée à une diminution de l'expression de l'IL-21 et la concentration sérique en IgE, comparable à celle des souris de type sauvage, est associée à

une réponse IL-4 (induite) comparable à celle des souris de type sauvage. De plus, dans les souris déficientes en FcR γ , la diminution de la synthèse d'IgE et IgG₁ est corrélée avec une diminution et de l'IL-4 et de l'IL-21.

Régulation de la dermatite atopique par PPAR- α

Les souris déficientes en PPAR- α présentent une pathologie cutanée et pulmonaire et une réponse immune Th2 et Th1 exacerbées. Nous avons montré que cette inflammation plus prononcée était associée à une augmentation de l'expression cutanée de NF- κ B₁ et 2.

Curieusement, l'exacerbation de l'inflammation cutanée en absence de PPAR- α n'est pas due à un défaut d'expression de Foxp3 ou TGF- β une cytokine immunorégulatrice caractéristique.

L'exacerbation de la réponse humorale chez les souris déficientes en PPAR- α est particulièrement manifeste pour la production d'IgG_{2a}, associée à la réponse Th1. Cette régulation préférentielle s'opère *via* une régulation de l'expression de T-bet, le facteur principal de la différenciation Th1 (Jones et al., 2002). Mais elle n'est pas exclusive. En effet, PPAR- α régule également l'expression de GATA-3, facteur de transcription impliqué dans la différenciation Th2. (Woerly et al., 2003). Un effet régulateur sélectif de PPAR- α a récemment été mis en évidence dans un modèle encéphalomyélite autoimmune expérimentale Th1-dépendant, où les souris mâles déficientes en PPAR- α développent une pathologie plus prononcée, suite à une production accrue d'IFN- γ et de TNF- α (Dunn et al., 2007).

PPAR- α et barrière cutanée

Par le rôle régulateur du métabolisme lipidique, de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes (Wahli, 2002), PPAR, en particulier PPAR- β est susceptible de réguler la perméabilité cutanée. Ainsi, des animaux dont l'épiderme ou la couche suprabasale de kératinocytes sont déficients en PPAR- β , qui contrôle l'accumulation cutanée de cholestérol, présentent une perméabilité transcutanée augmentée avec un déficit de formation de granules lamellaires – organites instrumentaux pour la formation de la barrière cutanée –, ainsi qu'un défaut de répartition des cornéodesmosomes – qui assurent l'adhérence intercellulaire – et des lipides superficiels (lipides neutres). Cette altération de la barrière cutanée est réversible par application épicutanée de cholestérol (Calleja et al., 2006).

Une telle altération n'est pas présente chez les animaux déficients en PPAR- α . Dans notre modèle, aucune altération majeure de la composition lipidique de la peau (acides gras libres, cholestérol et céramides) n'a été mise en évidence chez les animaux de type sauvage ou chez les animaux déficients en PPAR- α , qu'ils aient ou non été sensibilisés par l'ovalbumine. Comme notre modèle n'est pas le plus adéquat pour l'étude de la contribution des altérations de la barrière cutanée à la dermatite atopique, nous ne pouvons toutefois exclure que les agonistes de PPAR- α exercent chez l'homme un effet bénéfique sur la barrière cutanée en plus de leur effet anti-inflammatoire.

Perspectives

CD16/IgG₁ : une nouvelle cible thérapeutique

L'utilisation d'anticorps anti-IgE, non anaphylactogéniques, comme l'omalizumab, dans le traitement de l'asthme s'est révélée globalement décevante, notamment en raison de son rapport coût/bénéfice. La thérapie par anti-IgE est actuellement réservée aux asthmes sévères (Avila, 2007 ; Barnes, 1999). Ces résultats sont peut-être à rapprocher de la présente étude sur le rôle de CD16 et d'IgG₁ dans la dermatite atopique et d'études antérieures mettant clairement en évidence la contribution de ce couple Ig-FcγR aux réactions d'anaphylaxie (Dombrowicz et al., 1997). En effet, malgré l'affinité beaucoup plus faible de l'IgG₁ pour son (ses) récepteur(s) que l'IgE pour FcεRI, cet isotype est produit en quantités beaucoup plus importantes. Nous pensons donc que la contribution des IgG aux pathologies allergiques est trop souvent négligée.

L'inhibition des interactions IgG₍₁₎-FcγR(III) activateur, en plus des interactions IgE-FcεRI/CD23 représenterait sans doute une voie possible d'amélioration des thérapies actuelles. Les coûts très élevés de développement d'anticorps humanisés et, en cas de succès, du traitement orienteraient plutôt nos recherches vers la synthèse et l'identification de molécules de faible poids moléculaire susceptibles d'inhiber ces interactions, par exemple *via* la conception d'une structure basée sur celle de la molécule de détergent co-cristallisée avec l'IgE et la forme soluble FcεRIα (Garman et al., 2000).

Les souris déficientes en PPAR- α : un modèle d'étude sensible de la dermatite atopique induite par un allergène

Le protocole de dermatite atopique utilisé (Spergel et al., 1998) résulte, chez les souris de type sauvage, d'une réponse cutanée mixte Th2 (aiguë) et Th1 (chronique). En raison de l'absence d'adjuvant et probablement du passage transcutané relativement limité d'une protéine, cette réponse reste modeste par rapport à d'autres modèles d'inflammation chronique comme l'asthme expérimental, plus fortement polarisé Th2. L'absence de PPAR- α conduit à une exacerbation généralisée de la pathologie et de la réponse immune associée, en particulier de la réponse Th1, souvent difficile à mettre en évidence au niveau humoral, même s'il faut noter que l'ajout d'une étape d'abrasion de la couche cornée (« tape-stripping ») peut, selon certains expérimentateurs, amplifier cette réponse Th1 (R. Geha, communication personnelle).

En raison de ces réponses exacerbées, les souris déficientes en PPAR- α constituent donc un modèle de choix pour mettre en évidence la contribution éventuellement mineure d'autres gènes.

PPAR- α , cible thérapeutique dans la dermatite atopique.

Si l'utilisation éventuelle d'agonistes de PPAR- γ dans le traitement du psoriasis résulte de la découverte fortuite que des patients diabétiques -et psoriasiques- traités par la rosiglitazone voyaient les symptômes de leur pathologie cutanée s'atténuer (Kuenzli and Saurat, 2003), nous n'avons jamais pu mettre en évidence, dans notre modèle expérimental, d'effet bénéfique d'un traitement topique par la rosiglitazone ou la troglitazone (C. Brenuchon, D. Dombrowicz, résultats non publiés).

A l'opposé, l'exacerbation de la pathologie chez les animaux déficients en PPAR- α , la diminution de l'expression cutanée de PPAR- α (mais pas de PPAR- β) chez les patients atopiques et l'efficacité du traitement topique par un agoniste de PPAR- α sur la pathologie cutanée et pulmonaire, sans affecter la réponse immune systémique, représentent des arguments solides pour la réalisation d'essais cliniques de traitement de la dermatite atopique par administration topique d'agonistes de PPAR- α .

BIBLIOGRAPHIE

- Aichberger, K. J., Mittermann, I., Reininger, R., Seiberler, S., Swoboda, I., Spitzauer, S., Kopp, T., Stingl, G., Sperr, W. R., Valent, P., *et al.* (2005). Hom s 4, an IgE-reactive autoantigen belonging to a new subfamily of calcium-binding proteins, can induce Th cell type 1-mediated autoreactivity. *J Immunol* *175*, 1286-1294.
- Aitman, T. J., Dong, R., Vyse, T. J., Norsworthy, P. J., Johnson, M. D., Smith, J., Mangion, J., Robertson-Lowe, C., Marshall, A. J., Petretto, E., *et al.* (2006). Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature* *439*, 851-855.
- Alber, G., Kent, U. M., and Metzger, H. (1992). Functional comparison of Fc epsilon RI, Fc gamma RII, and Fc gamma RIII in mast cells. *J Immunol* *149*, 2428-2436.
- Alenius, H., Laouini, D., Woodward, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K., Castigli, E., Oettgen, H. C., and Geha, R. S. (2002). Mast cells regulate IFN-gamma expression in the skin and circulating IgE levels in allergen-induced skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* *109*, 106-113.
- Amzel, L. M., and Poljak, R. J. (1979). Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem* *48*, 961-997.
- Andoh, T., and Kuraishi, Y. (2004). Expression of Fc epsilon receptor I on primary sensory neurons in mice. *Neuroreport* *15*, 2029-2031.
- Angeli, V., Hammad, H., Staels, B., Capron, M., Lambrecht, B. N., and Trottein, F. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response. *J Immunol* *170*, 5295-5301.
- Arm, J. P., Nwankwo, C., and Austen, K. F. (1997). Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor. *J Immunol* *159*, 2342-2349.
- Arnold, J. N., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and Sim, R. B. (2006). Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunol Lett* *106*, 103-110.
- Aubry, J. P., Pochon, S., Gauchat, J. F., Nueda-Marin, A., Holers, V. M., Graber, P., Siegfried, C., and Bonnefoy, J. Y. (1994). CD23 interacts with a new functional extracytoplasmic domain involving N-linked oligosaccharides on CD21. *J Immunol* *152*, 5806-5813.
- Aubry, J. P., Pochon, S., Graber, P., Jansen, K. U., and Bonnefoy, J. Y. (1992). CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* *358*, 505-507.
- Authier, H., Cassaing, S., Coste, A., Balard, P., Gales, A., Berry, A., Bans, V., Bessieres, M. H., and Pipy, B. (2008). Interleukin-13 primes iNO synthase expression induced by LPS in mouse peritoneal macrophages. *Mol Immunol* *45*, 235-243.
- Avila, P. C. (2007). Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies. *Annu Rev Med* *58*, 185-203.
- Bandukwala, H. S., Clay, B. S., Tong, J., Mody, P. D., Cannon, J. L., Shilling, R. A., Verbeek, J. S., Weinstock, J. V., Solway, J., and Sperling, A. I. (2007). Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J Exp Med* *204*, 1875-1889.
- Banerjee, P., Xu, X. J., Poulter, L. W., and Rustin, M. H. (1998). Changes in CD23 expression of blood and skin in atopic eczema after Chinese herbal therapy. *Clin Exp Allergy* *28*, 306-314.

- Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F., and Kopf, M. (1998). Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr Biol* 8, 669-672.
- Barnes, P. J. (1999). Anti-IgE antibody therapy for asthma. *N Engl J Med* 341, 2006-2008.
- Berin, M. C., Li, H., and Sperber, K. (2006). Antibody-mediated antigen sampling across intestinal epithelial barriers. *Ann N Y Acad Sci* 1072, 253-261.
- Berry, A., Balard, P., Coste, A., Olagnier, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J. C., Seguela, J. P., Magnaval, J. F., et al. (2007). IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *Eur J Immunol* 37, 1642-1652.
- Beyer, K., Nickel, R., Freidhoff, L., Bjorksten, B., Huang, S. K., Barnes, K. C., MacDonald, S., Forster, J., Zepp, F., Wahn, V., et al. (2000). Association and linkage of atopic dermatitis with chromosome 13q12-14 and 5q31-33 markers. *J Invest Dermatol* 115, 906-908.
- Bieber, T. (2007). The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology* 212, 499-503.
- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *N Engl J Med* 358, 1483-1494.
- Biedermann, T., Kneilling, M., Mailhammer, R., Maier, K., Sander, C. A., Kollias, G., Kunkel, S. L., Hultner, L., and Rocken, M. (2000). Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions through tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. *J Exp Med* 192, 1441-1452.
- Binstadt, B. A., Patel, P. R., Alencar, H., Nigrovic, P. A., Lee, D. M., Mahmood, U., Weissleder, R., Mathis, D., and Benoist, C. (2006). Particularities of the vasculature can promote the organ specificity of autoimmune attack. *Nat Immunol* 7, 284-292.
- Bischoff, S. C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nat Rev Immunol* 7, 93-104.
- Blank, U., Ra, C., Miller, L., White, K., Metzger, H., and Kinet, J. P. (1989). Complete structure and expression in transfected cells of high affinity IgE receptor. *Nature* 337, 187-189.
- Blank, U., Ra, C. S., and Kinet, J. P. (1991). Characterization of truncated alpha chain products from human, rat, and mouse high affinity receptor for immunoglobulin E. *J Biol Chem* 266, 2639-2646.
- Borges, L., Hsu, M. L., Fanger, N., Kubin, M., and Cosman, D. (1997). A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules. *J Immunol* 159, 5192-5196.
- Boyer, J. F., Balard, P., Authier, H., Faucon, B., Bernad, J., Mazieres, B., Davignon, J. L., Cantagrel, A., Pipy, B., and Constantin, A. (2007). Tumor necrosis factor alpha and adalimumab differentially regulate CD36 expression in human monocytes. *Arthritis Res Ther* 9, R22.
- Brooks, D. G., Qiu, W. Q., Luster, A. D., and Ravetch, J. V. (1989). Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 170, 1369-1385.
- Bryce, P. J., Miller, M. L., Miyajima, I., Tsai, M., Galli, S. J., and Oettgen, H. C. (2004). Immune sensitization in the skin is enhanced by antigen-independent effects of IgE. *Immunity* 20, 381-392.
- Buckley, C. C., Ivison, C., Poulter, L. W., and Rustin, M. H. (1992). Fc epsilon R11/CD23 receptor distribution in patch test reactions to aeroallergens in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 99, 184-188.

- Bujanowski-Weber, J., Knoller, I., Pfeil, T., Luther, H., Altmeyer, P., and Konig, W. (1990). Correlation of sCD23 release and immunoglobulin (E, A, G, M) synthesis by peripheral blood lymphocytes of atopic patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 92, 113-118.
- Calleja, C., Messaddeq, N., Chapellier, B., Yang, H., Krezel, W., Li, M., Metzger, D., Mascrez, B., Ohta, K., Kagechika, H., *et al.* (2006). Genetic and pharmacological evidence that a retinoic acid cannot be the RXR-activating ligand in mouse epidermis keratinocytes. *Genes Dev* 20, 1525-1538.
- Cao, W., Rosen, D. B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. (2006). Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J Exp Med* 203, 1399-1405.
- Carlsson, F., Hjelm, F., Conrad, D. H., and Heyman, B. (2007). IgE enhances specific antibody and T-cell responses in mice overexpressing CD23. *Scand J Immunol* 66, 261-270.
- Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P., and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* 99, 754-758.
- Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1997). A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J Exp Med* 185, 1743-1751.
- Chan, L. S., Robinson, N., and Xu, L. (2001). Expression of interleukin-4 in the epidermis of transgenic mice results in a pruritic inflammatory skin disease: an experimental animal model to study atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 117, 977-983.
- Cherwinski, H. M., Murphy, C. A., Joyce, B. L., Bigler, M. E., Song, Y. S., Zurawski, S. M., Moshrefi, M. M., Gorman, D. M., Miller, K. L., Zhang, S., *et al.* (2005). The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and human mast cell function. *J Immunol* 174, 1348-1356.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M., and Lopez-Botet, M. (1997). A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J Exp Med* 186, 1809-1818.
- Conrad, D. H., Ford, J. W., Sturgill, J. L., and Gibb, D. R. (2007). CD23: an overlooked regulator of allergic disease. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 331-337.
- Cookson, W. O., Ubhi, B., Lawrence, R., Abecasis, G. R., Walley, A. J., Cox, H. E., Coleman, R., Leaves, N. I., Trembath, R. C., Moffatt, M. F., and Harper, J. I. (2001). Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci. *Nat Genet* 27, 372-373.
- Corr, M., and Crain, B. (2002). The role of FcgammaR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 169, 6604-6609.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., and Hsu, M. L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity* 7, 273-282.

- Cox, H. E., Moffatt, M. F., Faux, J. A., Walley, A. J., Coleman, R., Trembath, R. C., Cookson, W. O., and Harper, J. I. (1998). Association of atopic dermatitis to the beta subunit of the high affinity immunoglobulin E receptor. *Br J Dermatol* 138, 182-187.
- Cunard, R., Ricote, M., DiCampli, D., Archer, D. C., Kahn, D. A., Glass, C. K., and Kelly, C. J. (2002). Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol* 168, 2795-2802.
- Daeron, M. (1997). Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol* 15, 203-234.
- Davis, R. S., Ehrhardt, G. R., Leu, C. M., Hirano, M., and Cooper, M. D. (2005). An extended family of Fc receptor relatives. *Eur J Immunol* 35, 674-680.
- Davis, R. S., Wang, Y. H., Kubagawa, H., and Cooper, M. D. (2001). Identification of a family of Fc receptor homologs with preferential B cell expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9772-9777.
- Delerive, P., De Bosscher, K., Besnard, S., Vanden Berghe, W., Peters, J. M., Gonzalez, F. J., Fruchart, J. C., Tedgui, A., Haegeman, G., and Staels, B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 274, 32048-32054.
- Desai, D. D., Harbers, S. O., Flores, M., Colonna, L., Downie, M. P., Bergtold, A., Jung, S., and Clynes, R. (2007). Fc gamma receptor IIIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses. *J Immunol* 178, 6217-6226.
- Desreumaux, P., Dubuquoy, L., Nutten, S., Peuchmaur, M., Englano, W., Schoonjans, K., Derijard, B., Desvergne, B., Wahli, W., Chambon, P., et al. (2001). Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193, 827-838.
- Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J., and Wahli, W. (1996). The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 384, 39-43.
- Di-Poi, N., Tan, N. S., Michalik, L., Wahli, W., and Desvergne, B. (2002). Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway. *Mol Cell* 10, 721-733.
- Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., et al. (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5, 752-760.
- Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K. K., Koller, B. H., and Kinet, J. P. (1993). Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75, 969-976.
- Dombrowicz, D., Flamand, V., Miyajima, I., Ravetch, J. V., Galli, S. J., and Kinet, J. P. (1997). Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 99, 915-925.
- Dombrowicz, D., Lin, S., Flamand, V., Brini, A. T., Koller, B. H., and Kinet, J. P. (1998). Allergy-associated FcRbeta is a molecular amplifier of IgE- and IgG-mediated in vivo responses. *Immunity* 8, 517-529.

- Donnadieu, E., Jouvin, M. H., and Kinet, J. P. (2000). A second amplifier function for the allergy-associated Fc(epsilon)RI-beta subunit. *Immunity* 12, 515-523.
- Donnadieu, E., Jouvin, M. H., Rana, S., Moffatt, M. F., Mockford, E. H., Cookson, W. O., and Kinet, J. P. (2003). Competing functions encoded in the allergy-associated F(c)epsilonRIbeta gene. *Immunity* 18, 665-674.
- Dubuquoy, L., Jansson, E. A., Deeb, S., Rakotobe, S., Karoui, M., Colombel, J. F., Auwerx, J., Pettersson, S., and Desreumaux, P. (2003). Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124, 1265-1276.
- Dunn, S. E., Ousman, S. S., Sobel, R. A., Zuniga, L., Baranzini, S. E., Youssef, S., Crowell, A., Loh, J., Oksenbergs, J., and Steinman, L. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 204, 321-330.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A. P., Urban, J. F., Jr., Curotto de Lafaille, M. A., and Lafaille, J. J. (2007). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 26, 191-203.
- Ernst, L. K., Duchemin, A. M., and Anderson, C. L. (1993). Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6023-6027.
- Fearon, D. T., and Carroll, M. C. (2000). Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* 18, 393-422.
- Fiebiger, E., Tortorella, D., Jouvin, M. H., Kinet, J. P., and Ploegh, H. L. (2005). Cotranslational endoplasmic reticulum assembly of Fc epsilon RI controls the formation of functional IgE-binding receptors. *J Exp Med* 201, 267-277.
- Finkelman, F. D. (2007). Anaphylaxis: lessons from mouse models. *J Allergy Clin Immunol* 120, 506-515; quiz 516-507.
- Fleming, T. J., Donnadieu, E., Song, C. H., Laethem, F. V., Galli, S. J., and Kinet, J. P. (1997). Negative regulation of Fc epsilon RI-mediated degranulation by CD81. *J Exp Med* 186, 1307-1314.
- Floyd, H., Ni, J., Cornish, A. L., Zeng, Z., Liu, D., Carter, K. C., Steel, J., and Crocker, P. R. (2000). Siglec-8. A novel eosinophil-specific member of the immunoglobulin superfamily. *J Biol Chem* 275, 861-866.
- Fluckiger, A. C., Li, Z., Kato, R. M., Wahl, M. I., Ochs, H. D., Longnecker, R., Kinet, J. P., Witte, O. N., Scharenberg, A. M., and Rawlings, D. J. (1998). Btk/Tec kinases regulate sustained increases in intracellular Ca²⁺ following B-cell receptor activation. *Embo J* 17, 1973-1985.
- Fossati-Jimack, L., Ioan-Facsinay, A., Reininger, L., Chicheportiche, Y., Watanabe, N., Saito, T., Hofhuis, F. M., Gessner, J. E., Schiller, C., Schmidt, R. E., et al. (2000). Markedly different pathogenicity of four immunoglobulin G isotype-switch variants of an antierythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fcgamma receptor III. *J Exp Med* 191, 1293-1302.
- Furuichi, K., Rivera, J., and Isersky, C. (1985). The receptor for immunoglobulin E on rat basophilic leukemia cells: effect of ligand binding on receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1522-1525.

Furumoto, Y., Nunomura, S., Terada, T., Rivera, J., and Ra, C. (2004). The FcepsilonRIbeta immunoreceptor tyrosine-based activation motif exerts inhibitory control on MAPK and IkappaB kinase phosphorylation and mast cell cytokine production. *J Biol Chem* 279, 49177-49187.

Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimaldeston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M., and Tsai, M. (2005). Mast cells as "tunable" effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu Rev Immunol* 23, 749-786.

Ganguly, S., Grodzki, C., Sugden, D., Moller, M., Odom, S., Gaildrat, P., Gery, I., Siraganian, R. P., Rivera, J., and Klein, D. C. (2007). Neural adrenergic/cyclic AMP regulation of the immunoglobulin E receptor alpha-subunit expression in the mammalian pinealocyte: a neuroendocrine/immune response link? *J Biol Chem* 282, 32758-32764.

Garman, S. C., Kinet, J. P., and Jardetzky, T. S. (1998). Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell* 95, 951-961.

Garman, S. C., Wurzburg, B. A., Tarchevskaya, S. S., Kinet, J. P., and Jardetzky, T. S. (2000). Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha. *Nature* 406, 259-266.

Geha, R. S., Jabara, H. H., and Brodeur, S. R. (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3, 721-732.

Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol* 166, 346-352.

Ghannadan, M., Hauswirth, A. W., Schernthaner, G. H., Muller, M. R., Klepetko, W., Schatzl, G., Sperr, W. R., Buhring, H. J., and Valent, P. (2002). Detection of novel CD antigens on the surface of human mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol* 127, 299-307.

Ghetie, V., and Ward, E. S. (2000). Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* 18, 739-766.

Glass, C. K., and Ogawa, S. (2006). Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 44-55.

Gosset, P., Charbonnier, A. S., Delerive, P., Fontaine, J., Staels, B., Pestel, J., Tonnel, A. B., and Trottein, F. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 31, 2857-2865.

Gould, H. J., Mackay, G. A., Karagiannis, S. N., O'Toole, C. M., Marsh, P. J., Daniel, B. E., Coney, L. R., Zurawski, V. R., Jr., Joseph, M., Capron, M., *et al.* (1999). Comparison of IgE and IgG antibody-dependent cytotoxicity in vitro and in a SCID mouse xenograft model of ovarian carcinoma. *Eur J Immunol* 29, 3527-3537.

Gould, H. J., and Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8, 205-217.

Gounni, A. S., Lamkhioued, B., Delaporte, E., Dubost, A., Kinet, J. P., Capron, A., and Capron, M. (1994a). The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? *J Allergy Clin Immunol* 94, 1214-1216.

Gounni, A. S., Lamkhioued, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P. M., and Hamid, Q. (2001). Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma. *Faseb J* 15, 940-949.

Gounni, A. S., Lamkhioued, B., Ochiai, K., Tanaka, Y., Delaporte, E., Capron, A., Kinet, J. P., and Capron, M. (1994b). High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367, 183-186.

Grattan, C. E., Francis, D. M., Hide, M., and Greaves, M. W. (1991). Detection of circulating histamine releasing autoantibodies with functional properties of anti-IgE in chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 21, 695-704.

Grimbaldeston, M. A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M., and Galli, S. J. (2007). Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 8, 1095-1104.

Gruber, B. L., Baeza, M. L., Marchese, M. J., Agnello, V., and Kaplan, A. P. (1988). Prevalence and functional role of anti-IgE autoantibodies in urticarial syndromes. *J Invest Dermatol* 90, 213-217.

Gupta, J., Grube, E., Erickson, M. B., Stevenson, M. D., Lucky, A. W., Sheth, A. P., Assa'ad, A. H., and Khurana Hershey, G. K. (2008). Intrinsically defective skin barrier function in children with atopic dermatitis correlates with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 121, 725-730 e722.

Hagan, P., Blumenthal, U. J., Dunn, D., Simpson, A. J., and Wilkins, H. A. (1991). Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349, 243-245.

Hakimi, J., Seals, C., Kondas, J. A., Pettine, L., Danho, W., and Kochan, J. (1990). The alpha subunit of the human IgE receptor (FcERI) is sufficient for high affinity IgE binding. *J Biol Chem* 265, 22079-22081.

Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., and Tedder, T. F. (2006). Antibody isotype-specific engagement of Fc gamma receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med* 203, 743-753.

Hansson, L., Backman, A., Ny, A., Edlund, M., Ekholm, E., Ekstrand Hammarstrom, B., Tornell, J., Wallbrandt, P., Wennbo, H., and Egelrud, T. (2002). Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol* 118, 444-449.

Hasegawa, M., Nishiyama, C., Nishiyama, M., Akizawa, Y., Mitsuishi, K., Ito, T., Kawada, H., Furukawa, S., Ra, C., Okumura, K., and Ogawa, H. (2003). A novel -66T/C polymorphism in Fc epsilon RI alpha-chain promoter affecting the transcription activity: possible relationship to allergic diseases. *J Immunol* 171, 1927-1933.

Hazenbos, W. L., Gessner, J. E., Hofhuis, F. M., Kuipers, H., Meyer, D., Heijnen, I. A., Schmidt, R. E., Sandor, M., Capel, P. J., Daeron, M., et al. (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 5, 181-188.

Hellwig, S. M., van Spriel, A. B., Schellekens, J. F., Mooi, F. R., and van de Winkel, J. G. (2001). Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 69, 4846-4850.

Henry, A. J., Cook, J. P., McDonnell, J. M., Mackay, G. A., Shi, J., Sutton, B. J., and Gould, H. J. (1997). Participation of the N-terminal region of Cepsilon3 in the binding of human IgE to its high-affinity receptor FcepsilonRI. *Biochemistry* 36, 15568-15578.

- Herrada, A. A., Contreras, F. J., Tobar, J. A., Pacheco, R., and Kalergis, A. M. (2007). Immune complex-induced enhancement of bacterial antigen presentation requires Fc gamma receptor III expression on dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13402-13407.
- Heyman, B., Tianmin, L., and Gustavsson, S. (1993). In vivo enhancement of the specific antibody response via the low-affinity receptor for IgE. *Eur J Immunol* **23**, 1739-1742.
- Hibbert, R. G., Teriete, P., Grundy, G. J., Beavil, R. L., Reljic, R., Holers, V. M., Hannan, J. P., Sutton, B. J., Gould, H. J., and McDonnell, J. M. (2005). The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J Exp Med* **202**, 751-760.
- Hibbs, M. L., Walker, I. D., Kirsbaum, L., Pietersz, G. A., Deacon, N. J., Chambers, G. W., McKenzie, I. F., and Hogarth, P. M. (1986). The murine Fc receptor for immunoglobulin: purification, partial amino acid sequence, and isolation of cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6980-6984.
- Hirano, M., Davis, R. S., Fine, W. D., Nakamura, S., Shimizu, K., Yagi, H., Kato, K., Stephan, R. P., and Cooper, M. D. (2007). IgE_b immune complexes activate macrophages through Fc gamma RIV binding. *Nat Immunol* **8**, 762-771.
- Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T., and Leung, D. Y. (2006). Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* **118**, 178-189.
- Honda, K., Marquillies, P., Capron, M., and Dombrowicz, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is expressed in airways and inhibits features of airway remodeling in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 882-888.
- Hontecillas, R., and Bassaganya-Riera, J. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol* **178**, 2940-2949.
- Isnardi, I., Lesourne, R., Bruhns, P., Friedman, W. H., Cambier, J. C., and Daeron, M. (2004). Two distinct tyrosine-based motifs enable the inhibitory receptor Fc gamma RIIB to cooperatively recruit the inositol phosphatases SHIP1/2 and the adapters Grb2/Grap. *J Biol Chem* **279**, 51931-51938.
- James, L. C., Roversi, P., and Tawfik, D. S. (2003). Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* **299**, 1362-1367.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Dombrowicz, D., Barbieri, S., Caspar, P., Wynn, T. A., Paul, W. E., Cheever, A. W., Kinet, J. P., and Sher, A. (1997). Fc epsilonRI-deficient mice infected with Schistosoma mansoni mount normal Th2-type responses while displaying enhanced liver pathology. *J Immunol* **159**, 1868-1875.
- Jawdat, D. M., Albert, E. J., Rowden, G., Haidl, I. D., and Marshall, J. S. (2004). IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J Immunol* **173**, 5275-5282.
- Ji, H., Ohmura, K., Mahmood, U., Lee, D. M., Hofhuis, F. M., Boackle, S. A., Takahashi, K., Holers, V. M., Walport, M., Gerard, C., et al. (2002). Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* **16**, 157-168.
- Jones, D. C., Manning, B. M., and Daynes, R. A. (2002). A role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in T-cell physiology and ageing immunobiology. *Proc Nutr Soc* **61**, 363-369.
- Joseph, M., Gounni, A. S., Kusnierz, J. P., Vorng, H., Sarfati, M., Kinet, J. P., Tonnel, A. B., Capron, A., and Capron, M. (1997). Expression and functions of the high-affinity IgE receptor on human platelets and megakaryocyte precursors. *Eur J Immunol* **27**, 2212-2218.

- Kaiserlian, D., Lachaux, A., Grosjean, I., Graber, P., and Bonnefoy, J. Y. (1993). Intestinal epithelial cells express the CD23/Fc epsilon RII molecule: enhanced expression in enteropathies. *Immunology* 80, 90-95.
- Kalesnikoff, J., Huber, M., Lam, V., Damen, J. E., Zhang, J., Siraganian, R. P., and Krystal, G. (2001). Monomeric IgE stimulates signaling pathways in mast cells that lead to cytokine production and cell survival. *Immunity* 14, 801-811.
- Kaminski, D. A., and Stavnezer, J. (2007). Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol* 19, 545-556.
- Karagiannis, S. N., Bracher, M. G., Hunt, J., McCloskey, N., Beavil, R. L., Beavil, A. J., Fear, D. J., Thompson, R. G., East, N., Burke, F., et al. (2007). IgE-antibody-dependent immunotherapy of solid tumors: cytotoxic and phagocytic mechanisms of eradication of ovarian cancer cells. *J Immunol* 179, 2832-2843.
- Karagiannis, S. N., Warrack, J. K., Jennings, K. H., Murdock, P. R., Christie, G., Moulder, K., Sutton, B. J., and Gould, H. J. (2001). Endocytosis and recycling of the complex between CD23 and HLA-DR in human B cells. *Immunology* 103, 319-331.
- Kato, A., Fukai, K., Oiso, N., Hosomi, N., Murakami, T., and Ishii, M. (2003). Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *Br J Dermatol* 148, 665-669.
- Katoh, N., Kraft, S., Wessendorf, J. H., and Bieber, T. (2000). The high-affinity IgE receptor (FcepsilonRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest* 105, 183-190.
- Katz, H. R. (2002). Inhibitory receptors and allergy. *Curr Opin Immunol* 14, 698-704.
- Katz, H. R., Benson, A. C., and Austen, K. F. (1989). Activation- and phorbol ester-stimulated phosphorylation of a plasma membrane glycoprotein antigen expressed on mouse IL-3-dependent mast cells and serosal mast cells. *J Immunol* 142, 919-926.
- Kawase, Y., Hoshino, T., Yokota, K., Kuzuhara, A., Kirii, Y., Nishiwaki, E., Maeda, Y., Takeda, J., Okamoto, M., Kato, S., et al. (2003). Exacerbated and prolonged allergic and non-allergic inflammatory cutaneous reaction in mice with targeted interleukin-18 expression in the skin. *J Invest Dermatol* 121, 502-509.
- Kawashima, T., Noguchi, E., Arinami, T., Yamakawa-Kobayashi, K., Nakagawa, H., Otsuka, F., and Hamaguchi, H. (1998). Linkage and association of an interleukin 4 gene polymorphism with atopic dermatitis in Japanese families. *J Med Genet* 35, 502-504.
- Kepley, C. L., Taghavi, S., Mackay, G., Zhu, D., Morel, P. A., Zhang, K., Ryan, J. J., Satin, L. S., Zhang, M., Pandolfi, P. P., and Saxon, A. (2004). Co-aggregation of FcgammaRII with FcepsilonRI on human mast cells inhibits antigen-induced secretion and involves SHIP-Grb2-Dok complexes. *J Biol Chem* 279, 35139-35149.
- Kijimoto-Ochiai, S., and Noguchi, A. (2000). Two peptides from CD23, including the inverse RGD sequence and its related peptide, interact with the MHC class II molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 686-691.
- Kim, D. J., Murray, I. A., Burns, A. M., Gonzalez, F. J., Perdew, G. H., and Peters, J. M. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta inhibits epidermal cell proliferation by down-regulation of kinase activity. *J Biol Chem* 280, 9519-9527.

- Kim, H. Y., Kim, S., and Chung, D. H. (2006). Fc γ RIII engagement provides activating signals to NKT cells in antibody-induced joint inflammation. *J Clin Invest* *116*, 2484-2492.
- Kinet, J. P. (1999). The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* *17*, 931-972.
- Kisselgof, A. B., and Oettgen, H. C. (1998). The expression of murine B cell CD23, in vivo, is regulated by its ligand, IgE. *Int Immunol* *10*, 1377-1384.
- Kitamura, K., Takeda, K., Koya, T., Miyahara, N., Kodama, T., Dakhama, A., Takai, T., Hirano, A., Tanimoto, M., Harada, M., and Gelfand, E. W. (2007). Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* *178*, 480-488.
- Kitani, S., Berenstein, E., Mergenhagen, S., Tempst, P., and Siraganian, R. P. (1991). A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *J Biol Chem* *266*, 1903-1909.
- Kitaura, J., Kinoshita, T., Matsumoto, M., Chung, S., Kawakami, Y., Leitges, M., Wu, D., Lowell, C. A., and Kawakami, T. (2005). IgE- and IgE+Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. *Blood* *105*, 3222-3229.
- Kleinau, S., Martinsson, P., Gustavsson, S., and Heyman, B. (1999). Importance of CD23 for collagen-induced arthritis: delayed onset and reduced severity in CD23-deficient mice. *J Immunol* *162*, 4266-4270.
- KleinJan, A., Dijkstra, M. D., Boks, S. S., Severijnen, L. A., Mulder, P. G., and Fokkens, W. J. (1999). Increase in IL-8, IL-10, IL-13, and RANTES mRNA levels (in situ hybridization) in the nasal mucosa after nasal allergen provocation. *J Allergy Clin Immunol* *103*, 441-450.
- Kobayashi, T., Miura, T., Haba, T., Sato, M., Serizawa, I., Nagai, H., and Ishizaka, K. (2000). An essential role of mast cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model. *J Immunol* *164*, 3855-3861.
- Kohl, J., and Gessner, J. E. (1999). On the role of complement and Fc gamma-receptors in the Arthus reaction. *Mol Immunol* *36*, 893-903.
- Kohno, M., Yamasaki, S., Tybulewicz, V. L., and Saito, T. (2005). Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen. *Blood* *105*, 2059-2065.
- Kota, B. P., Huang, T. H., and Roufogalis, B. D. (2005). An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* *51*, 85-94.
- Kraft, S., and Kinet, J. P. (2007). New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* *7*, 365-378.
- Kraft, S., Wessendorf, J. H., Hanau, D., and Bieber, T. (1998). Regulation of the high affinity receptor for IgE on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* *161*, 1000-1006.
- Kubagawa, H., Burrows, P. D., and Cooper, M. D. (1997). A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5261-5266.

- Kubo, S., Matsuoka, K., Taya, C., Kitamura, F., Takai, T., Yonekawa, H., and Karasuyama, H. (2001). Drastic up-regulation of Fc ϵ RI on mast cells is induced by IgE binding through stabilization and accumulation of Fc ϵ RI on the cell surface. *J Immunol* 167, 3427-3434.
- Kubo, S., Nakayama, T., Matsuoka, K., Yonekawa, H., and Karasuyama, H. (2003). Long term maintenance of IgE-mediated memory in mast cells in the absence of detectable serum IgE. *J Immunol* 170, 775-780.
- Kuenzli, S., and Saurat, J. H. (2003). Effect of topical PPAR β/δ and PPAR γ agonists on plaque psoriasis. A pilot study. *Dermatology* 206, 252-256.
- Kurosaki, T., Gander, I., Wirthmueller, U., and Ravetch, J. V. (1992). The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J Exp Med* 175, 447-451.
- Kuster, H., Zhang, L., Brini, A. T., MacGlashan, D. W., and Kinet, J. P. (1992). The gene and cDNA for the human high affinity immunoglobulin E receptor beta chain and expression of the complete human receptor. *J Biol Chem* 267, 12782-12787.
- Lanier, L. L., Cwirla, S., Yu, G., Testi, R., and Phillips, J. H. (1989a). Membrane anchoring of a human IgG Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid. *Science* 246, 1611-1613.
- Lanier, L. L., Yu, G., and Phillips, J. H. (1989b). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* 342, 803-805.
- Lantz, C. S., Yamaguchi, M., Oettgen, H. C., Katona, I. M., Miyajima, I., Kinet, J. P., and Galli, S. J. (1997). IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo. *J Immunol* 158, 2517-2521.
- Lemieux, G. A., Blumenkron, F., Yeung, N., Zhou, P., Williams, J., Grammer, A. C., Petrovich, R., Lipsky, P. E., Moss, M. L., and Werb, Z. (2007). The low affinity IgE receptor (CD23) is cleaved by the metalloproteinase ADAM10. *J Biol Chem* 282, 14836-14844.
- Letourneur, O., Sechi, S., Willette-Brown, J., Robertson, M. W., and Kinet, J. P. (1995). Glycosylation of human truncated Fc epsilon RI alpha chain is necessary for efficient folding in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270, 8249-8256.
- Leung, D. Y., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I., and Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113, 651-657.
- Leung, D. Y., Harbeck, R., Bina, P., Reiser, R. F., Yang, E., Norris, D. A., Hanifin, J. M., and Sampson, H. A. (1993). Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 92, 1374-1380.
- Lewis, G., Rapsomaniki, E., Bouriez, T., Crockford, T., Ferry, H., Rigby, R., Vyse, T., Lambe, T., and Cornall, R. (2004). Hyper IgE in New Zealand black mice due to a dominant-negative CD23 mutation. *Immunogenetics* 56, 564-571.
- Li, M., Messaddeq, N., Teletin, M., Pasquali, J. L., Metzger, D., and Chambon, P. (2005). Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14795-14800.
- Lin, S., Cicala, C., Scharenberg, A. M., and Kinet, J. P. (1996). The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. *Cell* 85, 985-995.

- Liu, X., Nickel, R., Beyer, K., Wahn, U., Ehrlich, E., Freidhoff, L. R., Bjorksten, B., Beaty, T. H., and Huang, S. K. (2000). An IL13 coding region variant is associated with a high total serum IgE level and atopic dermatitis in the German multicenter atopy study (MAS-90). *J Allergy Clin Immunol* *106*, 167-170.
- Lu, L. F., Lind, E. F., Gondek, D. C., Bennett, K. A., Gleeson, M. W., Pino-Lagos, K., Scott, Z. A., Coyle, A. J., Reed, J. L., Van Snick, J., *et al.* (2006). Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* *442*, 997-1002.
- Maasho, K., Sanchez, F., Schurr, E., Hailu, A., and Akuffo, H. (1998). Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* *66*, 2698-2704.
- MacGlashan, D., Jr., McKenzie-White, J., Chichester, K., Bochner, B. S., Davis, F. M., Schroeder, J. T., and Lichtenstein, L. M. (1998). In vitro regulation of Fc epsilon RIalpha expression on human basophils by IgE antibody. *Blood* *91*, 1633-1643.
- Malbec, O., Attal, J. P., Fridman, W. H., and Daeron, M. (2002). Negative regulation of mast cell proliferation by Fc gamma RIIB. *Mol Immunol* *38*, 1295-1299.
- Malbec, O., and Daeron, M. (2007). The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev* *217*, 206-221.
- Malbec, O., Fong, D. C., Turner, M., Tybulewicz, V. L., Cambier, J. C., Fridman, W. H., and Daeron, M. (1998). Fc epsilon receptor I-associated lyn-dependent phosphorylation of Fc gamma receptor IIB during negative regulation of mast cell activation. *J Immunol* *160*, 1647-1658.
- Mangialaio, S., Ji, H., Korganow, A. S., Kouskoff, V., Benoist, C., and Mathis, D. (1999). The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis. *Arthritis Rheum* *42*, 2517-2523.
- Mao, X. Q., Shirakawa, T., Yoshikawa, T., Yoshikawa, K., Kawai, M., Sasaki, S., Enomoto, T., Hashimoto, T., Furuyama, J., Hopkin, J. M., and Morimoto, K. (1996). Association between genetic variants of mast-cell chymase and eczema. *Lancet* *348*, 581-583.
- Matsuda, H., Watanabe, N., Geba, G. P., Sperl, J., Tsudzuki, M., Hiroi, J., Matsumoto, M., Ushio, H., Saito, S., Askenase, P. W., and Ra, C. (1997). Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol* *9*, 461-466.
- Maurer, D., Fiebiger, E., Reininger, B., Wolff-Winiski, B., Jouvin, M. H., Kilgus, O., Kinet, J. P., and Stingl, G. (1994). Expression of functional high affinity immunoglobulin E receptors (Fc epsilon RI) on monocytes of atopic individuals. *J Exp Med* *179*, 745-750.
- Maurer, D., Fiebiger, S., Ebner, C., Reininger, B., Fischer, G. F., Wichlas, S., Jouvin, M. H., Schmitt-Egenolf, M., Kraft, D., Kinet, J. P., and Stingl, G. (1996). Peripheral blood dendritic cells express Fc epsilon RI as a complex composed of Fc epsilon RI alpha- and Fc epsilon RI gamma-chains and can use this receptor for IgE-mediated allergen presentation. *J Immunol* *157*, 607-616.
- Mayr, S. I., Zuberi, R. I., Zhang, M., de Sousa-Hitzler, J., Ngo, K., Kuwabara, Y., Yu, L., Fung-Leung, W. P., and Liu, F. T. (2002). IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* *169*, 2061-2068.

- McCloskey, N., Hunt, J., Beavil, R. L., Jutton, M. R., Grundy, G. J., Girardi, E., Fabiane, S. M., Fear, D. J., Conrad, D. H., Sutton, B. J., and Gould, H. J. (2007). Soluble CD23 monomers inhibit and oligomers stimulate IGE synthesis in human B cells. *J Biol Chem* 282, 24083-24091.
- McDonald, K. J., Cameron, A. J., Allen, J. M., and Jardine, A. G. (2002). Expression of Fc alpha/mu receptor by human mesangial cells: a candidate receptor for immune complex deposition in IgA nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 438-442.
- Mendoza, G., and Metzger, H. (1976). Distribution and valency of receptor for IgE on rodent mast cells and related tumour cells. *Nature* 264, 548-550.
- Meng, J. F., McFall, C., and Rosenwasser, L. J. (2007). Polymorphism R62W results in resistance of CD23 to enzymatic cleavage in cultured cells. *Genes Immun* 8, 215-223.
- Merck, E., Gaillard, C., Gorman, D. M., Montero-Julian, F., Durand, I., Zurawski, S. M., Menetrier-Caux, C., Carra, G., Lebecque, S., Trinchieri, G., and Bates, E. E. (2004). OSCAR is an FcRgamma-associated receptor that is expressed by myeloid cells and is involved in antigen presentation and activation of human dendritic cells. *Blood* 104, 1386-1395.
- Meyaard, L., Adema, G. J., Chang, C., Woollatt, E., Sutherland, G. R., Lanier, L. L., and Phillips, J. H. (1997). LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity* 7, 283-290.
- Meyer, D., Schiller, C., Westermann, J., Izui, S., Hazenbos, W. L., Verbeek, J. S., Schmidt, R. E., and Gessner, J. E. (1998). FcgammaRIII (CD16)-deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia. *Blood* 92, 3997-4002.
- Michalik, L., Desvergne, B., Tan, N. S., Basu-Modak, S., Escher, P., Rieusset, J., Peters, J. M., Kaya, G., Gonzalez, F. J., Zakany, J., et al. (2001). Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* 154, 799-814.
- Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E. S., Urban, J. F., Jr., Dvorak, A. M., Finkelman, F. D., LeGros, G., and Paul, W. E. (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* 200, 507-517.
- Miyajima, I., Dombrowicz, D., Martin, T. R., Ravetch, J. V., Kinet, J. P., and Galli, S. J. (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 99, 901-914.
- Moffatt, M. F., Sharp, P. A., Faux, J. A., Young, R. P., Cookson, W. O., and Hopkin, J. M. (1992). Factors confounding genetic linkage between atopy and chromosome 11q. *Clin Exp Allergy* 22, 1046-1051.
- Montagnac, G., Molla-Herman, A., Bouchet, J., Yu, L. C., Conrad, D. H., Perdue, M. H., and Benmerah, A. (2005). Intracellular trafficking of CD23: differential regulation in humans and mice by both extracellular and intracellular exons. *J Immunol* 174, 5562-5572.
- Monteiro, R. C., and Van De Winkel, J. G. (2003). IgA Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 21, 177-204.
- Morar, N., Willis-Owen, S. A., Moffatt, M. F., and Cookson, W. O. (2006). The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118, 24-34; quiz 35-26.

- Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeiki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., *et al.* (2005). Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* *23*, 191-202.
- Muller, K. M., Rocken, M., Joel, D., Bonnefoy, J. Y., Saurat, J. H., and Hauser, C. (1991). Mononuclear cell-bound CD23 is elevated in both atopic dermatitis and psoriasis. *J Dermatol Sci* *2*, 125-133.
- Nakajima, H., Samardis, J., Angman, L., and Colonna, M. (1999). Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J Immunol* *162*, 5-8.
- Nickel, R. G., Casolaro, V., Wahn, U., Beyer, K., Barnes, K. C., Plunkett, B. S., Freidhoff, L. R., Sengler, C., Plitt, J. R., Schleimer, R. P., *et al.* (2000). Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. *J Immunol* *164*, 1612-1616.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* *310*, 1510-1512.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2008). Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* *8*, 34-47.
- Nishikata, H., Oliver, C., Mergenhagen, S. E., and Siraganian, R. P. (1992). The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. *J Immunol* *149*, 862-870.
- Nissim, A., Jouvin, M. H., and Eshhar, Z. (1991). Mapping of the high affinity Fc epsilon receptor binding site to the third constant region domain of IgE. *Embo J* *10*, 101-107.
- Novak, N., Tepel, C., Koch, S., Brix, K., Bieber, T., and Kraft, S. (2003). Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest* *111*, 1047-1056.
- Novak, N., Valenta, R., Bohle, B., Laffer, S., Haberstok, J., Kraft, S., and Bieber, T. (2004). FcepsilonRI engagement of Langerhans cell-like dendritic cells and inflammatory dendritic epidermal cell-like dendritic cells induces chemotactic signals and different T-cell phenotypes in vitro. *J Allergy Clin Immunol* *113*, 949-957.
- Nutten, S., Papin, J. P., Woerly, G., Dunne, D. W., MacGregor, J., Trottein, F., and Capron, M. (1999). Selectin and Lewis(x) are required as co-receptors in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human eosinophils to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Eur J Immunol* *29*, 799-808.
- Obata, K., Mukai, K., Tsujimura, Y., Ishiwata, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Watanabe, N., and Karasuyama, H. (2007). Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* *110*, 913-920.
- Odegard, V. H., and Schatz, D. G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat Rev Immunol* *6*, 573-583.
- Ortega, E., Schneider, H., and Pecht, I. (1991). Possible interactions between the Fc epsilon receptor and a novel mast cell function-associated antigen. *Int Immunol* *3*, 333-342.
- Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C. G., Qi, C. F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H. C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P. L., and Leonard, W. J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* *298*, 1630-1634.

Padilla, J., Kaur, K., Cao, H. J., Smith, T. J., and Phipps, R. P. (2000). Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells. *J Immunol* 165, 6941-6948.

Palmer, C. N., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E., Smith, F. J., *et al.* (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38, 441-446.

Pasquier, B., Launay, P., Kanamaru, Y., Moura, I. C., Pfirsch, S., Ruffie, C., Henin, D., Benhamou, M., Pretolani, M., Blank, U., and Monteiro, R. C. (2005). Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc γ ITAM. *Immunity* 22, 31-42.

Pasquier, B., Lepelletier, Y., Baude, C., Hermine, O., and Monteiro, R. C. (2004). Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76, 1134-1141.

Pedotti, R., DeVoss, J. J., Youssef, S., Mitchell, D., Wedemeyer, J., Madanat, R., Garren, H., Fontoura, P., Tsai, M., Galli, S. J., *et al.* (2003). Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1867-1872.

Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R., and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188, 953-960.

Pfefferkorn, L. C., and Yeaman, G. R. (1994). Association of IgA-Fc receptors (Fc α R) with Fc ϵ RI gamma 2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of gamma 2. *J Immunol* 153, 3228-3236.

Pinheiro da Silva, F., Aloulou, M., Skurnik, D., Benhamou, M., Andremont, A., Velasco, I. T., Chiamolera, M., Verbeek, J. S., Launay, P., and Monteiro, R. C. (2007). CD16 promotes Escherichia coli sepsis through an FcR gamma inhibitory pathway that prevents phagocytosis and facilitates inflammation. *Nat Med* 13, 1368-1374.

Poorafshar, M., Helmby, H., Troye-Blomberg, M., and Hellman, L. (2000). MMCP-8, the first lineage-specific differentiation marker for mouse basophils. Elevated numbers of potent IL-4-producing and MMCP-8-positive cells in spleens of malaria-infected mice. *Eur J Immunol* 30, 2660-2668.

Presta, L. G., Lahr, S. J., Shields, R. L., Porter, J. P., Gorman, C. M., Fendly, B. M., and Jardieu, P. M. (1993). Humanization of an antibody directed against IgE. *J Immunol* 151, 2623-2632.

Ra, C., Jouvin, M. H., Blank, U., and Kinet, J. P. (1989). A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature* 341, 752-754.

Ravetch, J. V., Luster, A. D., Weinshank, R., Kochan, J., Pavlovec, A., Portnoy, D. A., Hulmes, J., Pan, Y. C., and Unkeless, J. C. (1986). Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* 234, 718-725.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-380.

Rhein, L. M., Perkins, M., Gerard, N. P., and Gerard, C. (2008). FcgammaRIII is protective against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38, 401-406.

Robinson, J. K., Blanchard, T. G., Levine, A. D., Emancipator, S. N., and Lamm, M. E. (2001). A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J Immunol* 166, 3688-3692.

Rodewald, H. R., Arulanandam, A. R., Koyasu, S., and Reinherz, E. L. (1991). The high affinity Fc epsilon receptor gamma subunit (Fc epsilon RI gamma) facilitates T cell receptor expression and antigen-major histocompatibility complex-driven signaling in the absence of CD3 zeta and CD3 eta. *J Biol Chem* 266, 15974-15978.

Sakamoto, N., Shibuya, K., Shimizu, Y., Yotsumoto, K., Miyabayashi, T., Sakano, S., Tsuji, T., Nakayama, E., Nakauchi, H., and Shibuya, A. (2001). A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur J Immunol* 31, 1310-1316.

Sakamoto, T., Takigawa, M., Tamamori, T., Horiguchi, D., and Yamada, M. (1990). Fc epsilon receptor II/CD23 positive lymphocytes in atopic dermatitis: II. Infiltration of Fc epsilon R II(+) T cells in the skin lesion. *J Invest Dermatol* 95, 592-596.

Samaridis, J., and Colonna, M. (1997). Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur J Immunol* 27, 660-665.

Samsom, J. N., van Berkel, L. A., van Helvoort, J. M., Unger, W. W., Jansen, W., Thepen, T., Mebius, R. E., Verbeek, S. S., and Kraal, G. (2005). Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J Immunol* 174, 5279-5287.

Scharenberg, A. M., El-Hillal, O., Fruman, D. A., Beitz, L. O., Li, Z., Lin, S., Gout, I., Cantley, L. C., Rawlings, D. J., and Kinet, J. P. (1998). Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns-3,4,5-P3)/Tec kinase-dependent calcium signaling pathway: a target for SHIP-mediated inhibitory signals. *Embo J* 17, 1961-1972.

Schmid-Grendelmeier, P., Fluckiger, S., Disch, R., Trautmann, A., Wuthrich, B., Blaser, K., Scheynius, A., and Crameri, R. (2005). IgE-mediated and T cell-mediated autoimmunity against manganese superoxide dismutase in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 115, 1068-1075.

Schmuth, M., Haqq, C. M., Cairns, W. J., Holder, J. C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A. J., Chuang, G., Moser, A. H., et al. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol* 122, 971-983.

Sechi, S., Roller, P. P., Willette-Brown, J., and Kinet, J. P. (1996). A conformational rearrangement upon binding of IgE to its high affinity receptor. *J Biol Chem* 271, 19256-19263.

Seiberler, S., Bugajska-Schretter, A., Hufnagl, P., Binder, B. R., Stockl, J., Spitzauer, S., Valent, P., and Valenta, R. (1999). Characterization of IgE-reactive autoantigens in atopic dermatitis. 1. Subcellular distribution and tissue-specific expression. *Int Arch Allergy Immunol* 120, 108-116.

Setoguchi, K., Misaki, Y., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kawahata, K., Kadokawa, T., and Yamamoto, K. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis. *J Clin Invest* 108, 1667-1675.

Sheu, M. Y., Fowler, A. J., Kao, J., Schmuth, M., Schoonjans, K., Auwerx, J., Fluhr, J. W., Man, M. Q., Elias, P. M., and Feingold, K. R. (2002). Topical peroxisome proliferator activated receptor-alpha

activators reduce inflammation in irritant and allergic contact dermatitis models. *J Invest Dermatol* *118*, 94-101.

Smith, F. J., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Sandilands, A., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., Evans, A. T., Goudie, D. R., Lewis-Jones, S., *et al.* (2006). Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. *Nat Genet* *38*, 337-342.

Sondermann, P., Huber, R., Oosthuizen, V., and Jacob, U. (2000). The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* *406*, 267-273.

Spencer, N. F., Poynter, M. E., Im, S. Y., and Daynes, R. A. (1997). Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. *Int Immunol* *9*, 1581-1588.

Spergel, J. M., Mizoguchi, E., Brewer, J. P., Martin, T. R., Bhan, A. K., and Geha, R. S. (1998). Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* *101*, 1614-1622.

Spergel, J. M., Mizoguchi, E., Oettgen, H., Bhan, A. K., and Geha, R. S. (1999). Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest* *103*, 1103-1111.

Stuart, L. M., and Ezekowitz, R. A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* *22*, 539-550.

Sugiyama, H., Nonaka, T., Kishimoto, T., Komoriya, K., Tsuji, K., and Nakahata, T. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors are expressed in human cultured mast cells: a possible role of these receptors in negative regulation of mast cell activation. *Eur J Immunol* *30*, 3363-3370.

Swanson, J. A., and Hoppe, A. D. (2004). The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* *76*, 1093-1103.

Sylvestre, D. L., and Ravetch, J. V. (1994). Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* *265*, 1095-1098.

Szatmari, I., Pap, A., Ruhl, R., Ma, J. X., Illarionov, P. A., Besra, G. S., Rajnavolgyi, E., Dezso, B., and Nagy, L. (2006). PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* *203*, 2351-2362.

Szatmari, I., Torocsik, D., Agostini, M., Nagy, T., Gurnell, M., Barta, E., Chatterjee, K., and Nagy, L. (2007). PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* *110*, 3271-3280.

Takai, T. (2002). Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* *2*, 580-592.

Takigawa, M., Tamamori, T., Horiguchi, D., Sakamoto, T., Yamada, M., Yoshioka, A., Toda, K., Imamura, S., and Yodoi, J. (1991). Fc epsilon receptor II/CD23-positive lymphocytes in atopic dermatitis. I. The proportion of Fc epsilon RII+ lymphocytes correlates with the extent of skin lesion. *Clin Exp Immunol* *84*, 275-282.

Takizawa, F., Adamczewski, M., and Kinet, J. P. (1992). Identification of the low affinity receptor for immunoglobulin E on mouse mast cells and macrophages as Fc gamma RII and Fc gamma RIII. *J Exp Med* *176*, 469-475.

Tam, S. Y., Tsai, M., Snouwaert, J. N., Kalesnikoff, J., Scherrer, D., Nakae, S., Chatterjea, D., Bouley, D. M., and Galli, S. J. (2004). RabGEF1 is a negative regulator of mast cell activation and skin inflammation. *Nat Immunol* *5*, 844-852.

Tantisira, K. G., Silverman, E. S., Mariani, T. J., Xu, J., Richter, B. G., Klanderman, B. J., Litonjua, A. A., Lazarus, R., Rosenwasser, L. J., Fuhlbrigge, A. L., and Weiss, S. T. (2007). FCER2: a pharmacogenetic basis for severe exacerbations in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120, 1285-1291.

Taube, C., Wei, X., Swasey, C. H., Joetham, A., Zarini, S., Lively, T., Takeda, K., Loader, J., Miyahara, N., Kodama, T., *et al.* (2004). Mast cells, Fc epsilon RI, and IL-13 are required for development of airway hyperresponsiveness after aerosolized allergen exposure in the absence of adjuvant. *J Immunol* 172, 6398-6406.

Tsuji, T., Hamajima, K., Ishii, N., Aoki, I., Fukushima, J., Xin, K. Q., Kawamoto, S., Sasaki, S., Matsunaga, K., Ishigatubo, Y., *et al.* (1997). Immunomodulatory effects of a plasmid expressing B7-2 on human immunodeficiency virus-1-specific cell-mediated immunity induced by a plasmid encoding the viral antigen. *Eur J Immunol* 27, 782-787.

Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., and Karasuyama, H. (2008). Basophils Play a Pivotal Role in Immunoglobulin-G-Mediated but Not Immunoglobulin-E-Mediated Systemic Anaphylaxis. *Immunity*.

Tsunemi, Y., Saeki, H., Nakamura, K., Sekiya, T., Hirai, K., Fujita, H., Asano, N., Tanida, Y., Kakinuma, T., Wakugawa, M., *et al.* (2002). Eotaxin gene single nucleotide polymorphisms in the promoter and exon regions are not associated with susceptibility to atopic dermatitis, but two of them in the promoter region are associated with serum IgE levels in patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 29, 222-228.

Tu, Y., Salim, S., Bourgeois, J., Di Leo, V., Irvine, E. J., Marshall, J. K., and Perdue, M. H. (2005). CD23-mediated IgE transport across human intestinal epithelium: inhibition by blocking sites of translation or binding. *Gastroenterology* 129, 928-940.

Vercelli, D., and Geha, R. S. (1989). The IgE system. *Ann Allergy* 63, 4-11.

Vercelli, D., Helm, B., Marsh, P., Padlan, E., Geha, R. S., and Gould, H. (1989a). The B-cell binding site on human immunoglobulin E. *Nature* 338, 649-651.

Vercelli, D., Jabara, H. H., Lee, B. W., Woodland, N., Geha, R. S., and Leung, D. Y. (1988). Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon R2/CD23 on normal human monocytes. *J Exp Med* 167, 1406-1416.

Vercelli, D., Leung, D. Y., Jabara, H. H., and Geha, R. S. (1989b). Interleukin 4 dependent induction of IgE synthesis and CD23 expression by the supernatants of a human helper T cell clone. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 88, 119-121.

Voehringer, D., Shinkai, K., and Locksley, R. M. (2004). Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* 20, 267-277.

Wahli, W. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing. *Swiss Med Wkly* 132, 83-91.

Wang, B., Rieger, A., Kilgus, O., Ochiai, K., Maurer, D., Fodinger, D., Kinet, J. P., and Stingl, G. (1992). Epidermal Langerhans cells from normal human skin bind monomeric IgE via Fc epsilon RI. *J Exp Med* 175, 1353-1365.

- Wang, H. W., Tedla, N., Lloyd, A. R., Wakefield, D., and McNeil, P. H. (1998). Mast cell activation and migration to lymph nodes during induction of an immune response in mice. *J Clin Invest* 102, 1617-1626.
- Weiner, H. L. (1997). Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 18, 335-343.
- Weng, W. K., Czerwinski, D., Timmerman, J., Hsu, F. J., and Levy, R. (2004). Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype. *J Clin Oncol* 22, 4717-4724.
- Weng, W. K., and Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21, 3940-3947.
- Weskamp, G., Ford, J. W., Sturgill, J., Martin, S., Docherty, A. J., Swendeman, S., Broadway, N., Hartmann, D., Saftig, P., Umland, S., et al. (2006). ADAM10 is a principal 'sheddase' of the low-affinity immunoglobulin E receptor CD23. *Nat Immunol* 7, 1293-1298.
- Williams, C. M., and Galli, S. J. (2000a). The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105, 847-859.
- Williams, C. M., and Galli, S. J. (2000b). Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* 192, 455-462.
- Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M. S., and Ravetch, J. V. (1992). Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *J Exp Med* 175, 1381-1390.
- Woerly, G., Honda, K., Loyens, M., Papin, J. P., Auwerx, J., Staels, B., Capron, M., and Dombrowicz, D. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med* 198, 411-421.
- Wurzburg, B. A., Garman, S. C., and Jardetzky, T. S. (2000). Structure of the human IgE-Fc C epsilon 3-C epsilon 4 reveals conformational flexibility in the antibody effector domains. *Immunity* 13, 375-385.
- Wurzburg, B. A., Tarchevskaya, S. S., and Jardetzky, T. S. (2006). Structural changes in the lectin domain of CD23, the low-affinity IgE receptor, upon calcium binding. *Structure* 14, 1049-1058.
- Xia, H. Z., Du, Z., Craig, S., Klisch, G., Noben-Trauth, N., Kochan, J. P., Huff, T. H., Irani, A. M., and Schwartz, L. B. (1997). Effect of recombinant human IL-4 on tryptase, chymase, and Fc epsilon receptor type I expression in recombinant human stem cell factor-dependent fetal liver-derived human mast cells. *J Immunol* 159, 2911-2921.
- Xiao, W., Nishimoto, H., Hong, H., Kitaura, J., Nunomura, S., Maeda-Yamamoto, M., Kawakami, Y., Lowell, C. A., Ra, C., and Kawakami, T. (2005). Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the Fc epsilon RI. *J Immunol* 175, 6885-6892.
- Yano, K., Yamaguchi, M., de Mora, F., Lantz, C. S., Butterfield, J. H., Costa, J. J., and Galli, S. J. (1997). Production of macrophage inflammatory protein-1alpha by human mast cells: increased anti-IgE-dependent secretion after IgE-dependent enhancement of mast cell IgE-binding ability. *Lab Invest* 77, 185-193.

- Yokota, A., Yukawa, K., Yamamoto, A., Sugiyama, K., Suemura, M., Tashiro, Y., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1992). Two forms of the low-affinity Fc receptor for IgE differentially mediate endocytosis and phagocytosis: identification of the critical cytoplasmic domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5030-5034.
- Yokozeki, H., Ghoreishi, M., Takagawa, S., Takayama, K., Satoh, T., Katayama, I., Takeda, K., Akira, S., and Nishioka, K. (2000). Signal transducer and activator of transcription 6 is essential in the induction of contact hypersensitivity. *J Exp Med* **191**, 995-1004.
- Yoo, J., Omori, M., Gyarmati, D., Zhou, B., Aye, T., Brewer, A., Comeau, M. R., Campbell, D. J., and Ziegler, S. F. (2005). Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J Exp Med* **202**, 541-549.
- Yu, L. C., and Perdue, M. H. (2001). Role of mast cells in intestinal mucosal function: studies in models of hypersensitivity and stress. *Immunol Rev* **179**, 61-73.
- Yu, L. C., Yang, P. C., Berin, M. C., Di Leo, V., Conrad, D. H., McKay, D. M., Satoskar, A. R., and Perdue, M. H. (2001). Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4. *Gastroenterology* **121**, 370-381.
- Yu, P., Kosco-Vilbois, M., Richards, M., Kohler, G., and Lamers, M. C. (1994). Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* **369**, 753-756.
- Yuen, E., Brown, R. D., Gibson, J., Joshua, D. E., Rickard, K. A., and Kronenberg, H. (1990). Immunophenotypic analyses of cultured hemopoietic mast cells. *Exp Hematol* **18**, 1019-1025.
- Zacharasiewicz, A., Wilson, N., Lex, C., Erin, E. M., Li, A. M., Hansel, T., Khan, M., and Bush, A. (2005). Clinical use of noninvasive measurements of airway inflammation in steroid reduction in children. *Am J Respir Crit Care Med* **171**, 1077-1082.
- Zeyrek, D., Tanac, R., Altinoz, S., Berdeli, A., Gulen, F., Koksoy, H., and Demir, E. (2008). FcgammaRIIIa-V/F 158 polymorphism in Turkish children with asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* **19**, 20-24.
- Zweiman, B., Kaplan, A. P., Tong, L., and Moskovitz, A. R. (1997). Cytokine levels and inflammatory responses in developing late-phase allergic reactions in the skin. *J Allergy Clin Immunol* **100**, 104-109.

Fc ϵ RI and Fc γ RIII/CD16 differentially regulate atopic dermatitis

Georges Abboud *†‡ ¶, Delphine Staumont-Sallé *†‡§ ¶ Akira Kanda *†‡, Thomas Roumier *†‡, Nathalie Deruytter *†‡, Céline Lavogiez *†‡, Sébastien Fleury *†‡, Patrick Rémy, Tech *†‡, Jean-Paul Papin *†‡, Monique Capron *†‡ and David Dombrowicz *†‡.

* Inserm U547. † Institut Pasteur de Lille. ‡ Université Lille 2. Lille, France.

§ Department of Dermatology, CHRU Lille. Lille, France.

¶ GA and DS contributed equally to this work

Corresponding author :

David Dombrowicz, Inserm U547, Institut Pasteur de Lille. 1, rue Prof. Calmette BP245.

59019 Lille Cedex. France. E-mail : david.dombrowicz@pasteur-lille.fr.

Phone: +33 3 20 87 79 67. Fax: +33 3 20 87 78 88.

Running title: Fc ϵ RI and CD16 in atopic dermatitis.

Key words: Fc receptors, skin, allergy, inflammation, knockout mouse

Abstract

The high affinity IgE receptor, Fc ϵ RI and the low affinity IgG receptor, Fc γ RIII/CD16 play an essential role in allergic diseases. In human skin, they are present on antigen presenting and effector cells recruited into the inflamed dermis. FcR γ is a subunit shared, among other FcR, by Fc ϵ RI and CD16 and is essential to their assembly and signal transduction. Using an experimental model which faithfully mimics human atopic dermatitis and specific FcR-deficient mice, we have here delineated the respective contribution Fc ϵ RI and Fc γ RIII/CD16 to the pathology. We demonstrate that symptoms of atopic dermatitis are completely absent in FcR γ -deficient animals but only partially inhibited in either Fc ϵ RI- or Fc γ RIII/CD16-deficient animals. Absence or attenuation of the pathology is correlated to increased skin expression of regulatory IL-10 and Foxp3. While Fc ϵ RI controls both Th1 and Th2 skin response, mast cell recruitment into draining lymph nodes and IgE production, CD16 regulates only Th2 skin response, as well as T cell proliferation and IgG₁ production. This isotype-specific regulation by the cognate FcR is associated to a differential regulation of IL-4 and IL-21 expression in the draining lymph nodes. Fc ϵ RI and CD16 thus contribute to atopic dermatitis but differentially regulate immune responses associated to the disease. Targeting both IgE/Fc ϵ RI and IgG/CD16 interactions might represent an efficient therapeutic strategy for allergic diseases.

Introduction

AD is a common chronic inflammatory skin disease that often begins in infancy and frequently occurs in subjects with a personal or family history of atopic disease (1). Skin lesions in AD display increased epidermal thickness and infiltration with inflammatory cells: activated memory CD4⁺ T cells, macrophages, mast cells and eosinophils. Acute lesions are rather associated to a Th2 response, while a Th1 profile, with an accumulation of IFN- γ producing cells, is predominant in chronic phase. Most AD patients show elevated serum IgE levels, with specific IgE directed against environmental allergens or microbial proteins as well as allergen-specific IgG (particularly IgG₁ and IgG₄) (2, 3).

Ig Fc portion interact with α subunits of the various FcR, exerting pleiotropic effects within the immune system (4, 5). IgE binds to 2 Fc ϵ R: the multimeric high affinity Fc ϵ RI (4) and the low affinity, lectin type Fc ϵ RII/CD23 (6). Fc ϵ RI is expressed on the surface of mast cells and basophils and triggers IgE-mediated degranulation and cytokine release (4). In humans, it is also expressed on professional APCs such as dendritic cells DC – including epidermal Langerhans cells and Inflammatory Dendritic Epidermal Cells (IDEC) –, monocytes/macrophages, eosinophils and platelets (4), where it plays a role in antigenic presentation and/or ADCC reactions (4). Three Fc γ R-associated, ITAM-containing, activating receptors are found among Fc γ R family: the high affinity Fc γ RI/CD64, the low affinity Fc γ RIII/CD16 (in humans, the non signalling, glycolipid-anchored CD16b is expressed by neutrophils) and, in mice, the low affinity Fc γ IV. Fc γ R family also comprises 1 monomeric, ITIM-bearing, inhibitory receptor: the low affinity Fc γ RII/CD32b (in humans, CD32a is also an activating receptor) (5) . In mice, CD16, CD32 and Fc γ IV also act as low affinity IgE receptors (4, 7). Most Fc γ Rs have a widespread cell distribution. Activating Fc γ R trigger phagocytosis, cytokine release, antigen presentation and ADCC reactions (5).

Polymorphisms in Fc ϵ RI and CD16 were found to be correlated with atopy. Hasegawa et al. demonstrated the presence of a polymorphism in human *FceRI α* gene promoter (chromosome 1q21) related to atopic dermatitis in Japanese population (8). The α subunit of Fc ϵ RI plays an important role in IgE-mediated allergic reactions as an amplifier for cell surface expression and signal transduction of Fc ϵ RI (4). Polymorphisms in *FcR β* gene located on human chromosome 11q12-13 have been associated to atopy. Indeed, different groups found single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *FcR β* promoter in atopic patients (9). Those SNPs were causally linked with atopy via regulation of Fc ϵ RI expression (9). Likewise, Zeyrek D et al. showed that a V158V genotype in CD16a gene polymorphism may represent a genetic risk factor for the development of atopic diseases (10).

IgE has also been shown to increase expression of both Fc ϵ RI and CD23 (4, 6), in the former case by preventing proteolytic degradation and receptor internalization. Indeed, Fc ϵ RI surface expression is increased in Langerhans cells (LC), inflammatory dendritic epidermal cells (IDEC), monocytes and circulating dendritic cells (DC) from patients with atopic dermatitis (4). In DC, this increased expression has been associated to increased Fc γ expression, the limiting factor for receptor surface expression (11). In humans, Fc ϵ RI engagement has anti-apoptotic effects on monocytes (12). An increased expression of CD64 and CD16 was also demonstrated in acutely and chronically inflamed skin, compared with healthy and non-lesional atopic dermatitis skin (13). The respective contribution of IgE and IgG receptors to the physiopathology of atopic dermatitis however remains unclear. Thus, using a mouse model faithfully mimicking the human disease and FcR-deficient animals, we have thus examined the role of Fc γ R-associated Fc ϵ RI and CD16 in atopic dermatitis.

Material and Methods

Animals

Balb/c, C57BL/6 and OT-II (14) mice, FcR $\gamma^{\prime -}$ mice (Balb/c background) (15) and CD16 $^{-/-}$ mice (C57BL/6 background) (16) were from Charles River, Taconic Farms and The Jackson Laboratory respectively. DO11.10 mice (17) were a gift from Dr C. Verwaerde (Institut Pasteur de Lille). Fc ϵ RI $^{-/-}$ mice (BALB/c background) (18) were bred at the Institut Pasteur de Lille. Animals were kept under SPF conditions. Eight to 12-wk-old female mice were used for all the experiments, performed following approval by the Ethics committee for animal experimentation from Nord-Pas-de-Calais Region.

Induction of atopic dermatitis

AD was induced by epicutaneous OVA sensitization (19). Two paper discs, gift from Epitests (Tuusula, Finland), soaked with 25 µl OVA solution (2 mg/ml in PBS) or PBS, were applied on abdominal skin 24h after shaving. Patches were secured with a bioocclusive dressing (Visulin, Hartmann, Châtenoi, France), protected with an elastic bandage (Optiplaste, Smith & Nephew, Vibraye, France). Patches were left on for three 1-week periods with a 2-wk interval between applications. Animals were sacrificed by cervical dislocation. Skin and inguinal lymph nodes were collected in fixative for histology and/or directly frozen in liquid nitrogen for RNA analyses.

Analysis of lung function and inflammation.

At the time of last patch removal (day 49) mice were challenged for 20 min by aerosol nebulization with OVA (1% in PBS) using an ultrasonic nebulizer (Ultramed, Medicalia, Firenze, Italy) and serum was collected (19). On the next day, AHR to increasing concentrations of methacholine was measured by whole body plethysmography (Emka

Technologies, Paris, France). Results were expressed as percentage of increase in Penh over baseline value. Lung samples were used for bronchoalveolar lavage (BAL). BAL were analyzed on cytocentrifuge preparations following RAL 555 staining.

Histology and immunohistochemistry

Tissue biopsies were fixed in ImmunoHistoFix (Intertiles, Brussels, Belgium) and embedded in ImmunoHistoWax (Intertiles) (20). Serial sections (5 µm) were stained with May-Grunwald-Giemsa for measurement of epidermal thickness as well as eosinophil and mast cell counts. Epidermal thickness was determined at a 250-fold magnification with an ocular micrometer; average of 10 measures was calculated for each sample. Cells were enumerated using an eyepiece equipped with a calibrated grid, by examining 20 random fields at 1000-fold magnification; results were expressed as cells number per mm². For immunohistochemical analysis, 5 µm sections were dewaxed in acetone for 5 min and immunostained with anti-MHC II and anti-CD4 mAbs (Pharmingen), as previously described (20).

Measurement of Ig concentrations

Total IgE concentrations were measured in mouse serum by ELISA, using anti-IgE Abs (Pharmingen) (20). Total IgG₁ and IgG_{2a} were measured with the immunoassay kit SBA Clonotyping System-HRP (Southern Biotech). Anti-OVA IgE were measured using anti-IgE (Pharmingen) as capture Ab and biotinylated OVA and HRP-conjugated streptavidin (Amersham) for detection. Anti-OVA IgG₁ and IgG_{2a} were measured using OVA-coated plates and HRP-conjugated anti-mouse IgG₁ and IgG_{2a} (Southern Biotech). Twofold serial dilutions were prepared for each serum (starting dilution 1:25 for IgE, 1:5000 for IgG₁ and 1:250 for IgG_{2a} titrations). Ab titers were calculated as the dilution corresponding to twice the mean absorbance value obtained for non-sensitized mouse sera.

Quantitative RT-PCR

Tissue RNA extraction was performed as described (21). Reverse transcription was performed with 1 µg RNA using Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). cDNAs were amplified by PCR in triplicate assays for 40 cycles in SYBR®Green PCR Master Mix (Molecular Probes) on ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). Oligonucleotide primers specific for mouse cytokines, chemokines and their receptors and nuclear transcription factors are listed in Table I). Primers were used for amplification in triplicate assays. PCR amplification of GAPDH was performed to control for sample loading and to allow normalization between samples. Since expression levels were identical in PBS-treated WT or FcR-deficient animals, results for OVA-sensitized animals were expressed as the mean fold induction compared with the mean expression level in PBS-treated mice.

Determination of T cell proliferation in draining lymph nodes

Naive T cells purified from TCR_{OVA} transgenic mice (DO11.10 or OTII) were adoptively transferred into sex- and background-matched recipient mice. CD4⁺ cells were purified from spleens using Dynal Mouse CD4 Negative Isolation Kit (Invitrogen) (purity > 95%). CD4⁺ cells were labeled with carboxy fluorescein diacetate succinimide ester (CFSE) (Sigma-Aldrich) (22). Two days before the first sensitization, each recipient mouse received 2 x 10⁶ labeled cells via the lateral tail vein. At day 0 and day 3, mice were epicutaneously sensitized with 100 µl of OVA (2 mg/ml in PBS) or PBS. Two days after the second sensitization mice were sacrificed and inguinal lymph nodes were harvested and homogenized and processed for flow cytometry.

Flow cytometry analysis

Cells were washed twice in ice-cold PBS, and after incubation with anti-mouse CD16/32 2.4G2, were incubated in 100 µl of PBS containing the appropriate mAb (2.5 µg/ml

for 1×10^6 cells) for 30 min on ice. At least 2×10^6 cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Unless otherwise mentioned, antibodies were from BD Biosciences. For analysis of CFSE-labelled DO11.10 T cells, lymph node cells were stained with anti-CD4-PE and biotinylated KJ1-26 antibody (Caltag) followed by incubation with streptavidin-allophycocyanin. For analysis of CFSE-labelled OT-II T cells, lymph node cells were stained with anti-CD4-PE/Cy7, anti-V α 2 TCR-PE and biotinylated anti-V β 5 TCR followed by incubation with streptavidin-allophycocyanin. Propidium iodide was added for dead cells exclusion, immediately before FACS analysis., CD4 $^+$ CFSE $^+$ KJ1-26 $^+$ and CD4 $^+$ CFSE $^+$ V α 2 $^+$ V β 5 $^+$ cells were gated and analyzed in mice on a BALB/c and C57BL/6 background respectively.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using Mann-Withney U test. Results were expressed as mean \pm SEM ; $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Both FcεRI and CD16 contribute to skin inflammatory responses in a model of AD.

Using a well established model of AD based on Ag sensitization by repeated epicutaneous OVA applications, we assessed the effect of FcR γ , FcεRI and CD16 deficiency on skin histology and inflammatory responses. In the absence of OVA sensitization, no inflammation was detected regardless of the mouse genotype (Fig.1A). Compared with OVA-sensitized FcR $\gamma^{+/+}$, skin inflammatory response was abolished in OVA-sensitized FcR $\gamma^{-/-}$ mice, with an absence of hyperkeratosis, spongiosis and dermal cellular infiltrates. Upon antigen sensitization, FcR $\gamma^{-/-}$ mice exhibited no significant increase in either epidermal thickness (Fig. 1B), or recruitment of inflammatory cells: mast cells (Fig. 1C), eosinophils (Fig. 1D), Antigen Presenting Cells (Fig. 1E) and CD4 $^{+}$ T cells (Fig. 1F), demonstrating that at least one FcR γ -associated receptor is essential for induction of atopic dermatitis. On the other hand, OVA-sensitized FcεRI $^{-/-}$ and CD16 $^{-/-}$ mice showed significant but partial decrease of skin inflammatory response compared to their WT counterparts (Fig.1A). Compared to FcεRI $^{+/+}$ mice, OVA-sensitized FcεRI $^{-/-}$ mice showed a 45% average decrease in epidermal thickening (Fig1B) as well as 78, 61, 66 and 62 % average decrease in mast cell, eosinophil, APC and CD4 $^{+}$ T cell recruitment respectively (Fig1C-F). Interestingly, OVA-sensitized CD16 $^{-/-}$ mice show no increase in epidermal thickness or in eosinophil and APC infiltration compared to their PBS-treated counterparts (Fig1B, D and E). This represents a 63 and 44% average decrease of mast cell and CD4 $^{+}$ T cell recruitment compared to CD16 $^{+/+}$ mice. These results thus demonstrate that both FcεRI and CD16 contribute to AD skin lesions but differentially control dermal recruitment of inflammatory cells.

FcεRI and CD16 differentially regulate expression of Th2-, Th1- and Th17-related molecules in OVA-sensitized mouse skin.

We next examined, by real-time PCR, mRNAs expression for lesion-, inflammation- or immune response-associated molecules in the skin from unsensitized or OVA-sensitized FcR γ ^{-/-}, Fc ϵ RI^{-/-} and CD16^{-/-} mice as well as their WT counterparts. For each gene examined, skin expression was comparable in PBS-treated gene-deficient animals and in their WT counterparts (not shown). In WT animals, OVA-sensitization increased mRNA expression of several genes associated to Th2, Th1 Th17 as well as to inflammatory response with the exception of IL-18, and TSLP, which have been associated to AD in other experimental models, and of IL-33, a Th2 cell chemoattractant and Th2 associated-cytokine inducer, as well as of immunoregulatory TGF- β (23, 24) (Fig 2A-C). By contrast, OVA sensitization of FcR γ ^{-/-} mice did not significantly show increased expression of most of these genes (Fig 2A). Importantly, this inhibited response coincided with a 2 fold-increase in the expression of immunoregulatory IL-10 and Foxp3 (Fig 2A), while in FcR γ ^{+/+} mice, expression of these later genes was not affected by OVA-sensitization. This thus further indicates that at least one FcR γ -associated receptor is a key regulator of skin immune and inflammatory response in this model of AD.

In skin from OVA-sensitized Fc ϵ RI^{-/-} mice, IL-13, IL-6 and IL-17 expression was comparable to that found in corresponding PBS-treated animals, while a partial decrease of expression of several genes was observed compared to OVA-sensitized WT animals (Fig. 2B): Th2-associated molecules (IL-4, IL-5, IL-31); CCR3, which contribute to eosinophil chemotaxis; CCL22 (Macrophage-Derived Chemokine, MDC), a chemoattractant for Th2 lymphocytes into the inflammatory skin; Th1-associated molecules (IFN- γ and IP-10); CCL20, an APC-attracting chemokine; pro- inflammatory IL-1 β . As FcR γ ^{-/-} mice, Fc ϵ RI^{-/-} mice showed a 1.8 fold increase of IL-10 and Foxp3 mRNA expression following OVA sensitization. Surprisingly, in CD16^{-/-} mice, OVA-sensitization did not lead to a significant increase of Th2-related molecules and of CCL20 expression. IL-17, IL-1 β and IL-6 mRNA expression was also decreased compared to OVA-sensitized CD16^{+/+} animals. By contrast, Th1 response was

comparable to that of corresponding OVA-sensitized CD16^{+/+} animals. Inhibition of Th2, Th17 and skin inflammatory response in OVA-sensitized CD16^{-/-} mice coincided with a moderate increase of IL-10 and Foxp3 mRNA expression (1.6 and 1.5-fold increase respectively).

Taken together these data show that FcεRI and CD16 differentially regulate skin expression of DA-associated cytokines with FcεRI controlling both Th1 and Th2 responses while CD16 only regulates Th2 response.

FcεRI and CD16 differentially regulate the humoral response in a mouse model of AD.

Serum levels of IgE and IgG₁, both associated to a Th2 response, were decreased in OVA-sensitized FcRγ^{-/-} mice compared to OVA-sensitized FcRγ^{+/+} animals, with a 64 and 55% average decrease for total IgE and OVA-specific IgE respectively, and a 58.5% decrease for OVA-specific IgG₁ (Fig 3A-C). IgG_{2a} and IgG_{2b} antibodies, associated to a Th1 response, were undetectable in OVA-sensitized WT or FcR-deficient mice (data not shown). Interestingly, compared to their FcRγ^{+/+} controls, only IgE response was affected in OVA-treated FcεRI^{-/-} mice: 67 and 54% average decrease for total IgE and OVA-specific IgE respectively (Fig 3A-C). By contrast to the latter mice, in OVA-sensitized CD16^{-/-} mice, only OVA-specific IgG₁ response was affected (63% decrease). Those results demonstrate that, in this model, FcεRI and CD16 specifically regulate the production of their own ligand.

In order to determine, at the molecular level, the factors which account for this differential regulation, we analyzed, by real-time PCR, cytokine expression in draining inguinal lymph nodes. In particular, we examined the expression of IL-21 and its receptor. Indeed, these later are essential for IgG1 production (25). In OVA-sensitized FcRγ^{-/-} mice, expression of IL-4, IFN-γ, IL-21 and IL-21 R were fully inhibited compared to FcRγ^{+/+} animals (Fig 3D). IL-13 expression was comparable to that found in WT animals (data not shown). In

OVA-sensitized $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-/-}$ mice, IL-4 expression was reduced and IFN- γ completely inhibited compared to $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{+/+}$ animals, while IL-21/IL-21R axis remained intact (Fig 3E). By contrast, when compared to $\text{CD}16^{+/+}$ animals, IL-4 and IFN- γ expression was comparable in OVA-sensitized $\text{CD}16^{-/-}$ mice but expression of IL-21 and IL-21R was fully inhibited (Fig 3F).

Important contribution of CD16 to antigenic presentation in a mouse model of AD.

We then investigated whether defective antigen presentation during early stages of epicutaneous sensitization was responsible for the reduced inflammatory skin response observed in OVA-sensitized $\text{FcR}\gamma^{-/-}$, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-/-}$ and $\text{CD}16^{-/-}$ mice. We thus examined antigen-induced T cell proliferation *in vivo* by transfer of CFSE-labeled $\text{CD}4^+$ T cells from DO11.10 mice to recipient animals that were epicutaneously sensitized for one week. In the absence of OVA sensitization, both percentage and total number of proliferating T cells were very low for each mouse strain (Fig 4A left panel and C). Compared to $\text{FcR}\gamma^{+/+}$ animals, OVA-sensitized $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ mice showed a 64 % decrease in the percentage of proliferating T cells (Fig 4A right panel). They exhibited no significant increase in the total number of proliferating cells, compared to corresponding PBS-treated animals (Fig 4C), indicating that $\text{FcR}\gamma$ is essential for antigen presentation and thus T cell proliferation in this model. T cell proliferation following OVA-sensitization was comparable in $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{+/+}$ and $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-/-}$ mice (Fig 4A right panel and C), in agreement with the absence of $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ expression on WT mouse DC. By contrast, compared to $\text{CD}16^{+/+}$ animals, OVA-sensitized $\text{CD}16^{-/-}$ mice showed 33 and 72 % decrease in proliferating T cells by percentage and total cell number respectively (Fig 4B right panel and C). These results reflect that, in this model of AD, CD16 plays a major role by controlling antigen presentation.

CD16 deficiency leads to complete decrease of lung inflammation in a mouse model of AD.

Since this mouse model is characterized, like AD in humans, by antigen-induced lung inflammation, we examined airway hyperreactivity (AHR) and recruitment of inflammatory cells in the broncho-alveolar lavage (BAL) following epicutaneous sensitization and a single nebulization. While OVA-sensitized and challenged $\text{FcR}\gamma^{+/+}$ mice, upon nebulization with increasing doses of methacholine, displayed increased AHR compared to PBS-sensitized animals, OVA- and PBS-sensitized $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ mice responded similarly (Fig 6A) demonstrating the essential role of $\text{FcR}\gamma$ in airway inflammation following epicutaneous sensitization. Along these lines, BAL inflammatory infiltrate, in OVA-sensitized and challenged $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ mice was virtually absent compared to $\text{FcR}\gamma^{+/+}$ mice (Fig 6B). Lung inflammatory response was equally abolished in OVA-sensitized and challenged $\text{CD16}^{-/-}$ mice compared to $\text{CD16}^{+/+}$ animals (Fig 6C) indicating that CD16 is one key $\text{FcR}\gamma$ -associated receptor for induction of lung inflammation in this model of AD.

$\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ regulates mast cell migration to the draining lymph nodes in a mouse model of AD..

Since $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ exerted a significant effect on skin inflammation without regulating APC function, we reasoned that mast cells would be the likeliest cell type directly affected by $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ deficiency. We thus examined mast cell recruitment into draining lymph nodes following sensitization. In contrast to OVA-sensitized $\text{CD16}^{+/+}$ and $\text{CD16}^{-/-}$ mice which displayed a similar increase in inguinal lymph nodes compared to corresponding PBS-sensitized animals, $\text{FcR}\gamma^{-/-}$ and $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{-/-}$ mice showed no significant antigen-induced increase mast cell recruitment into lymph nodes (Fig 5). This further demonstrates that $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ and CD16 differentially regulate distinct, but partially overlapping, sets of parameters from the AD-associated immune response.

Discussion

In this paper, we evidence the differential contribution of FcR γ -associated Fc ϵ RI and Fc γ RIII/CD16 in a murine model of atopic dermatitis. Absence of FcR γ -associated activating receptors led to a virtual absence of pathology with abolished skin and lung inflammation and drastic decrease of humoral response that were associated to an inhibition of Th2, Th1, Th17 and inflammatory cytokine expression. By contrast, we observed a 2-fold increase of regulatory IL-10 and Foxp3 was observed. This later finding is likely linked to activation of the remaining inhibitory Fc γ RII/CD32b expressed by APC, which induces IL-10 production and Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells (26). Fc γ RII/CD32b-independent mast cell activation might also lead to IL-10 production and/or induction of Foxp3 expression (27-29). Such an increased IL-10 and Foxp3 expression was also found in Fc ϵ RI- and, to a slightly lesser extent, in CD16-deficient animals. Defective antigen presentation during early sensitization phase and thus abrogated antigen-induced T cell proliferation accounts, at least in part, for the inhibition of pathology as previously observed in models of delayed hypersensitivity (30) and asthma (31). The lack of FcR γ expression on effector cells such as mast cells might further inhibit development of inflammation as shown in a mast cell-dependent asthma model (32).

Lack of Fc ϵ RI led to a partial decrease of epidermal thickening and cellular recruitment into dermis upon induction of AD. Fc ϵ RI contribution to the pathology might be slightly underestimated since we have shown that CD16 expression on Fc ϵ RI-deficient mast cells, and probably basophils, is upregulated and leads to more severe IgG-mediated anaphylaxis (33). In our AD model, the absence of Fc ϵ RI also led to impaired skin expression of Th1, Th2, Th17 and inflammatory cytokines but to an increased expression of Foxp3 and IL-10. As observed in asthma models (34, 35), Fc ϵ RI involvement in this AD model results from its high expression levels on mast cells, which are very abundant in skin. However, basophil contribution to the pathology can not be completely ruled out, as this cell type contributes to IgE-induced chronic

allergic dermatitis (36, 37). Histamine release by mast cells promotes Langerhans cells migration to draining lymph nodes through binding to H2 receptors (38). Thus, lack of Fc ϵ RI might indirectly explain the decreased skin APC number compared to sensitized WT animals. Following sensitization, mast cells also migrate to draining lymph nodes, where they induce T lymphocytes recruitment via MIP-1 β production. In our model of AD, mast cell number in draining lymph nodes appears to be controlled by Fc ϵ RI. As mast cells undergo Fc ϵ RI-, IgE- and antigen-dependent chemotaxis (39), an effect not reported for IgG isotypes, it is likely that the lack of Fc ϵ RI expression accounts for this defective migration and thus for indirect effects on other cell types besides Langerhans cells, particularly T and B cells and eosinophils. Indeed, mast cells also release Th2 and pro-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and IL-6 upon Fc ϵ RI activation (40). These cytokines are known to regulate IgE production and eosinophilia, two hallmarks of AD. IL-6 has been shown to regulate IL-17 production (41), recently associated to AD (42). Thus decreased IL-6 production by mast cells might indirectly account for the decreased IL-17 expression. Surprisingly, in Fc ϵ RI-deficient mice, antigen-specific IgG₁ response was unaffected while antigen-specific IgE response was decreased (Fig 3). We had previously reported a tendency to lower antigen-specific IgE concentrations but normal IgG levels following active anaphylaxis-inducing immunization (33). This regulation of IgE synthesis by Fc ϵ RI thus seems to complete a regulatory loop. Indeed, the ability for IgE to upregulate expression of both its receptors has been previously documented (4, 6). IL-21 seems to be the only factor known to differentially regulate IgE and IgG₁ synthesis (25). Expression of both IL-21 and its receptor were unaffected in draining lymph nodes from Fc ϵ RI-deficient animals, while expression of IL-4, the key cytokine for the regulation of IgE synthesis in this model, was reduced. Thus, the differential effect of Fc ϵ RI and CD16 on IgE and IgG₁ production might be attributed to a distinct regulation of IL-4 and IL-21 (see below).

CD16 deficiency led to a complete inhibition of epidermal thickening, dermal and lung recruitment of inflammatory cells following sensitization. Surprisingly, in our model of AD eliciting both a Th1 and a Th2 response (1), skin Th1-associated cytokine response was unaffected in CD16-deficient mice while Th2 response was completely abolished. These results on CD16 selective contribution to the Th2 response -and to AD- are in agreement with those obtained in a (strongly Th2-polarized) asthma model, in which CD64 does not play a role (43). Both IL-17 and IL-6 expression was inhibited while IL-10 and Foxp3 expression was enhanced in CD16-deficient mice as it was the case for Fc ϵ RI-deficient animals. By contrast, CD16-deficient mice showed a major decrease in antigen-induced T cell proliferation indicating that CD16 plays an essential role in antigenic presentation and initiation of immune response in this model of AD. Indeed, CD16 is highly expressed on DC and is known to preferentially bind IgG₁ (immune complexes) (44), the major Th2-associated isotype in mouse, whose levels are very high following OVA-sensitization in this AD protocol (Fig 3). Besides its expression on APC, CD16 is also expressed on mast cells (28) and basophils (45). It is thus possible that CD16 deficiency directly contributed to the decreased mast cell number and to a dampened mast cell activation in skin following antigen sensitization. However, mast cell number in draining lymph nodes from CD16-deficient animals was not affected compared to WT animals, suggesting that, in contrast with Fc ϵ RI, CD16 is not involved in chemotactic activity. Finally, as observed for Fc ϵ RI and IgE, CD16 deficiency led to a decreased specific IgG₁ response, while IgE production remained similar. Consistent with this result, expression of both IL-21 and its receptor was abrogated in draining lymph nodes from CD16-deficient animals, while IL-4 expression was comparable to that found in WT animals. This contrasts with an asthma model where production of both isotypes was decreased (43). This discrepancy might be due to our less Th2-prone experimental setting, to the different pathology (AD vs asthma) and/or to a different genetic background (C57BL6 vs Balb/c).

Among FcR γ -associated receptors, Fc ϵ RI and CD16 were *a priori* the likeliest to be involved in the regulation of AD, hence our study. Indeed, the only other 2 FcR γ -associated receptors are Fc γ RI/CD64 and Fc γ RIV, which are mainly expressed on macrophages and preferentially bind IgG_{2a} and IgG_{2b} (44), 2 Th1-associated isotypes. In our model, OVA-specific IgG_{2a} and IgG_{2b} were not detected. Fc γ RIV has also been reported to bind IgE^b, found in C57BL6 but not in Balb/c mice, with an even lower affinity than CD16 (7). Due to this cell distribution and isotype specificity, it is thus unlikely, but can not be completely ruled out, that either of these receptors plays a major role in AD physiopathology.

In conclusion, the present study delineates for the first time a differential but partially overlapping role of Fc ϵ RI and CD16 in AD physiopathology, where the contribution of IgG immune complexes was documented but poorly understood (46). Even if considerable differences exist between mouse and humans regarding identity, structure, cell distribution and/or isotype specificity of Fc γ R and Fc ϵ RI, we might nevertheless speculate that the partial inhibition obtained by targeting only IgE/Fc ϵ RI interactions, using anti-IgE, in asthma (47) or atopic skin reactions (48), might be due to a significant contribution of CD16 or other Fc γ R to the pathology. Thus, a therapy preventing both IgE/Fc ϵ RI and IgG/Fc γ R interactions might represent a further improvement over the current ones.

References

1. Leung, D. Y., M. Boguniewicz, M. D. Howell, I. Nomura, and Q. A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113:651-657.
2. Sicherer, S. H., and D. Y. Leung. 2007. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects. *J Allergy Clin Immunol* 119:1462-1469.
3. Larche, M., C. A. Akdis, and R. Valenta. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6:761-771.
4. Kraft, S., and J. P. Kinet. 2007. New developments in FcepsilonRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 7:365-378.
5. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2008. Fcgamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:34-47.
6. Gould, H. J., and B. J. Sutton. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8:205-217.
7. Hirano, M., R. S. Davis, W. D. Fine, S. Nakamura, K. Shimizu, H. Yagi, K. Kato, R. P. Stephan, and M. D. Cooper. 2007. IgEb immune complexes activate macrophages through FcgammaRIV binding. *Nat Immunol* 8:762-771.
8. Hasegawa, M., C. Nishiyama, M. Nishiyama, Y. Akizawa, K. Mitsuishi, T. Ito, H. Kawada, S. Furukawa, C. Ra, K. Okumura, and H. Ogawa. 2003. A novel -66T/C polymorphism in Fc epsilon RI alpha-chain promoter affecting the transcription activity: possible relationship to allergic diseases. *J Immunol* 171:1927-1933.
9. Morar, N., S. A. Willis-Owen, M. F. Moffatt, and W. O. Cookson. 2006. The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 118:24-34; quiz 35-26.
10. Zeyrek, D., R. Tanac, S. Altinoz, A. Berdeli, F. Gulen, H. Koksoy, and E. Demir. 2008. FcgammaRIIa-V/F 158 polymorphism in Turkish children with asthma bronchiale and allergic rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 19:20-24.

11. Novak, N., C. Tepel, S. Koch, K. Brix, T. Bieber, and S. Kraft. 2003. Evidence for a differential expression of the FcepsilonRIgamma chain in dendritic cells of atopic and nonatopic donors. *J Clin Invest* 111:1047-1056.
12. Katoh, N., S. Kraft, J. H. Wessendorf, and T. Bieber. 2000. The high-affinity IgE receptor (FcepsilonRI) blocks apoptosis in normal human monocytes. *J Clin Invest* 105:183-190.
13. Kiekens, R. C., T. Thepen, I. C. Bihari, E. F. Knol, J. G. Van De Winkel, and C. A. Bruijnzeel-Koomen. 2000. Expression of Fc receptors for IgG during acute and chronic cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 142:1106-1113.
14. Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
15. Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J. V. Ravetch. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* 76:519-529.
16. Hazenbos, W. L., J. E. Gessner, F. M. Hofhuis, H. Kuipers, D. Meyer, I. A. Heijnen, R. E. Schmidt, M. Sandor, P. J. Capel, M. Daeron, J. G. van de Winkel, and J. S. Verbeek. 1996. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 5:181-188.
17. Murphy, K. M., A. B. Heimberger, and D. Y. Loh. 1990. Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250:1720-1723.
18. Dombrowicz, D., V. Flamand, K. K. Brigman, B. H. Koller, and J. P. Kinet. 1993. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75:969-976.

19. Spergel, J. M., E. Mizoguchi, J. P. Brewer, T. R. Martin, A. K. Bhan, and R. S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101:1614-1622.
20. Staumont-Salle, D., G. Abboud, C. Brenuchon, A. Kanda, T. Roumier, C. Lavogiez, S. Fleury, P. Remy, J. P. Papin, J. Bertrand-Michel, F. Terce, B. Staels, E. Delaporte, M. Capron, and D. Dombrowicz. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*.
21. Chirgwin, J. M., A. E. Przybyla, R. J. MacDonald, and W. J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
22. Angeli, V., D. Staumont, A. S. Charbonnier, H. Hammad, P. Gosset, M. Pichavant, B. N. Lambrecht, M. Capron, D. Dombrowicz, and F. Trottein. 2004. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 172:3822-3829.
23. Schmitz, J., A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T. K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D. M. Gorman, J. F. Bazan, and R. A. Kastelein. 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23:479-490.
24. Komai-Koma, M., D. Xu, Y. Li, A. N. McKenzie, I. B. McInnes, and F. Y. Liew. 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37:2779-2786.
25. Spolski, R., and W. J. Leonard. 2007. Interleukin-21: Basic Biology and Implications for Cancer and Autoimmunity. *Annu Rev Immunol*.

26. Samsom, J. N., L. A. van Berkel, J. M. van Helvoort, W. W. Unger, W. Jansen, T. Thepen, R. E. Mebius, S. S. Verbeek, and G. Kraal. 2005. Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J Immunol* 174:5279-5287.
27. Lu, L. F., E. F. Lind, D. C. Gondek, K. A. Bennett, M. W. Gleeson, K. Pino-Lagos, Z. A. Scott, A. J. Coyle, J. L. Reed, J. Van Snick, T. B. Strom, X. X. Zheng, and R. J. Noelle. 2006. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature* 442:997-1002.
28. Malbec, O., and M. Daeron. 2007. The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation. *Immunol Rev* 217:206-221.
29. Grimaldeston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai, and S. J. Galli. 2007. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* 8:1095-1104.
30. Hamano, Y., H. Arase, H. Saisho, and T. Saito. 2000. Immune complex and Fc receptor-mediated augmentation of antigen presentation for in vivo Th cell responses. *J Immunol* 164:6113-6119.
31. Kitamura, K., K. Takeda, T. Koya, N. Miyahara, T. Kodama, A. Dakhama, T. Takai, A. Hirano, M. Tanimoto, M. Harada, and E. W. Gelfand. 2007. Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 178:480-488.
32. Yu, M., M. Tsai, S. Y. Tam, C. Jones, J. Zehnder, and S. J. Galli. 2006. Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *J Clin Invest* 116:1633-1641.
33. Dombrowicz, D., V. Flamand, I. Miyajima, J. V. Ravetch, S. J. Galli, and J. P. Kinet. 1997. Absence of Fc epsilonRII alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between

Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains.

J Clin Invest 99:915-925.

34. Mayr, S. I., R. I. Zuberi, M. Zhang, J. de Sousa-Hitzler, K. Ngo, Y. Kuwabara, L. Yu, W. P. Fung-Leung, and F. T. Liu. 2002. IgE-dependent mast cell activation potentiates airway responses in murine asthma models. *J Immunol* 169:2061-2068.
35. Taube, C., X. Wei, C. H. Swasey, A. Joetham, S. Zarini, T. Lively, K. Takeda, J. Loader, N. Miyahara, T. Kodama, L. D. Shultz, D. D. Donaldson, E. H. Hamelmann, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Mast cells, Fc epsilon RI, and IL-13 are required for development of airway hyperresponsiveness after aerosolized allergen exposure in the absence of adjuvant. *J Immunol* 172:6398-6406.
36. Mukai, K., K. Matsuoka, C. Taya, H. Suzuki, H. Yokozeki, K. Nishioka, K. Hirokawa, M. Etori, M. Yamashita, T. Kubota, Y. Minegishi, H. Yonekawa, and H. Karasuyama. 2005. Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* 23:191-202.
37. Obata, K., K. Mukai, Y. Tsujimura, K. Ishiwata, Y. Kawano, Y. Minegishi, N. Watanabe, and H. Karasuyama. 2007. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* 110:913-920.
38. Jawdat, D. M., E. J. Albert, G. Rowden, I. D. Haidl, and J. S. Marshall. 2004. IgE-mediated mast cell activation induces Langerhans cell migration in vivo. *J Immunol* 173:5275-5282.
39. Kitaura, J., T. Kinoshita, M. Matsumoto, S. Chung, Y. Kawakami, M. Leitges, D. Wu, C. A. Lowell, and T. Kawakami. 2005. IgE- and IgE+Ag-mediated mast cell migration in an autocrine/paracrine fashion. *Blood* 105:3222-3229.
40. Metz, M., M. A. Grimaldeston, S. Nakae, A. M. Piliponsky, M. Tsai, and S. J. Galli. 2007. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 217:304-328.

41. Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
42. He, R., M. K. Oyoshi, H. Jin, and R. S. Geha. 2007. Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15817-15822.
43. Bandukwala, H. S., B. S. Clay, J. Tong, P. D. Mody, J. L. Cannon, R. A. Shilling, J. S. Verbeek, J. V. Weinstock, J. Solway, and A. I. Sperling. 2007. Signaling through Fc gamma RIII is required for optimal T helper type (Th)2 responses and Th2-mediated airway inflammation. *J Exp Med* 204:1875-1889.
44. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2005. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* 310:1510-1512.
45. Tsujimura, Y., K. Obata, K. Mukai, H. Shindou, M. Yoshida, H. Nishikado, Y. Kawano, Y. Minegishi, T. Shimizu, and H. Karasuyama. 2008. Basophils Play a Pivotal Role in Immunoglobulin-G-Mediated but Not Immunoglobulin-E-Mediated Systemic Anaphylaxis. *Immunity*.
46. Chapman, M. D., S. Rowntree, E. B. Mitchell, M. C. Di Prisco de Fuenmajor, and T. A. Platts-Mills. 1983. Quantitative assessments of IgG and IgE antibodies to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 72:27-33.
47. Avila, P. C. 2007. Does anti-IgE therapy help in asthma? Efficacy and controversies. *Annu Rev Med* 58:185-203.
48. Ong, Y. E., A. Menzies-Gow, J. Barkans, F. Benyahia, T. T. Ou, S. Ying, and A. B. Kay. 2005. Anti-IgE (omalizumab) inhibits late-phase reactions and inflammatory cells after repeat skin allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 116:558-564.

Footnotes:

1. This work was supported by a grant from Inserm (-French- National Institute of Health and Medical Research).
2. Abbreviations: AD: atopic dermatitis

Legends

FIGURE 1. Decreased skin inflammation in FcR $\gamma^{-/-}$, Fc ϵ RI $^{-/-}$ and CD16 $^{-/-}$ mice in a model of AD. *A*, MGG staining of skin sections from OVA-sensitized mice or PBS-treated mice FcR $\gamma^{-/-}$, Fc ϵ RI $^{-/-}$ and CD16 $^{-/-}$ mice and their corresponding WT counterparts (original magnification X 100). Epidermal thickness (*B*), mast cell (*C*), eosinophil (*D*), APC (*E*), and CD4 $^{+}$ T cells (*F*) density in dermis at the site of sensitization. Data presented are from 1 out of 3 independent experiments (n= 4-9 animals per group) and are expressed as mean \pm SEM. * Statistically different from PBS-treated mice (p<0.05). \\$ Statistically different from OVA-sensitized WT mice (p<0.05).

FIGURE 2. Differential decrease skin cytokines, chemokines and receptors expression in FcR $\gamma^{-/-}$ (*A*), Fc ϵ RI $^{-/-}$ (*B*) and CD16 $^{-/-}$ mice (*C*) compared to their WT counterparts in a model of AD. Results were expressed as the mean fold induction compared with the mean expression level in PBS-treated corresponding WT mice. Data presented are from 1 out of 3 independent experiments (n= 4-9 animals per group) and are expressed as mean \pm SEM.. * Statistically different from PBS-treated mice (p<0.05). \\$ Statistically different from OVA-sensitized WT mice (p<0.05).

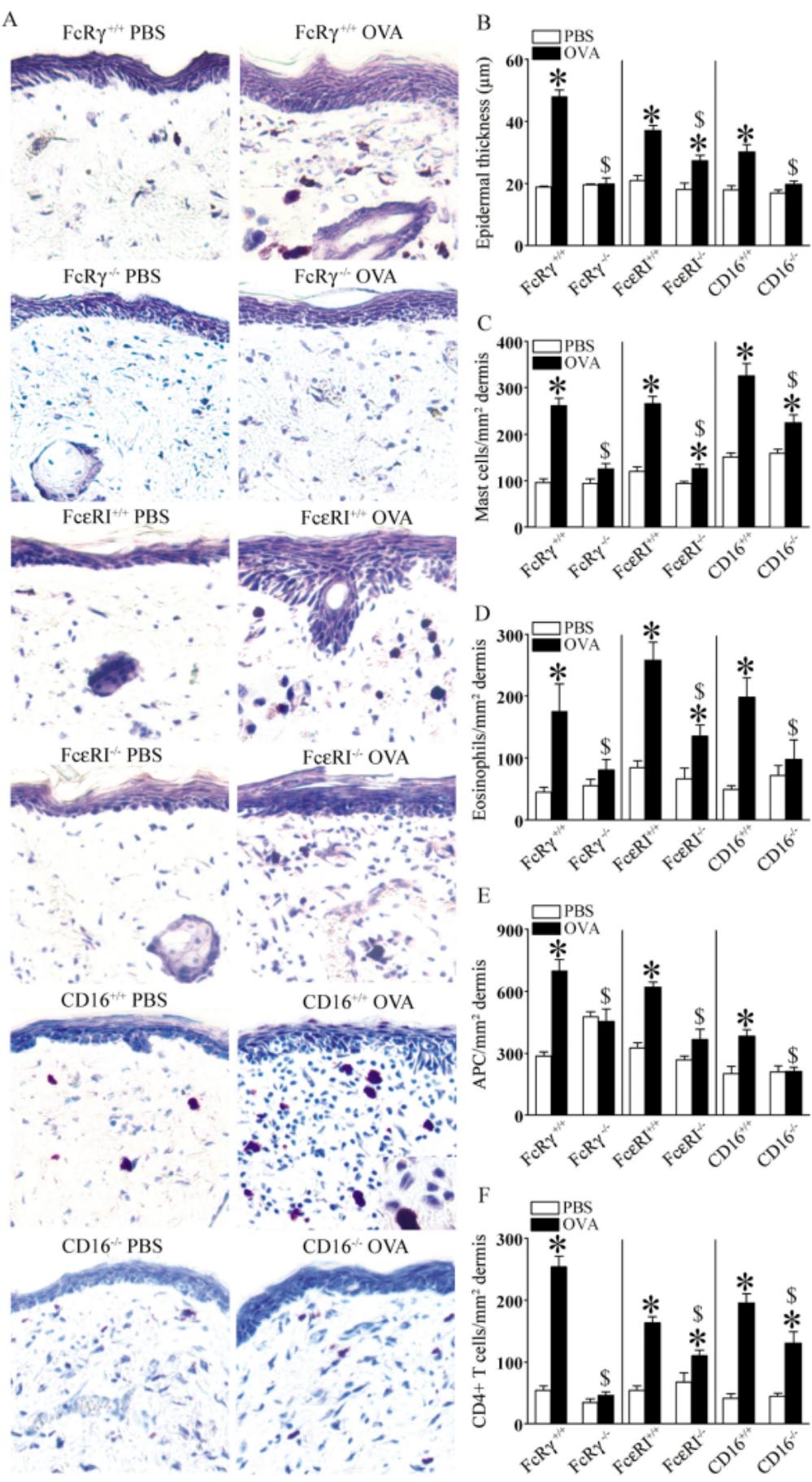
FIGURE 3. Differentially decreased humoral response and lymph node cytokine expression in FcR $\gamma^{-/-}$, Fc ϵ RI $^{-/-}$ and CD16 $^{-/-}$ mice in a model of AD. *A*, Total IgE serum concentrations. *B*, OVA-specific IgE serum concentration. *C*, OVA-specific IgG₁ serum concentration. *D-F* Expression of IL-4, IFN- γ , IL-21 and IL-21R in inguinal lymph nodes from FcR $\gamma^{-/-}$ (*D*), Fc ϵ RI $^{-/-}$ (*E*) and CD16 $^{-/-}$ mice (*F*) compared to their WT counterparts. Data presented are from 1 out of 3 independent experiments (n= 4-9 animals per group) and are expressed as mean \pm SEM. *

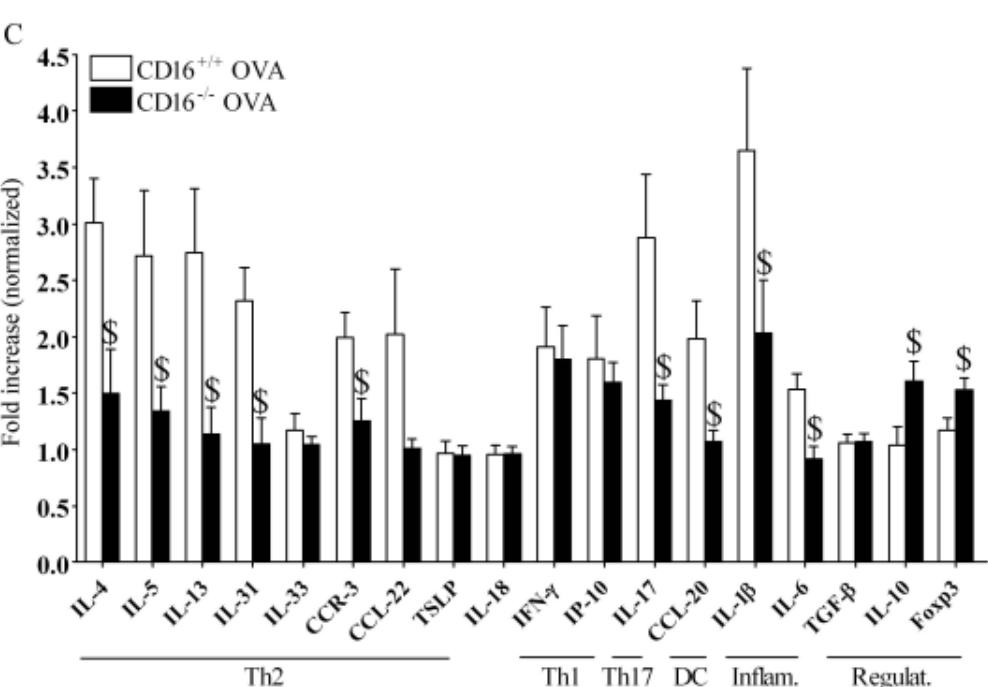
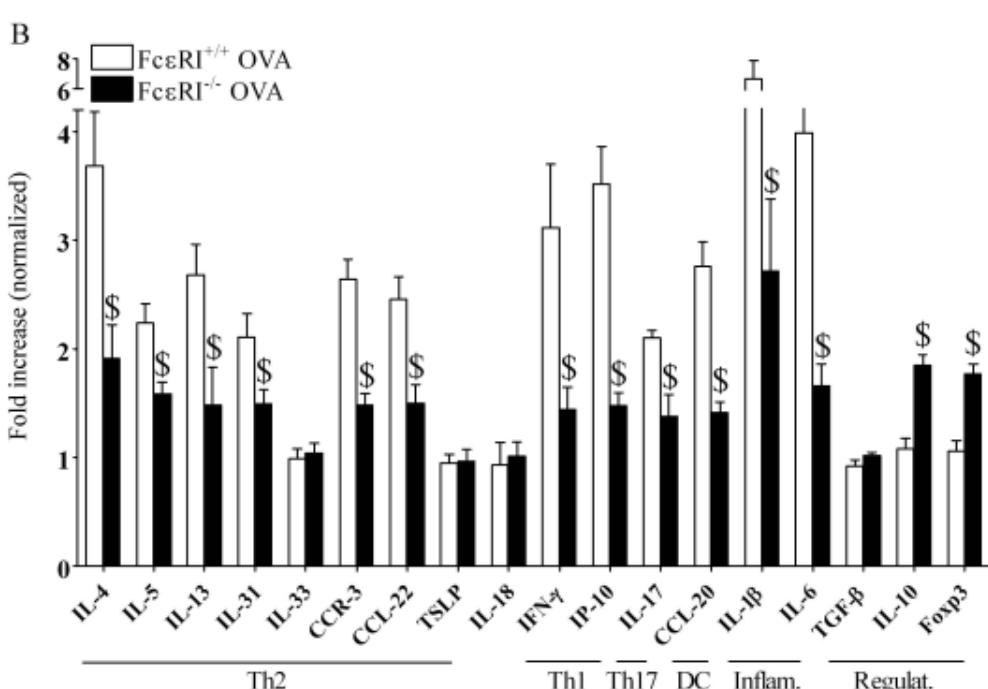
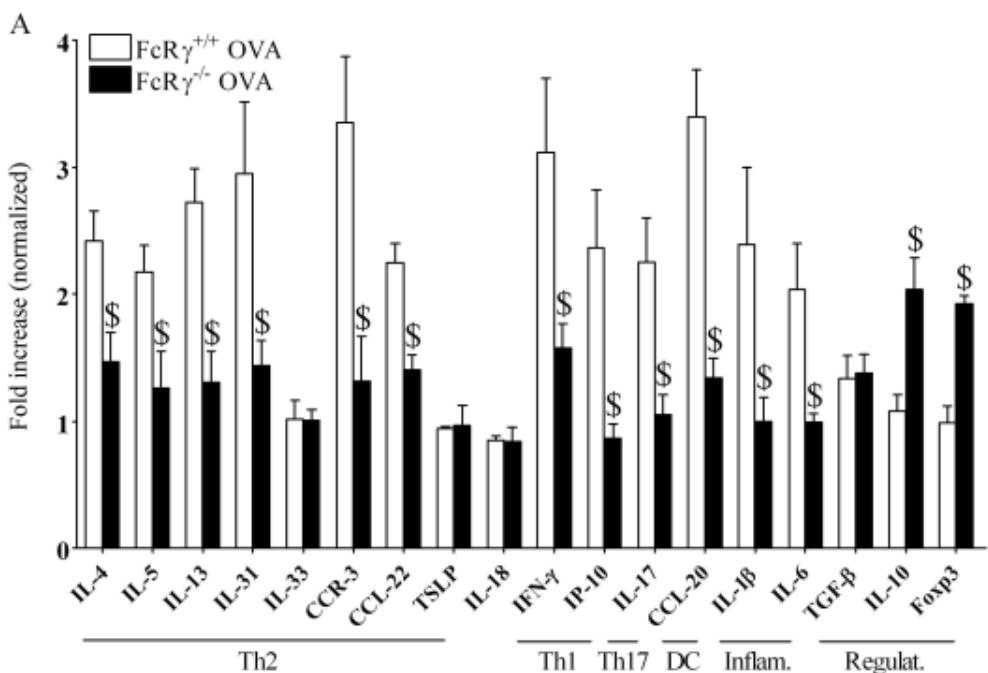
Statistically different from PBS-treated mice ($p<0.05$). \$ Statistically different from WT mice ($p<0.05$).

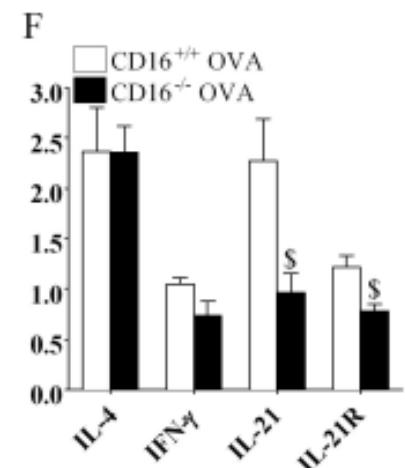
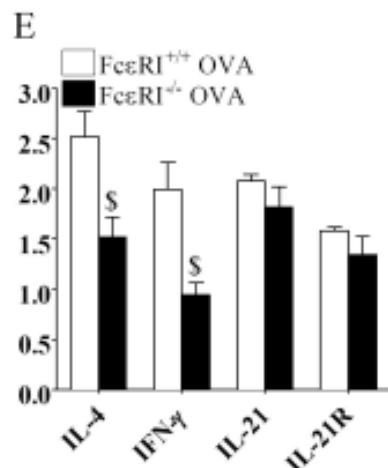
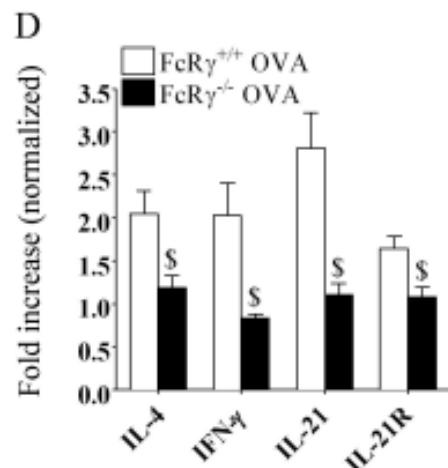
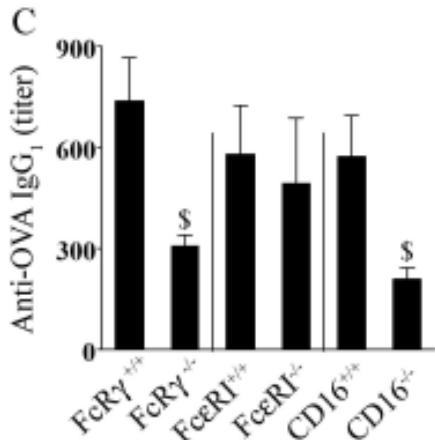
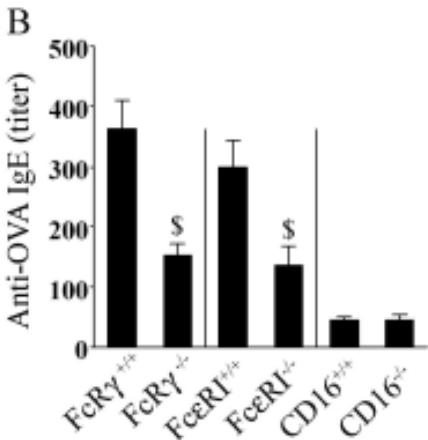
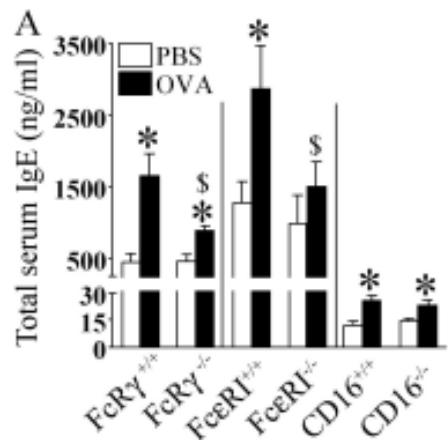
FIGURE 4. Decreased antigen-induced T cell proliferation in $\text{FcR}\gamma^{/-}$ and $\text{CD}16^{/-}$ but not $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{/-}$ mice in a model of AD. *A-B.* Flow cytometry analysis of $\text{CFSE}^+ \text{KJI-26}^+ \text{CD}4^+$ (*A*) or $\text{CFSE}^+ \text{V}\alpha 2^+ \text{V}\beta 5^+ \text{CD}4^+$ (*B*) T cells from inguinal lymph nodes from $\text{FcR}\gamma^{/-}$ (*A*), $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{/-}$ (*A*) $\text{CD}16^{/-}$ (*B*) mice and their WT counterparts. Dividing cell populations are squared. *C*, Total number of dividing $\text{CFSE}^+ \text{CD}4^+$ T cells in inguinal lymph nodes. ($n= 3-6$ animals per group) and are expressed as mean \pm SEM.. * Statistically different from PBS-treated mice ($p<0.05$). \$ Statistically different from WT mice ($p<0.05$).

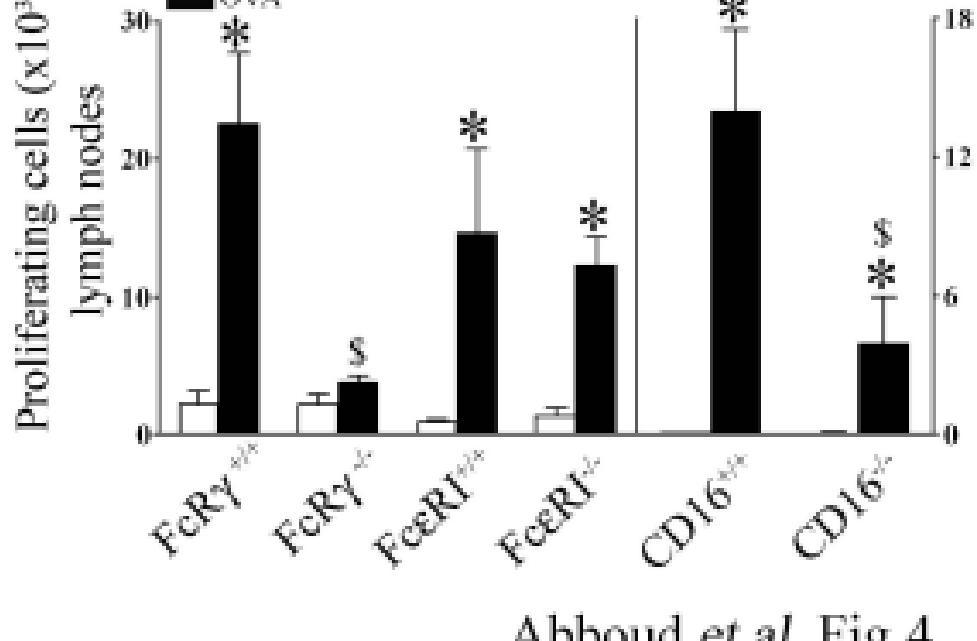
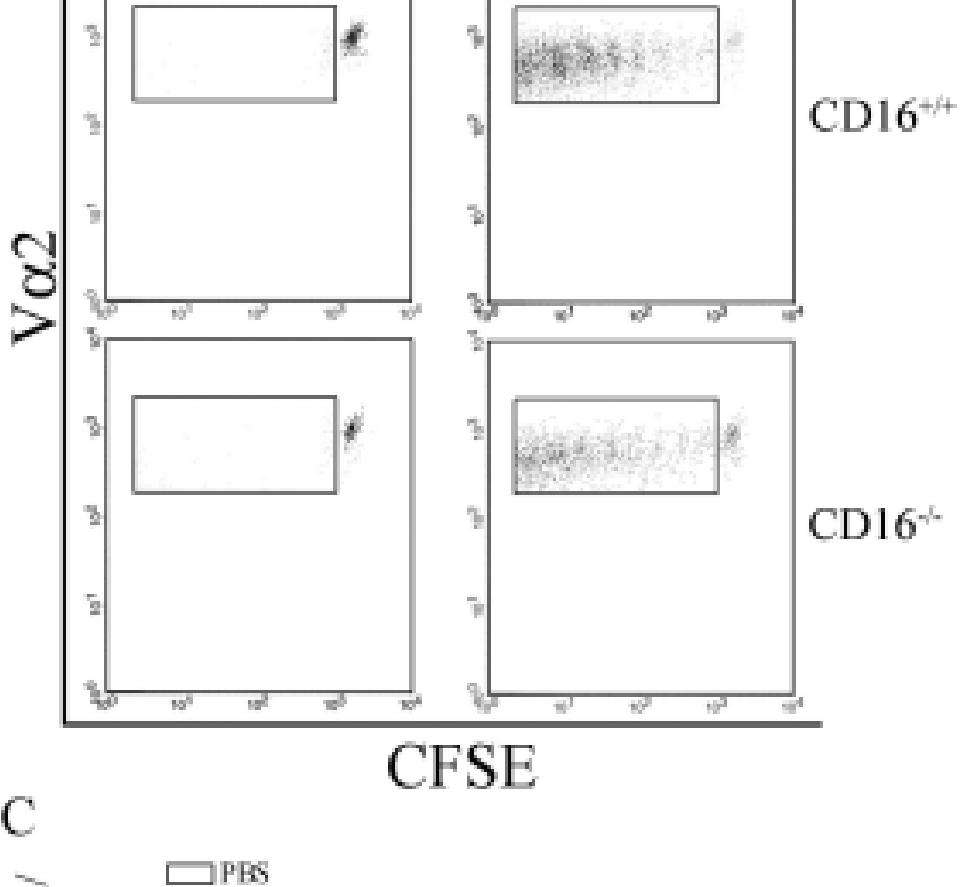
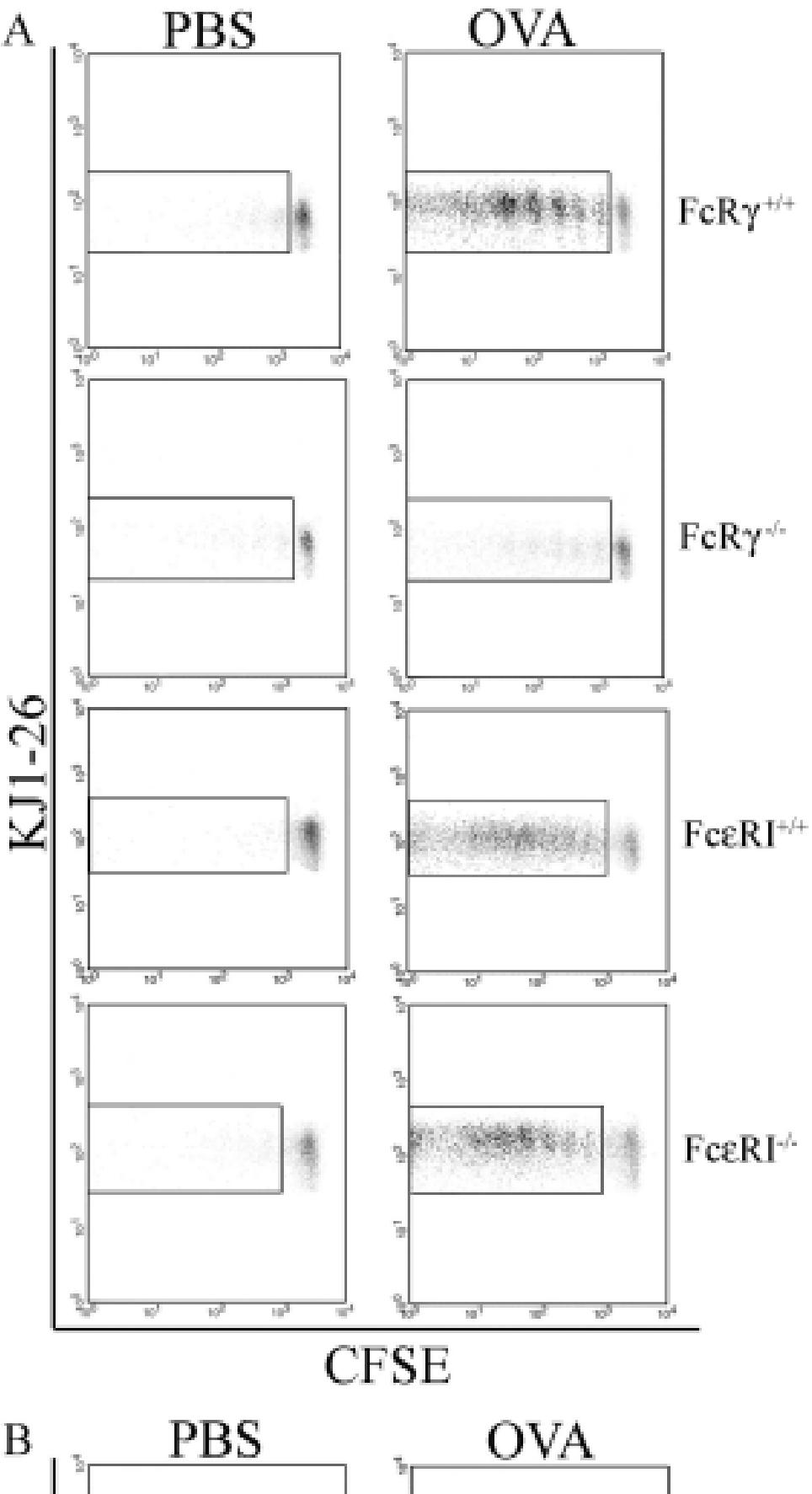
FIGURE 5. Decreased mast cell number in inguinal lymph nodes of $\text{FcR}\gamma^{/-}$ and $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^{/-}$ but not in $\text{CD}16^{/-}$ mice in a model of AD. Mast cell density in draining lymph nodes. Data presented are from 1 out of 3 independent experiments ($n= 3-7$ animals per group) and are expressed as mean \pm SEM. * Statistically different from PBS-treated mice ($p<0.05$). \$ Statistically different from OVA-sensitized WT mice ($p<0.05$).

FIGURE 6. Decreased lung inflammation and airway hyperresponsiveness in $\text{FcR}\gamma^{/-}$ and $\text{CD}16^{/-}$ mice in a model of AD. *A.* Whole body plethysmography in $\text{FcR}\gamma^{/-}$ mice and their WT counterparts. *B-C* Cellularity in BAL from $\text{FcR}\gamma^{/-}$ (*B*) and $\text{CD}16^{/-}$ (*C*) mice and their WT counterparts. ($n= 3-6$ animals per group). * Statistically different from PBS-treated mice ($p<0.05$). \$ Statistically different from OVA-sensitized WT mice ($p<0.05$).

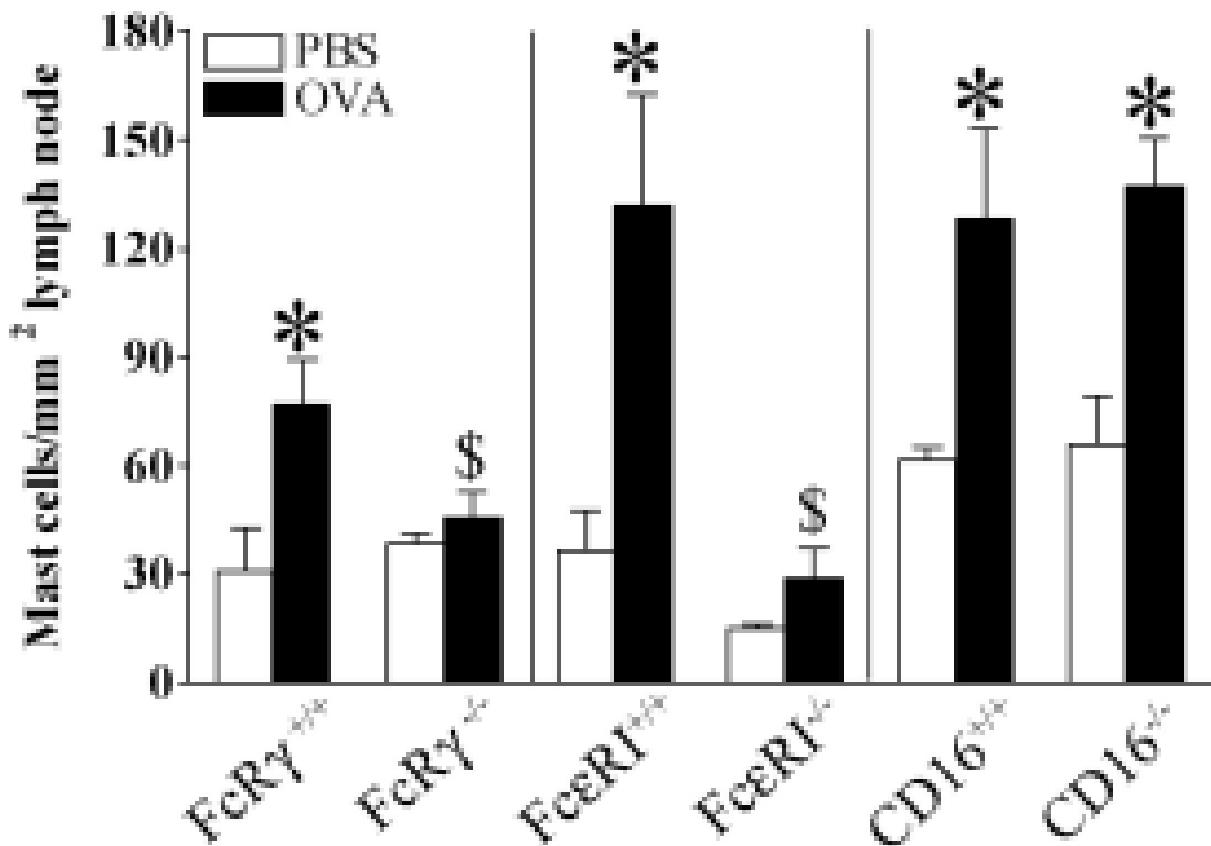




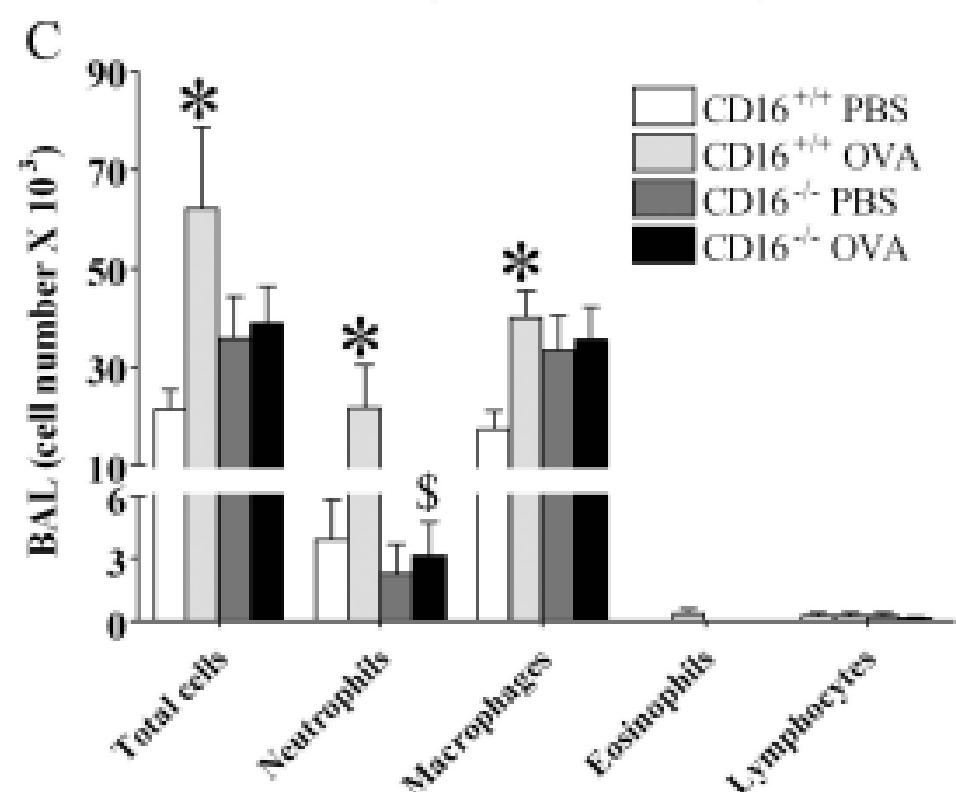
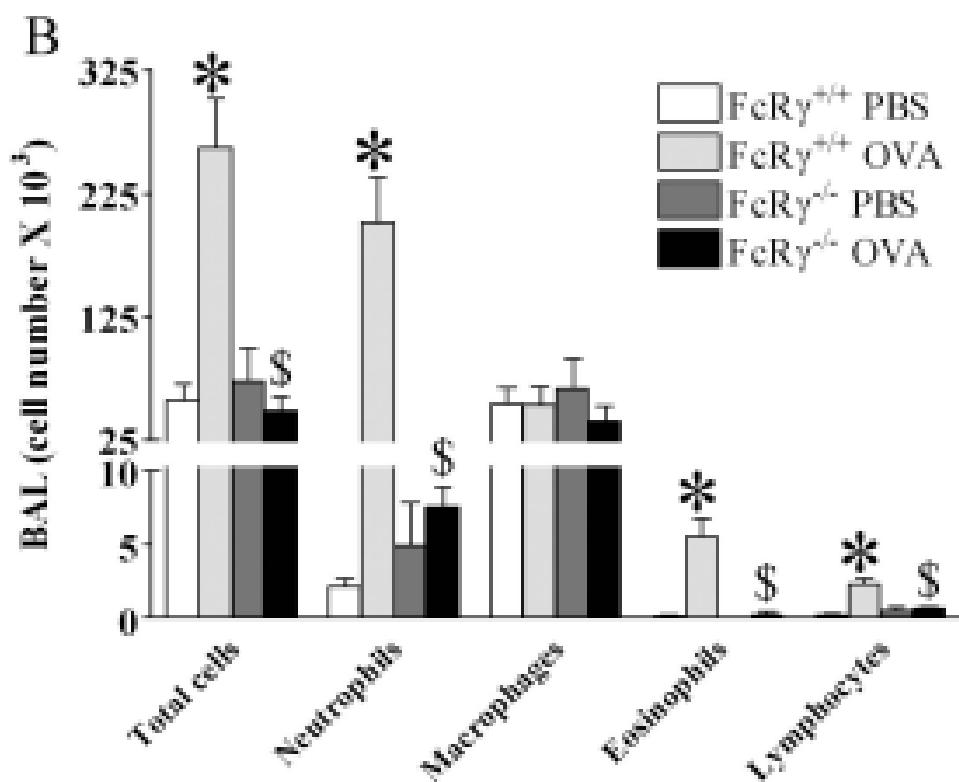
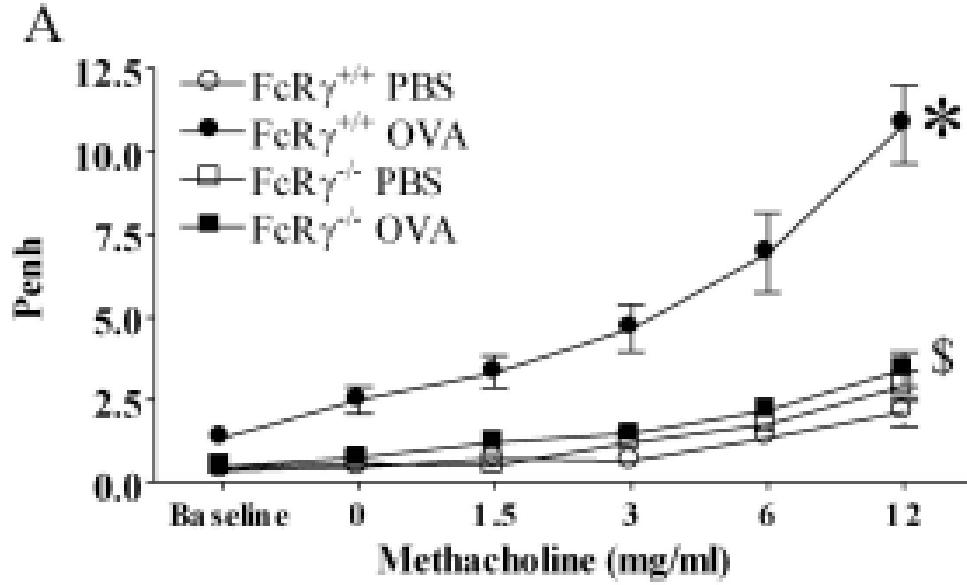




Abboud et al. Fig. 4



Abboud et al. Fig.5



Abboud et al. Fig 6

Table I. Primers used for real-time PCR.

Gene	Primer	Size	Sequence
GAPDH	For	20	5' CGT CCC GTA GAC AAA ATG GT 3'
	Rev	20	5' GAA TTT GCC GTG AGT GGA GT 3'
IL-1 β	For	20	5' AGG TGC TCA TGT CCT CAT CC 3'
	Rev	20	5' CAG GCA GGC AGT ATC ACT CA 3'
IL-4	For	20	5' GCA TGG AGT TTT CCC ATG TT 3'
	Rev	20	5' AGA TGG ATG TGC CAA ACG TC 3'
IL-5	For	22	5' CTC ACC GAG CTC TGT TGA CAA G 3'
	Rev	22	5' GAA CTC TTG CAG GTA ATC CAG G 3'
IL-6	For	20	5' CCA CGG CCT TCC CTA CTT CA 3'
	Rev	22	5' CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G 3'
IL-10	For	21	5' TTC ATG GCC TTG TAG ACA CCT 3'
	Rev	20	5' TGA ATT CCC TGG GTG AGA AG 3'
IL-13	For	20	5' GGA ATC CAG GGC TAC ACA GA 3'
	Rev	20	5' AGG AGC TGA GCA ACA TCA CA 3'
IL-17	For	22	5' AAG TCT TTA ACT CCC TTG GCG C 3'
	Rev	19	5' AGG GTC TTC ATT GCG GTG G 3'
IL-18	For	21	5' GGA ATC AGA CAA CTT TGG CCG 3'
	Rev	22	5' CCT CGA ACA CAG GCT GTC TTT T 3'
IL-21	For	20	5' AGG AGG GGA GGA AAG AAA CA 3'
	Rev	20	5' GGG AAT CTT CTC GGA TCC TC 3'
IL-21Receptor	For	20	5' ACA GCG GGA ACT TCA AGA AA 3'
	Rev	20	5' CAG GCT CAG ACA TTC CAT CA 3'
IL-31	For	20	5' CAG CTG TTT CAA CCC ACT GA 3'
	Rev	20	5' CAG TTC TGC CAT GCA GTT TG 3'
IL-33	For	19	5' ATC AGG CGA CGG TGT GGA T 3'
	Rev	21	5' GAC GTC ACC CCT TTG AAG CTC 3'
IFN- γ	For	20	5' ACC CTG TCG TAT GCT GGG AA 3'
	Rev	21	5' GTT GGT GCA GGA ATC AGT CCA 3'
TSLP	For	19	5' TAT CCC TGG CTG CCC TTC A 3'
	Rev	21	5' TGT GCC ATT TCC TGA GTA CCG 3'
CCL20	For	20	5' CTT GCT TTG GCA TGG GTA CT 3'
	Rev	20	5' CTT CAT CGG CCA TCT GTC TT 3'
CCL22/MDC	For	20	5' TGG TGC CAA TGT GGA AGA CA 3'
	Rev	21	5' GGC AGG ATT TTG AGG TCC AGA 3'
CXCL10/IP-10	For	19	5' ACC CAA GTG CTG CCG TCA T 3'
	Rev	20	5' CAT TCT CAC TGG CCC GTC AT 3'
CCR3	For	20	5' TGA CCC CAG CTC TTT GAT TC 3'
	Rev	24	5' CTG GAC TCA TAA AGG ACT TAG CAA 3'
TGF- β	For	21	5' TAC TCT GGA GAC GGT TTG CCA 3'
	Rev	20	5' CAT GAA GAA AGT CTC GCC CG 3'
Foxp3	For	21	5' CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT 3'
	Rev	18	5' TTC TCA CAA GGC CAC TTG 3'

Peroxisome proliferator-activated receptor α regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis

Delphine Staumont-Sallé, MD,^{a,b,c,d*} Georges Abboud, BSc,^{a,b,c*} Céline Brénuchon, MD,^{a,b,c} Akira Kanda, MD, PhD,^{a,b,c} Thomas Roumier, PhD,^{a,b,c} Céline Lavogiez, MD,^{a,b,c,d} Sébastien Fleury,^{a,b,c} Patrick Rémy,^{a,b,c} Jean-Paul Papin,^{a,b,c} Justine Bertrand-Michel,^{e,f} François Tercé, PhD,^{e,f,g} Bart Staels, PhD,^{b,c,h} Emmanuel Delaporte, MD,^{c,d} Monique Capron, PhD,^{a,b,c} and David Dombrowicz, PhD^{a,b,c} Lille and Toulouse, France

Background: The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) α , β/δ , and γ are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily. In addition to their regulatory role on lipid and glucose metabolism, they exert anti-inflammatory properties. In skin both PPAR- α and PPAR- β/δ regulate keratinocyte proliferation/differentiation and contribute to wound healing. The 3 PPAR isoforms are expressed by several cell types recruited into the dermis during inflammation.

Objective: We have investigated the role of PPAR- α in the regulation of atopic dermatitis (AD), a common skin inflammatory disease.

Methods: We chose a mouse model of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD and used epicutaneous sensitization with ovalbumin in the absence of adjuvant, which mimics the human pathology.

Results: On antigen sensitization, PPAR- α -deficient mice display increased epidermal thickening, dermal recruitment of inflammatory cells, lung inflammation, airway hyperresponsiveness, and IgE and IgG2a production compared with their wild-type counterparts. Increased inflammation was correlated to an enhancement of T_H2 and, to a greater extent, T_H1 responses and to increased skin expression of nuclear factor κ B. Interestingly, PPAR- α expression was decreased in eczematous skin from patients with AD compared with skin from nonatopic donors, suggesting that defective PPAR- α expression might contribute to the pathology. Topical application of WY14643, a specific PPAR- α agonist, significantly decreased antigen-induced skin inflammation in the AD model.

Conclusion: PPAR- α acts as a negative regulator of skin inflammation in AD. (J Allergy Clin Immunol 2008;121: 962-8.)

Key words: Peroxisome proliferator-activated receptor α , atopic dermatitis, allergy, inflammation, human, mouse

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor superfamily. The PPAR family consists of 3 members, PPAR- α , PPAR- β/δ and PPAR- γ ,^{1,2} which are activated by various fatty acid metabolites produced during inflammatory responses. Furthermore, PPARs also inhibit the activity of other transcription factors, which play a key role in proinflammatory signaling pathways, such as nuclear factor κ B (NF- κ B),³ through ligand-dependent transrepression.⁴ PPARs function as sensors and regulators of inflammatory reactions through their ability to be activated by locally generated eicosanoids and act in a gene- and signal-specific manner.⁵ Indeed, PPARs are expressed by several cell types within the immune system, such as T lymphocytes,^{6,7} B lymphocytes,⁸ monocytes-macrophages,⁹ dendritic cells,¹⁰ mast cells,¹¹ and eosinophils.¹² *In vivo*, PPAR- α -deficient mice display prolonged leukotriene (LT) B₄-induced ear swelling,¹³ absence of regulation of spontaneous production of proinflammatory cytokines on aging,¹⁴ exacerbated response of aortic explants to proinflammatory stimuli, increased allergic asthma and IgE production,¹² and exacerbated experimental autoimmune encephalomyelitis.⁶ The 3 PPAR isoforms have been identified in rodent and human epidermis and dermis during fetal development. Their expression decreases rapidly after birth to become undetectable in the interfollicular epidermis in adults, although it persists in the hair follicles.¹⁵ Several recent studies have demonstrated an important role for PPAR- α in the molecular mechanisms involved in skin repair^{15,16} and in epidermal differentiation contributing to permeability barrier formation.¹⁷ The combination of the properties of PPAR- α in immune responses and epidermal differentiation led us to investigate whether PPAR- α might exert a beneficial role in atopic dermatitis (AD), a skin inflammatory disease characterized, like psoriasis, by disturbed epidermal homeostasis. AD is a common, chronic, pruritic inflammatory skin disease that often begins in infancy and frequently occurs in subjects with a personal or family history of atopic disease. Examination of skin lesions in AD reveals increased epidermal thickness (acanthosis) and an inflammatory cell infiltrate in the dermis, consisting of activated memory CD4⁺ T cells, macrophages, mast cells, and eosinophils. In acute AD lesions there is a preferential recruitment of T_H2 cells, whereas in the chronic lesions a T_H1 profile is predominant, with an accumulation of IFN- γ -producing T_H1 cells. Most patients with AD have increased levels of serum IgE, with specific IgE directed against

From ^aInserm U547, Lille; ^bInstitut Pasteur de Lille; ^cUniversité Lille 2; ^dthe Department of Dermatology, Claude Huriez Hospital, Lille; ^eIFR30, Plateau technique de Lipidomique; ^fUniversité Toulouse III, Toulouse; ^gInserm U363, Toulouse; and ^hInserm U545, Lille.

*These authors contributed equally to this work.

Supported by grants from Inserm, Université Lille 2 and Institut Pasteur de Lille and by a fellowship (to D.S.) from Inserm.

Disclosure of potential conflict of interest: D. Dombrowicz has received research support from Inserm, Université Lille 2, Institut Pasteur de Lille, ANR, FRM, the European Union, and Region Nord-Pas de Calais. M. Capron has received research support from Inserm, Université Lille 2, and Institut Pasteur de Lille. The rest of the authors have declared that they have no conflict of interest.

Received for publication July 15, 2007; revised December 20, 2007; accepted for publication December 20, 2007.

Available online February 13, 2008.

Reprint requests: David Dombrowicz, PhD, Inserm U547, Institut Pasteur de Lille 1, rue Prof Calmette BP245, 59019 Lille Cedex, France. E-mail: david.dombrowicz@pasteur-lille.fr.

0091-6749/\$34.00

© 2008 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology

doi:10.1016/j.jaci.2007.12.1165

Abbreviations used

AD:	Atopic dermatitis
AHR:	Airway hyperresponsiveness
BAL:	Bronchoalveolar lavage
NF- κ B:	Nuclear factor κ B
OVA:	Ovalbumin
Penh:	Enhanced pause
PPAR:	Peroxisome proliferator-activated receptor
TEWL:	Transepidermal water loss
TSLP:	Thymic stromal lymphopoietin
WT:	Wild-type

environmental allergens or microbial proteins (*Staphylococcus aureus*).¹⁸ Moreover, a high proportion of individuals with AD have allergic asthma, rhinitis, or both later in life.

METHODS

Patients

Skin biopsy specimens were taken after obtaining informed consent in involved areas from 8 patients (5 male and 3 female patients; average age, 25.2 years) with severe AD, according to the criteria defined by Hanifin and Rajka,¹⁹ and from 6 male nonatopic healthy individuals (average age, 30.7 years) characterized by the absence of personal or familial history of atopic disease and normal IgE serum levels. Patients received neither any topical treatment with immunosuppressive effects for at least 15 days before the collection of skin samples nor systemic treatment for at least 1 month before biopsy. Only male control subjects were selected to avoid “inaesthetic” scar in female individuals. Specimens were immediately frozen in dry ice to isolate total RNA.

Induction of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD and ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness

AD was induced by epicutaneous sensitization with ovalbumin (OVA), as previously described.²⁰ Two paper-disc inserts of a Finn Chamber (Promedica, La Chaussée Saint-Victor, France) soaked with 25 μ L of 0.2% OVA solution in PBS or with vehicle were applied on abdominal skin 24 hours after shaving. Patches were secured to the skin with a bio-occlusive dressing (Visulin; Hartmann, Châtenoi, France), itself protected with an elastic bandage (Optiplaste; Smith & Nephew, Vibraye, France). Patches were left on for three 1-week periods (with patch renewal at midweek), with a 2-week interval between applications. For BALB/c mice, abdomens were topically treated immediately before patch application with 25 μ L of the 50 μ mol/L PPAR- α agonist WY14.643 (stock 10⁻² in dimethyl sulfoxide; Alexis Biochemicals, Coger, France) in acetone/olive oil (4:1 vol/vol), whereas the corresponding untreated mice were receiving an equivalent volume of dimethyl sulfoxide. For PPAR- $\alpha^{-/-}$ and 129S1/SVImJ mice, at the time of the last patch removal (day 49), animals were challenged for 20 minutes by means of aerosol nebulization with OVA (1% in PBS) by using an ultrasonic nebulizer (Systam, Villeneuve sur Lot, France), and serum was collected. On the next day, airway hyperresponsiveness (AHR) to increasing concentrations of methacholine was measured by means of whole-body plethysmography (Emka Technologies, Paris, France); results were expressed as enhanced pause (Penh) values.²¹ Animals were killed by means of cervical dislocation. Lungs were used for bronchoalveolar lavage (BAL). BAL specimens were analyzed on cytopsin preparations after RAL 555 staining. Skin samples were collected for histologic analyses and real-time PCR after RNA extraction.

Analysis of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD and OVA-induced AHR

For more information, see the Methods section in the Online Repository at www.jacionline.org.

Statistical analysis

Statistical significance was determined with the Statview software by using the Student test, except for plethysmographic data, for which ANOVA for repeated measures was used, and Q-PCR analysis, for which the Mann-Whitney test was applied. Results were expressed as means \pm SEMs. A *P* value of less than .05 was considered significant.

RESULTS

PPAR- α -deficient mice exhibit exacerbated skin inflammatory response in a model of AD

We first assessed the effect of PPAR- α deficiency on skin inflammatory responses by comparing cutaneous responses obtained in wild-type (WT) 129S1/SVImJ and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice in a previously described model of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD based on antigen sensitization by means of repeated epicutaneous OVA applications. Neither strain exhibited an inflammatory phenotype in the absence of OVA sensitization. Compared with OVA-sensitized WT mice, OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice displayed an exacerbated skin inflammatory response, which was characterized by more pronounced hyperkeratosis, spongiosis, and dermal cellular infiltrates (Fig 1, A), and a 1.8-fold (45%) increase in epidermal thickening (Fig 1, B). Likewise, PPAR- α deficiency increased the number of mast cells and CD4 $^{+}$ T cells into the dermis. By contrast, eosinophil infiltration in OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice was not statistically different from the recruitment observed in their WT counterparts (Fig 1, C). These results demonstrate that the absence of PPAR- α exacerbates skin lesions observed in AD.

Exacerbated inflammation in OVA-sensitized PPAR- α -deficient mice is not due to a barrier defect

Because, in addition to immune dysregulation, alterations in the epidermal barrier might contribute to AD development, we analyzed structural parameters of the epidermis. On Nile red staining, the neutral lipid layer appeared similarly discontinuous in both PBS- and OVA-sensitized WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice (see Fig E1, A, in the Online Repository at www.jacionline.org). Likewise, transepidermal water loss (TEWL) was comparable in the 4 experimental groups and significantly higher than in skin from corresponding naive WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals (see Fig E1, B). Finally, except for free fatty acids and ceramide 2, which were increased by 22% and 16% in PBS-treated PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice, skin lipid composition was also similar for both genotypes after the complete sensitization process (see Fig E1, C). Taken together, these data suggest that the exacerbated responses of PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals on OVA sensitization, compared with those in WT animals, are due to a lack of immunoregulation rather than to major structural differences between the 2 genotypes.

PPAR- α deficiency increases expression of both T_H2- and T_H1-related molecules in OVA-sensitized mouse skin

We next examined, by means of real-time PCR, the expression of mRNAs for T_H2- and T_H1-associated molecules in the skin of unsensitized and OVA-sensitized WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice. OVA sensitization increased mRNA expression of both T_H2- and T_H1-

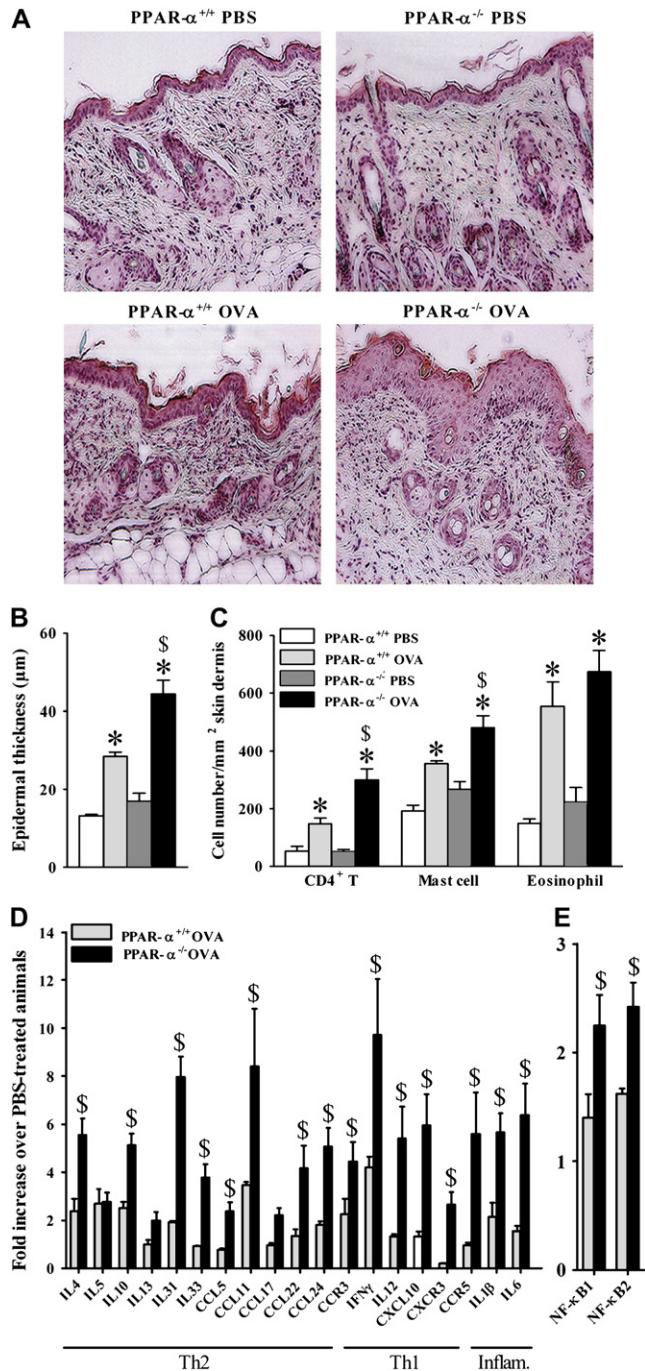


FIG 1. Increased skin inflammation in PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice in a model of AD. **A**, Hematoxylin and eosin staining of skin sections from OVA-sensitized mice or PBS-treated PPAR- $\alpha^{-/-}$ or WT mice (original magnification $\times 100$). **B**, Epidermal thickness. **C**, Eosinophil, mast cell, and T-lymphocyte numbers in dermis at the site of sensitization and treatment ($n = 6-10$ animals per group). Data are expressed as means \pm SEMs. *Statistically different from PBS-treated mice ($P < .05$). \$, Statistically different from WT mice ($P < .05$). **D**, Skin cytokine, chemokine, and receptor expression. **E**, Skin NF- κ B 1 and 2 expression. Primers used are listed in Table E1 in the Online Repository at www.jacionline.org. Results for OVA-sensitized animals are expressed as a fold increase compared with the identically responding PBS-treated animals ($n = 3-6$ animals per group). \$, Statistically different from OVA-sensitized WT mice ($P < .05$).

associated molecules in both genotypes (Fig 1, D). In skin from OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice compared with skin from OVA-sensitized WT animals, we detected a more pronounced increase in several T_H2-associated molecules (IL-4, 2.3-fold; IL-10, 2-fold; IL-31, 4.1-fold; IL-33, 4-fold; CCL5, 3-fold; CCL11, 2.4-fold; CCL24, 2.3-fold; and CCR3, 2-fold) that contribute to eosinophil chemotaxis and CCL22 (or macrophage-derived chemokine), a chemoattractant for T_H2 lymphocytes into the inflammatory skin (3.1-fold). IL-5 mRNA expression was increased after OVA epicutaneous sensitization to the same extent in PPAR- $\alpha^{-/-}$ and WT animals. By contrast, after OVA sensitization, expression of 2 other molecules associated with skin inflammation, IL-18 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP), which activates bone marrow-derived dendritic cells to produce T_H2-attracting chemokines, as well as expression of immunoregulatory TGF- β , remained unchanged in both WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice (data not shown). Expression of T_H1 cytokines and chemokines was also markedly increased in the skin of OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice compared with that seen in OVA-treated WT mice: IFN- γ (2.3-fold); IL-12 (4.1-fold), a cytokine that contributes to the switch of an early T_H2 response to a late T_H1 response; CXC chemokine ligand (CXCL) 10 and its receptor CXCR3 (4.4- and 12.7-fold, respectively); and CCR5 (5.7-fold).

Skin expression of NF- κ B and inflammatory cytokines is increased in OVA-sensitized PPAR- α -deficient mice

In addition to immunoregulatory cytokines, we also found that expression of the proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-6 was also increased (2.6- and 4.5-fold, respectively) in the skin of OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice compared with that seen in the skin of OVA-treated WT mice. NF- κ B is both essential to the development of inflammatory responses and a key target of PPAR- α regulation²²; we thus analyzed skin expression of NF- κ B 1 and 2. We found that NF- κ B 1 and 2 expression in unsensitized animals was not different in WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice. By contrast, OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals exhibited a significantly increased expression of both NF- κ B 1 and 2 in lesional skin compared with their WT counterparts, suggesting that PPAR- α could negatively regulate the skin inflammatory responses by inhibiting the NF- κ B proinflammatory pathway (Fig 1, E).

PPAR- α deficiency leads to increased lung inflammation in a model of AD

In atop individuals the same allergen can induce both skin and airway allergic inflammation. This model of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD closely mimics this pathologic situation. Indeed, after epicutaneous sensitization, a single antigen nebulization leads to airway inflammation and hyperreactivity (AHR). Although PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice did not exhibit an inflammatory phenotype in the skin in the absence of epicutaneous sensitization with OVA, they had a significantly higher AHR to methacholine, with a 2-fold higher response (for 6 mg/mL methacholine) compared with that of their WT counterparts. Furthermore, OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice displayed higher Penh values in response to methacholine compared with WT mice, with a 1.8-fold higher Penh value for 3 and 6 mg/mL methacholine (Fig 2, A). After airway challenge, overall inflammatory infiltrate in the BAL specimens of PBS-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$

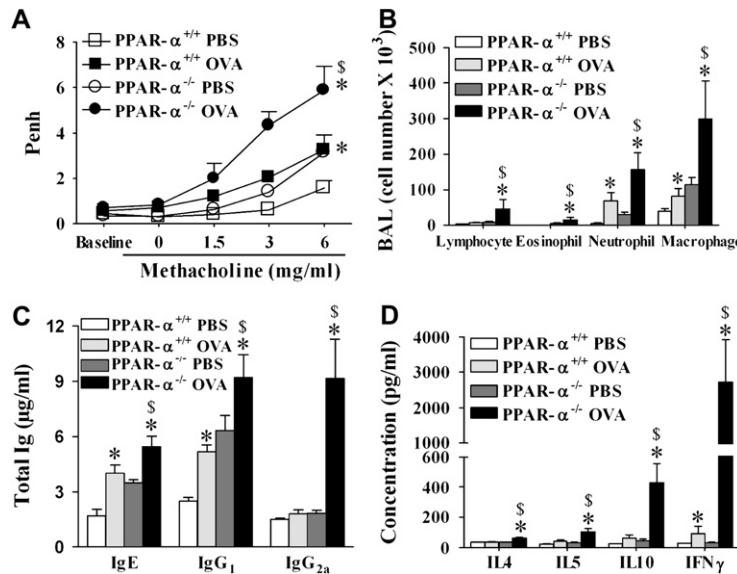


FIG 2. Increased lung inflammation and humoral response in PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice in a model of AD. **A**, Measurement of AHR to increasing methacholine concentrations by means of whole-body plethysmography. **B**, Total number of macrophages, neutrophils, lymphocytes, and eosinophils in BAL fluid at the time of death ($n = 3-6$ animals per group). **C**, Total IgE, IgG1, and IgG2a serum concentrations. **D**, OVA-induced cytokine production by inguinal lymph nodes *in vitro* ($n = 6-10$ animals per group). *Statistically different from PBS-treated mice ($P < .05$). \$, Statistically different from WT mice ($P < .05$).

animals was 3.3-fold higher compared with that of WT animals (data not shown). This infiltrate was predominantly composed of neutrophils and macrophages. OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice displayed a total cell recruitment increased by 54% compared with that seen in OVA-sensitized WT mice (data not shown). Neutrophils, macrophages, lymphocytes, and eosinophils were 2.2-, 3.6-, 7.4-, and 8.3-fold more abundant, respectively (Fig 2, B).

PPAR- α deficiency increases both T_H2 and T_H1 humoral and cellular responses in a mouse model of AD

Serum levels of IgE and IgG1, both associated to a T_H2 response, were increased in OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice compared with those in OVA-sensitized WT animals, with a 1.5- and 2.3-fold increase for total IgE and OVA-specific IgE levels, respectively, and a 1.9- and 2.1-fold increase for total and OVA-specific IgG1 levels, respectively. IgG2a antibodies, associated to a T_H1 response, were also increased in OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice compared with levels seen in their WT counterparts, with a 4.4- and a 7.2-fold higher response for total and OVA-specific IgG2a, respectively (Fig 2, C, and see Fig E2, A, in the Online Repository at www.jacionline.org). Even if both T_H2 and T_H1 humoral responses were exacerbated, increase of the T_H1 response was more pronounced in PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice on antigen sensitization. Indeed, the increase of total and OVA-specific IgG2a levels in PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals was about 3-fold higher than the increase of total and OVA-specific T_H2 antibodies. Furthermore, only PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals displayed an increased humoral T_H1 response after allergen sensitization (Figs 2, C, and E2, A). Finally, the level of T_H2 antibodies was significantly higher in control PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice than in control WT animals (Figs 2, C,

and E2, A). Likewise, a similarly exacerbated cellular response (T_H2 and, to an even greater extent, T_H1 cytokine production) was observed on *in vitro* OVA restimulation of inguinal lymph node cells (Fig 2, D) from PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals compared with corresponding cells from WT mice. Splenocyte restimulation only led to an exacerbated T_H1 (but not T_H2) response (Fig E2, B).

PPAR- α expression is significantly decreased in the lesional skin of patients with AD

We aimed at correlating the data observed in PPAR- α -deficient mice with the status of individuals with AD. PPAR- α and PPAR- β/δ mRNA expression was studied in the lesional skin of patients with atopic eczema and compared with that seen in the skin of nonatopic healthy age-matched individuals. Interestingly, we observed a markedly decreased expression of PPAR- α in eczematous skin of patients with AD (approximately 50% lower than in control individuals, Fig 3), whereas PPAR- β/δ mRNA expression was not significantly different in skin samples from atopics and nonatopics individuals (Fig 3).

PPAR- α agonist WY14643 reduces skin inflammatory response in a model of AD

We investigated whether PPAR- α could represent a therapeutic target in AD by using a treatment with a PPAR- α agonist: WY14643. For this purpose, WY14643 was topically applied during the sensitization phases. BALB/c background was chosen because OVA sensitization induces a more pronounced pathology than on the 129 SV background. In vehicle-treated OVA-sensitized mice histopathologic analysis revealed typical lesions of eczema characterized by hyperkeratosis with

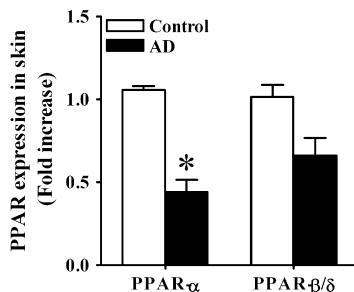


FIG 3. Decreased expression of PPAR- α in lesional skin from patients with AD. RNA was extracted from skin biopsy specimens of nontreated patients with AD ($n = 8$) and nonatopic healthy individuals ($n = 6$). Real-time PCR analysis of PPAR- α and PPAR- β/δ expression was conducted by using the primers shown in Table E1. \$, Statistically different from control individuals ($P < .05$).

desquamation and spongiosis, which were absent in unsensitized mice (Fig 4, A). Compared with unsensitized mice, epidermal thickness at the inflammatory site was increased 1.5-fold in vehicle-treated sensitized mice. Topical treatment with WY14643 did not affect the skin's histologic aspect in unsensitized mice. In WY14643-treated OVA-sensitized mice histologic lesions of eczema were significantly less pronounced (49% inhibition) than in vehicle-treated OVA-sensitized mice (Fig 4, B). Histologic analysis also revealed that this effect was accompanied by reduced dermal CD4 $^{+}$ T cells and mast cell and eosinophil infiltration in WY14643-treated mice (95%, 68%, and 32% reduction, respectively; Fig 4, C). In this experimental model WY14643 treatment did not affect the neutral lipid layer (Fig E1, A) and TEWL (Fig E1, B), but in OVA-sensitized animals it did modify skin lipid composition, with decreases in free fatty acids and ceramide 2, 3, and 6 content (by 27%, 34%, 34%, and 41%, respectively; Fig E1, C). Furthermore, topical WY14643 treatment also reduced lung inflammation, in particular eosinophil and neutrophil recruitment, induced on OVA sensitization (Fig E3). These data show that topical treatment with WY14643 exerts a significant inhibitory effect on skin and airway inflammatory symptoms induced by OVA sensitization.

WY14643 reduces skin expression of proinflammatory, Th1, and Th2 cytokines and chemokines and lung cellular inflammation

WY14643 treatment also suppressed local Th2 and Th1 cytokine expression, as well as that from inflammation-associated cytokines (Fig 4, D) and transcription factors (Fig 4, E). Inhibition was most effective for IL-1 β (93%), IL-31 (87%), and IL-4 (80%) and weaker for IFN- γ (57%), CCL11 (47%), and NF- κ B 1 and 2 (38% and 36%, respectively). No inhibition was observed for IL-5 expression.

Topical WY14643 treatment does not affect humoral and cellular responses

By contrast, WY14643 affected neither the humoral response (OVA-specific IgE or IgG1 production) induced on epicutaneous sensitization (Fig E2, E) nor the cellular response from inguinal lymph node cells or splenocytes *in vitro* (except for a slight

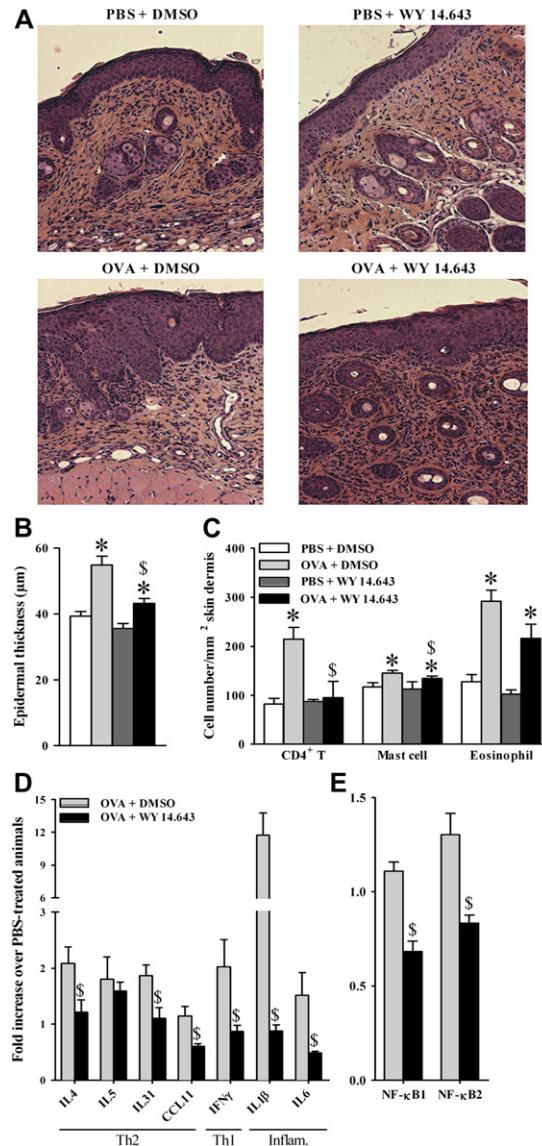


FIG 4. Improvement of skin lesions in a model of AD after topical treatment with the PPAR- α agonist WY14643. **A**, Hematoxylin and eosin staining of skin sections from OVA-sensitized or PBS-treated mice treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or WY14643 (original magnification $\times 200$). **B**, Epidermal thickness. **C**, CD4 T-cell, eosinophil, and mast cell numbers in dermis at the site of sensitization and treatment. **D**, Skin cytokine, chemo-kine, and receptor expression. Primers used are listed in Table E1. **E**, Skin NF- κ B 1 and 2 expression ($n = 6-10$ animals per group). *, Statistically different from PBS-treated mice ($P < .05$). \$, Statistically different from DMSO-treated mice ($P < .05$).

decrease in IL-5 production after OVA restimulation of splenocytes; Fig E2, C and D). Thus the systemic effects of topical WY14643 appear to be limited.

DISCUSSION

In this article we demonstrate for the first time the anti-inflammatory role of PPAR- α in a murine model of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD. In this model development of the pathology was dependent on the immune response induced on epicutaneous OVA sensitization but

independent of barrier alterations induced by repeated patch changes/removal. Absence of PPAR- α led to exacerbated skin inflammation, with increased epidermal thickness; dermal recruitment of CD4 $^+$ T cells, mast cells, and eosinophils; and inflammatory cytokine production, as well as increased AHR in response to methacholine provocation and cellular infiltration in lung tissue on antigen airway challenge. These exacerbated functional and cellular responses were associated with both skin, cellular, and humoral T_H1 and T_H2 responses in OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals, as found in human AD, where chronic lesions are characterized by a switch from a T_H2 toward a T_H1 cytokine profile.¹⁸ Comparative study of T_H1 and T_H2 immunoglobulin isotypes suggested that naive PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice were biased toward a T_H2 polarization but developed a particularly strong T_H1 response on allergen sensitization. PPAR- α might modulate T_H1/T_H2 balance through its ability to negatively regulate T-bet transcription factor, which is essential for T_H1 polarization²³ and its T_H2 counterpart, GATA-3.¹² However, we did not find a significant difference in skin eosinophil recruitment and IL-5 mRNA expression between OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals and their WT counterparts. By contrast, exacerbation of lung inflammation observed in OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice is associated to an effect of PPAR- α on bronchial recruitment of eosinophils, as previously described in a classical asthma model.^{12,24} These differences between skin and lung compartments might be due to the fact that eosinophils can be recruited at an early stage of skin pathology, and differences might disappear in the chronic stage at the time of death, whereas BAL eosinophilia was observed only 24 hours after a single airway challenge. Likewise, in our model OVA sensitization did not induce skin expression of TSLP (data not shown), which is in contrast to another model of genetically induced AD triggered by a rapid and strong enhancement of expression of TSLP in retinoid X receptor-ablated keratinocytes.²⁵ *In vitro* studies have shown that human TSLP activates dendritic cells, which induce T_H2 differentiation, as well as CD4 $^+$ T-cell proliferation.²⁶ Again, in an AD model TSLP might have exerted its role at an earlier phase of the disease. Next, we investigated the mechanisms by which PPAR- α can exert its anti-inflammatory properties in this model of inflammatory dermatosis with immunologic features of AD. We found that the exacerbated skin inflammatory response observed in PPAR- α -deficient animals was not dependent on a lack of Foxp3 expression by CD4 $^+$ CD25 $^+$ regulatory T cells (data not shown) or on the production of immunoregulatory cytokines, such as TGF- β (data not shown), but might be linked to an inhibition of the proinflammatory NF- κ B pathway by PPAR- α . Indeed, we detected increased mRNA expression for NF- κ B 1 and 2 transcription factors in the skin of OVA-sensitized PPAR- α -deficient animals compared with that seen in their WT counterparts. It has been demonstrated that PPAR- α agonists can exert their anti-inflammatory effects by antagonizing the NF- κ B pathway, leading to an attenuated transcription of genes encoding inflammatory cytokines.²⁷ PPAR- α ligands act at several levels along the signaling cascade upstream of NF- κ B, such as on I κ B, or through transrepression.^{3,28} We next investigated whether a lack of PPAR- α expression could contribute to the skin inflammatory status in patients with AD and found a 50% decrease in PPAR- α expression in eczematous skin of patients with AD compared with that seen in control individuals, whereas mRNA expression of the β/δ isoform was not significantly

different from that seen in nonatopic patients. To our knowledge, only one recent publication provided indirect information concerning the expression level of PPAR- α in human AD skin. Indeed, Plager et al²⁹ used microarrays to identify cutaneous gene transcription changes associated with early AD inflammation and found a differential expression for genes associated with PPAR- α -regulated transcription. Nevertheless, PPAR- α expression has never been studied in AD skin lesions, regardless of the disease stage. Finally, we confirmed the potent beneficial effect of PPAR- α by demonstrating that topical application with the PPAR- α agonist WY14643 during sensitization phases significantly decreased the skin inflammatory response, with reduced eczematous lesions and dermal eosinophil and mast cell recruitment. Effects of PPAR- α activators on immune response in mice have been described by Cunard et al,³⁰ who showed that oral administration of WY14643 alters the humoral (total IgG and IgG1) and cytokine responses to a defined antigen and also causes profound decrease in splenocyte numbers in both immunized and nonimmunized animals. Nevertheless, the beneficial role of PPAR- α in skin disease might not be only due to its anti-inflammatory properties but also to its role in skin barrier function. In our model involving multiple patch applications and removal, PPAR- α affected neither histologic distribution of neutral lipids nor TEWL. However, it induced minor alterations in skin lipid composition. Nevertheless, recent studies have demonstrated the important role of PPAR- α in skin repair^{15,31} and in epidermal differentiation contributing to barrier formation.¹⁷ Michalik and colleagues^{15,31} observed that skin injury stimulates PPAR- α re-expression in keratinocytes during wound healing. Furthermore, PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice have a transient delay in initial wound healing. Kömüves et al¹⁷ showed that clofibrate, a PPAR- α ligand added to fetal rat skin explants, stimulates epidermal differentiation by activating stratum corneum development and leads to an acceleration of barrier formation. As in our work, Kömüves et al noticed that the skin and in particular the epidermis of PPAR- $\alpha^{-/-}$ animals appeared normal. They only mentioned a thinner stratum granulosum, with granular cells having fewer keratohyalin granules and focal parakeratosis in the stratum corneum. Conversely, Yang et al³² reported that the skin phenotype of transgenic mice constitutively overexpressing PPAR- α in the epidermis was characterized by epidermal thinning and sparse fur, contributing to lethality within 2 days after birth. PPAR- α might transcriptionally regulate epidermal development by interacting with various other transcription factors, such as lymphoid enhancer-binding factor-1 and T-cell factor-3, which have been investigated for their role in the epidermal stem cell niche³³ and with several proteins implicated in the coordination of the keratinocyte cell cycle, such as p21 (Waf1/Cip1), which is increased in cultured keratinocytes from 1-day-old mice overexpressing PPAR- α .³²

In conclusion, the present study provides *in vivo* evidence for the role of PPAR- α in controlling skin and systemic inflammatory responses in patients with AD. These results are pointing in the direction of PPAR- α being an interesting therapeutic target in skin diseases like AD characterized by inflammatory infiltrates and barrier dysfunction. In our study epicutaneously OVA-sensitized PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice represent a new murine model that faithfully mimics human AD by reproducing a natural pathway of skin and lung sensitization against an allergen and by exhibiting both T_H1 and T_H2 immune response.

We thank Josette Fontaine and Bruno Derudas for their technical assistance, Dr Hervé Cotten for his contribution to histologic work, and the members of the Department of Dermatology in Lille for help with patient recruitment and skin biopsies.

Clinical implications: PPAR- α agonists could have potential therapeutic use in AD.

REFERENCES

- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58:726-41.
- Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:44-55.
- Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:571-80.
- Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:926-35.
- Moraes LA, Piqueras L, Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006;110:371-85.
- Dunn SE, Ousman SS, Sobel RA, Zuniga L, Baranzini SE, Youssef S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha expression in T cells mediates gender differences in development of T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 2007;204:321-30.
- Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for regulatory CD4+ T cell-mediated protection against colitis. *J Immunol* 2007;178:2940-9.
- Schlezinger JJ, Jensen BA, Mann KK, Ryu HY, Sherr DH. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated NF-kappa B activation and apoptosis in pre-B cells. *J Immunol* 2002;169:6831-41.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:459-68.
- Angeli V, Hammad H, Staels B, Capron M, Lambrecht BN, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits the migration of dendritic cells: consequences for the immune response. *J Immunol* 2003;170:5295-301.
- Maeyama K, Emi M, Tachibana M. Nuclear receptors as targets for drug development: peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mast cells: its roles in proliferation and differentiation. *J Pharmacol Sci* 2005;97:190-4.
- Woerly G, Honda K, Loyens M, Papin JP, Auwerx J, Staels B, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med* 2003;198:411-21.
- Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:39-43.
- Spencer NF, Poynter ME, Im SY, Daynes RA. Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. *Int Immunopharmacol* 1997;9:1581-8.
- Michalik L, Desvergne B, Tan NS, Basu-Modak S, Escher P, Rieusset J, et al. Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice. *J Cell Biol* 2001;154:799-814.
- Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:991-8.
- Komuves LG, Hanley K, Lefebvre AM, Man MQ, Ng DC, Bickle DD, et al. Stimulation of PPARalpha promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo. *J Invest Dermatol* 2000;115:353-60.
- Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I, Hamid QA. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 2004;113:651-7.
- Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1980;92(suppl):44-7.
- Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK, Geha RS. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 1998;101:1614-22.
- Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, et al. Non-invasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:766-75.
- Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999;274:32048-54.
- Tripp RA, Dakhamma A, Jones LP, Barskey A, Gelfand EW, Anderson LJ. The G glycoprotein of respiratory syncytial virus depresses respiratory rates through the CX3C motif and substance P. *J Virol* 2003;77:6580-4.
- Trifilieff A, Bench A, Hanley M, Bayley D, Campbell E, Whittaker P. PPAR-alpha and -gamma but not -delta agonists inhibit airway inflammation in a murine model of asthma: in vitro evidence for an NF-kappaB-independent effect. *Br J Pharmacol* 2003;139:163-71.
- Li M, Messadeq N, Teletin M, Pasquali JL, Metzger D, Chambon P. Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14795-800.
- Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 2004;5:426-34.
- Vanden Berghe W, Vermeulen L, Delerive P, De Bosscher K, Staels B, Haegeman G. A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR. *Adv Exp Med Biol* 2003;544:181-96.
- Bailey ST, Ghosh S. "PPAR"ing ways with inflammation. *Nat Immunol* 2005;6:966-7.
- Plager DA, Leontovich AA, Henke SA, Davis MD, McEvoy MT, Sciallis GF 2nd, et al. Early cutaneous gene transcription changes in adult atopic dermatitis and potential clinical implications. *Exp Dermatol* 2007;16:28-36.
- Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J Immunol* 2002;168:2795-802.
- Tan NS, Michalik L, Noy N, Yasmin R, Pacot C, Heim M, et al. Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation. *Genes Dev* 2001;15:3263-77.
- Yang Q, Yamada A, Kimura S, Peters JM, Gonzalez FJ. Alterations in skin and stratified epithelia by constitutively activated PPARalpha. *J Invest Dermatol* 2006;126:374-85.
- Nguyen H, Rendl M, Fuchs E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin. *Cell* 2006;127:171-83.

METHODS

Animals

BALB/cJ and 129S1/SVImJ mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). PPAR- α -deficient mice were obtained from Dr F. J. Gonzalez (National Institutes of Health, Bethesda, Md).^{E1} Eight-to 12-week-old female mice were used for all experiments. Animals were bred within the specific pathogen-free facility from the Institut Pasteur de Lille. Experiments were performed after approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation from the Nord-Pas-de-Calais Region.

TEWL

TEWL was measured with a Tewameter TM300 (Courage and Khazaka, Köln, Germany) on the abdominal skin of naive animals and at the treated abdominal sites at the time of and 24 hours after the last patch removal, according to the manufacturer's instructions.

Skin lipid analysis

Ceramides, cholesterol, and fatty acids from skin were analyzed by means of high-performance thin layer chromatography. Skin samples were crushed twice in 1.5 mL of methanol/5 mmol/L ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (2:1 vol/vol) by using a Fast Prep (MP Biochemicals, Illkirch, France). Aliquots were removed and evaporated, and the dry pellets were dissolved in 0.5 mL of NaOH (0.1 mol/L) overnight. Proteins were measured with the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Lipid extraction was performed with a dounce after addition of 1 mL of chloroform and further completed in chloroform/methanol/water (2.5:2.5:2.1, vol/vol/vol), according to the method of Bligh and Dyer.^{E2} The lipid (chloroform) phase was evaporated to dryness, dissolved in 20 μ L of chloroform/methanol (1:1, vol/vol), and applied on a TLC Silica Gel 60 plate (Merck, Fontenay-sous-Bois, France). Chromatograms were developed twice in chloroform/methanol/acetic acid (190:9:1, vol/vol/vol) to 17 cm and then in hexane/diethyl-ether/formic acid (55:45:1, vol/vol/vol) to the top of the plate. After drying, the chromatogram was spayed with 10% (wt/vol) cupric sulphate hydrate in 8% (wt/vol) phosphoric acid and charred by heating at 110°C for 24 hours. A digitized image was captured, and quantification (ImageJ 1.38x) of lipid fractions was based on known quantities of the following standards analyzed on the same plate: cholesterol and nonadecanoic acid (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), ceramide 2 (nonhydroxy ceramide), ceramide 3 (phytosphinganine), and ceramide 5 (hydroxy ceramide; Matreya-LLC, Marne la Vallée, France).

Histology and immunohistochemistry

Tissue biopsy specimens were fixed in 4% buffered formalin and embedded in paraffin for general histology, fixed in a formaldehyde-free zinc fixative (ImmunoHistoFix, Intertiles, Brussels, Belgium), and embedded in Immuno-HistoWax (Intertiles) for immunohistochemistry, as previously described.^{E3} Serial paraffin-embedded sections of 5- μ m thickness were stained with hematoxylin and eosin and acidic toluidine blue for measurement of epidermal thickness and eosinophil and mast cells counts. Epidermal thickness was determined at 250-fold magnification with an ocular micrometer; an average of 10 measures was calculated for each sample. Eosinophils and mast cells were enumerated by using an eyepiece equipped with a calibrated grid by examining 20 random fields at 1000-fold magnification; results were expressed as cells per square millimeter. For immunohistochemical analysis, 5- μ m sections were dewaxed in acetone for 5 minutes and immunostained with anti-CD4 mAb (BD Biosciences PharMingen, Le Pont de Claix, France), as previously described.^{E3}

Nile red staining

Frozen sections (10 μ m) were stained for neutral lipids with Nile red. Briefly, staining solution was freshly prepared from stock solution of Nile red (500 μ g/mL; Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) in acetone 1:100 dilution in 75% glycerol, followed by brisk vortexing. After degasing by

means of vacuum to remove bubbles, a drop of solution was added onto the sections and immediately covered with a coverslip. Sections were examined after 5 minutes by means of fluorescence microscopy (450- to 500-nm band pass excitation filter). Neutral lipids stained yellow-gold.

Measurement of immunoglobulin concentrations

Total IgE concentrations were measured in mouse serum by means of ELISA with 2 monoclonal anti-IgE antibodies (BD PharMingen), as previously described.^{E4} Total IgG1 and IgG2a levels were measured in serum with the immunoassay kit SBA Clonotyping System-HRP (Southern Biotech, Birmingham, Ala). Serum anti-OVA IgE levels were measured by means of ELISA with anti-IgE (BD PharMingen) as the capture antibody and biotinylated OVA and horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham Biosciences, Orsay, France) for detection. Serum anti-OVA IgG1 and IgG2a levels were measured by means of ELISA with OVA-coated plates and horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG1 and IgG2a (Southern Biotech). Two-fold serial dilutions were prepared for each serum (starting dilution 1:25 for IgE, 1:5000 for IgG1, and 1:250 for IgG2a titrations). Antibody titers were calculated as the dilution corresponding to twice the mean absorbance value obtained for nonsensitized mouse sera.

Quantitative RT-PCR

RNA extraction from skin biopsy specimens was performed as previously described by Chirgwin et al.^{E5} Reverse transcription was performed with 1 μ g of RNA by using Superscript reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), according to the manufacturer's instructions. cDNAs were amplified by means of PCR in triplicate assays for 40 cycles in SYBR Green PCR Master Mix (Molecular Probes, Europe BV, Leiden, The Netherlands) on an ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Oligonucleotide primers specific for mouse cytokines, chemokines, and their receptors and nuclear transcription factors are listed in Table E1. Primers were used for amplification in triplicate assays. PCR amplification of the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was performed to control for sample loading and to allow normalization between samples. Because mRNA levels in the tissues from PBS-sensitized PPAR- α ^{-/-} animals were identical to those measured in PBS-sensitized WT mice, results for OVA-sensitized animals were expressed as the mean fold induction compared with the mean expression level in PBS-treated mice.

In vitro cytokine production

Spleen and inguinal lymph node cells were isolated at day 50 and restimulated in 96-well plates in triplicate with 10 μ g/mL OVA or PBS. Culture supernatants were harvested 4 days later. T_H1 (IFN- γ) and T_H2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokine production was quantified with a Cytometric Bead Array kit and FCAP Array software (BD PharMingen), according to the manufacturer's instruction.

REFERENCES

- E1. Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, et al. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995;15:3012-22.
- E2. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-7.
- E3. Angeli V, Staumont D, Charbonnier A-S, Hammad H, Gosset P, Pichavant M, et al. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 2004;172:3822-9.
- E4. Dombrowicz D, Flaman V, Miyajima I, Ravetch JV, Galli SJ, Kinet JP. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 1997;99:915-25.
- E5. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979;18:5294-9.

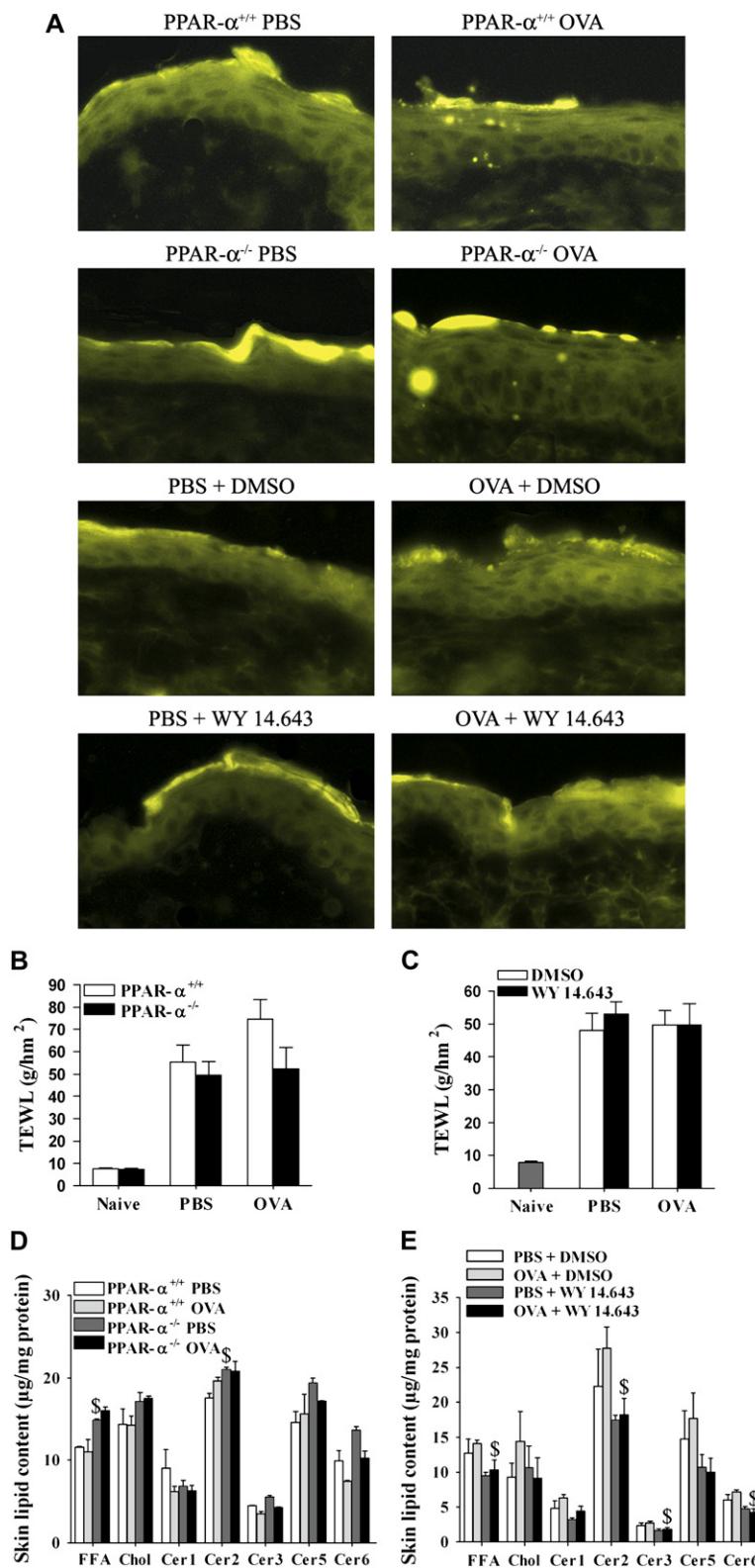


FIG E1. Analysis of skin barrier function in WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice and PPAR- α agonist-treated WT animals in a model of AD. **A**, Nile red staining of skin neutral lipids (200-fold magnification). **B** and **C**, TEWL. **D** and **E**, Skin lipid content ($n = 4$ animals per group). \$, Statistically different from dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated mice ($P < .05$).

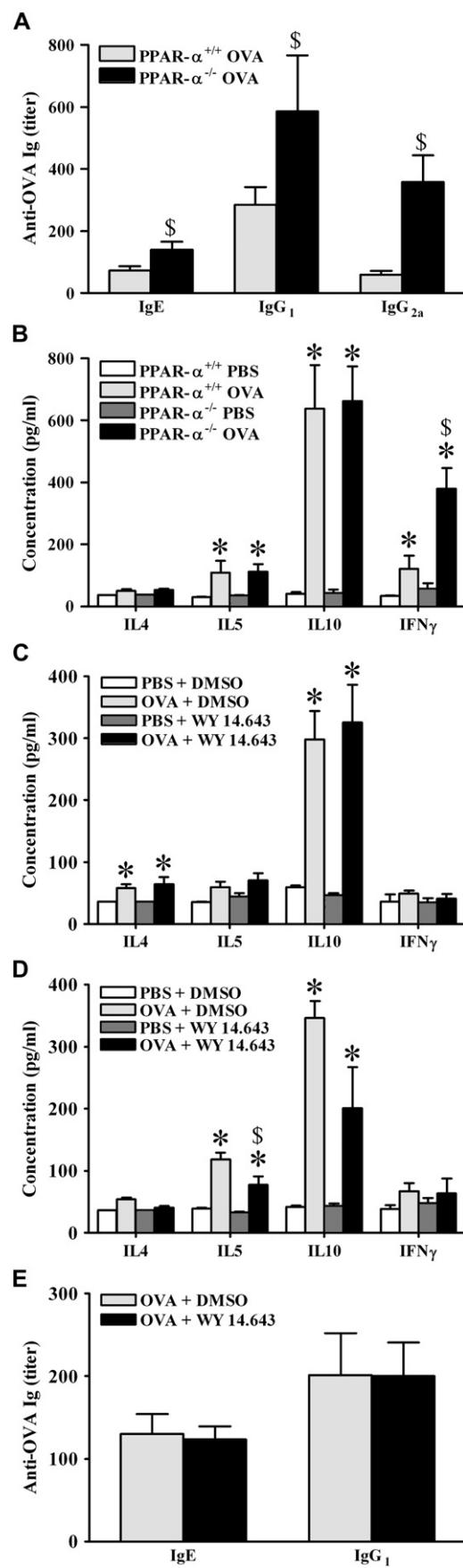


FIG E2. Humoral and cellular response in WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice and PPAR- α agonist-treated WT animals in a model of AD. **A**, OVA-specific IgE, IgG₁, and IgG_{2a} concentrations in WT and PPAR- $\alpha^{-/-}$ mice. **B-D**, Cytokine production by splenocytes (**Fig E2, B** and **C**) and inguinal lymph nodes (**Fig E2, D**) from PPAR- $\alpha^{-/-}$ and WT mice (**Fig E2, B**) and WY14643- or dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated WT mice (**Fig E2, C** and **D**) after *in vitro* OVA restimulation (n = 5-6 animals per group). **E**, OVA-specific IgE and IgG₁ concentrations in WY14643- or DMSO-treated mice. OVA-specific IgG_{2a} levels remained undetectable. *Statistically different from PBS-treated mice ($P < .05$). \$, Statistically different from control WT mice ($P < .05$).

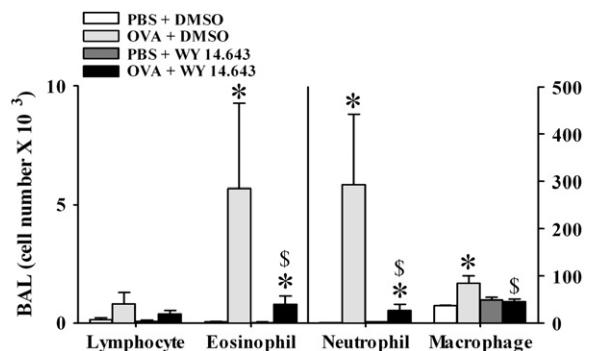


FIG E3. Decreased lung inflammation in a model of AD after topical treatment with the PPAR- α agonist WY14643. The total number of macrophages, neutrophils, lymphocytes, and eosinophils in BAL fluid at the time of death is shown ($n = 3-6$ animals per group). *DMSO*, Dimethyl sulfoxide.

TABLE E1. Primers used for real-time PCR

Gene	Primer	Size	Sequence
Mouse CCL5/RANTES	Forward	21	5' CCT GCT GCT TTG CCT ACC TCT 3'
	Reverse	20	5' ACT TGG CGG TTC CTT CGA GT 3'
Mouse CCL11/eotaxin 1	Forward	20	5' GCT TTC AGG GTG CAT CTG TT 3'
	Reverse	20	5' CAC GGT CAC TTC CTT CAC CT 3'
Mouse CCL17/TARC	Forward	20	5' GCT CGA GCC ACC AAT GTA GG 3'
	Reverse	19	5' ACA CGA TGG CAT CCC TGG A 3'
Mouse CCL22/MDC	Forward	20	5' TGG TGC CAA TGT GGA AGA CA 3'
	Reverse	21	5' GGC AGG ATT TTG AGG TCC AGA 3'
Mouse CCL24/eotaxin 2	Forward	21	5' GAC CAT CCC CTC ATC TTG CTG 3'
	Reverse	21	5' GGT GAT GAA GAT GAC CCC TGC 3'
Mouse CCL27/cTACK	Forward	20	5' CAT GGA ACT GCA GGA GGC TG 3'
	Reverse	20	5' TTG GCG TTC TAA CCA CCG AG 3'
Mouse CCR3	Forward	20	5' TGA CCC CAG CTC TTT GAT TC 3'
	Reverse	24	5' CTG GAC TCA TAA AGG ACT TAG CAA 3'
Mouse CCR4	Forward	20	5' CGC CAT CCA GGC TAC AGA AA 3'
	Reverse	19	5' ACC CCG GCA TGT TCT GAA G 3'
Mouse CCR5	Forward	22	5' GCA AAA AGC TGA AGA GCG TGA C 3'
	Reverse	20	5' TGC AGC ATA GTG AGC CCA GA 3'
Mouse CXCL10/IP-10	Forward	19	5' ACC CAA GTG CTG CCG TCA T 3'
	Reverse	20	5' CAT TCT CAC TGG CCC GTC AT 3'
Mouse CXCR3	Forward	20	5' TGA GCA GCA CGG ACA CCT TC 3'
	Reverse	20	5' AAC CCA CTG GAC AGC AGC AT 3'
Mouse Foxp3	Forward	21	5' CCC AGG AAA GAC AGC AAC CTT 3'
	Reverse	18	5' TTC TCA CAA GGC CAC TTG 3'
Mouse GAPDH	Forward	20	5' TGC CCA GAA CAT CAT CCC TG 3'
	Reverse	20	5' TCA GAT CCA CGA CGG ACA CA 3'
Mouse IFN- γ	Forward	20	5' ACC CTG TCG TAT GCT GGG AA 3'
	Reverse	21	5' GTT GGT GCA GGA ATC AGT CCA 3'
Mouse IL-1 β	Forward	20	5' AGG TGC TCA TGT CCT CAT CC 3'
	Reverse	20	5' CAG GCA GGC AGT ATC ACT CA 3'
Mouse IL-6	Forward	20	5' CCA CGG CCT TCC CTA CTT CA 3'
	Reverse	22	5' CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G 3'
Mouse IL-4	Forward	20	5' GCA TGG AGT TTT CCC ATG TT 3'
	Reverse	20	5' AGA TGG ATG TGC CAA ACG TC 3'
Mouse IL-5	Forward	22	5' CTC ACC GAG CTC TGT TGA CAA G 3'
	Reverse	22	5' GAA CTC TTG CAG GTA ATC CAG G 3'
Mouse IL-10	Forward	21	5' TTC ATG GCC TTG TAG ACA CCT 3'
	Reverse	20	5' TGA ATT CCC TGG GTG AGA AG 3'
Mouse IL-12p35/IL-12a	Forward	20	5' GAA GCA GGA TGC AGA GCT TC 3'
	Reverse	20	5' CTA GAC AAG GGC ATG CTG GT 3'
Mouse IL-13	Forward	20	5' GGA ATC CAG GGC TAC ACA GA 3'
	Reverse	20	5' AGG AGC TGA GCA ACA TCA CA 3'
Mouse IL-17	Forward	22	5' AAG TCT TTA ACT CCC TTG GCG C 3'
	Reverse	19	5' AGG GTC TTC ATT GCG GTG G 3'
Mouse IL-18	Forward	21	5' GGA ATC AGA CAA CTT TGG CCG 3'
	Reverse	22	5' CCT CGA ACA CAG GCT GTC TTT T 3'
Mouse IL-31	Forward	21	5' GAC GAA TCA ATA CAG CTG CCG 3'
	Reverse	20	5' GGT TAA TGC TTC CCG GTC CA 3'
Mouse IL-33	Forward	19	5' ATC AGG CGA CGG TGT GGA T 3'
	Reverse	21	5' GAC GTC ACC CCT TTG AAG CTC 3'
Mouse NF- κ B 1	Forward	21	5' ATG TGT GTG AAG GCC CAT CAC 3'
	Reverse	19	5' CAG GCC CCA CAT AGT TGC A 3'
Mouse NF- κ B 2	Forward	20	5' GTT GAT GAC GCC GAG GTA CT 3'
	Reverse	20	5' ACA GGA CGA GAA CGG AGA CA 3'
Mouse TGF- β	Forward	21	5' TAC TCT GGA GAC GGT TTG CCA 3'
	Reverse	20	5' CAT GAA GAA AGT CTC GCC CG 3'
Mouse TSLP	Forward	19	5' TAT CCC TGG CTG CCC TTC A 3'
	Reverse	21	5' TGT GCC ATT TCC TGA GTA CCG 3'
Mouse PPAR- α	Forward	20	5' ATG CCA GTA CTG CCG TTT TC 3'
	Reverse	20	5' CCG AAT CTT TCA GGT CGT GT 3'
Mouse PPAR- β/δ	Forward	21	5' CTC TTC ATC GCG GCC ATC ATT 3'

(Continued)

TABLE E1. (Continued)

Gene	Primer	Size	Sequence
Human PPAR- α	Reverse	21	5' TCT GCC ATC TTC TGC AGC AGC 3'
	Forward	20	5' GGT GGA CAC GGA AAG CCC AC 3'
Human PPAR- β/δ	Reverse	20	5' GGA CCA CAG GAT AAG TCA CC 3'
	Forward	20	5' GGG ACC ACA GCA TGC ACT TC 3'
	Reverse	20	5' TGC AGT TGG TCC AGC AGT GA 3'

TARC, Thymus and activation-regulated chemokine; *MDC*, macrophage-derived chemokine; *cTACK*, cutaneous T cell-attracting chemokine; *IP-10*, IFN- γ -inducible protein-10; *GAPDH*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.