



Caractérisation et suivi chez l'Homme des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques spécifiques d'allergènes, naturelles ou induites lors de traitement par immunothérapie allergénique

Mélodie Bonvalet

► To cite this version:

Mélodie Bonvalet. Caractérisation et suivi chez l'Homme des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques spécifiques d'allergènes, naturelles ou induites lors de traitement par immunothérapie allergénique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T098 . tel-00769293

HAL Id: tel-00769293

<https://theses.hal.science/tel-00769293>

Submitted on 31 Dec 2012

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 PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE :

SIGNALISATIONS ET RÉSEAUX INTRÉGRATIFS EN BIOLOGIE

DISCIPLINE : IMMUNOLOGIE

ANNÉE 2011-2012

SÉRIE DOCTORAT N° XXXX

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 16/12/2011

par

Mélodie BONVALET

**Caractérisation et suivi chez l'Homme des réponses
lymphocytaires T CD4 périphériques spécifiques
d'allergènes, naturelles ou induites lors de traitement
par immunothérapie allergénique.**

Composition du Jury :

Président du Jury

Pr. Pierre BOBÉ

Rapporteurs

Pr. Michel AUBIER

Dr. Salah MÉCHERI

Examineurs

Pr. Philippe BOUSSO

Dr. Bernard MAILLÈRE

Directeur de thèse

Pr. Jean KANELLOPOULOS

Tuteur industriel

Dr. Véronique BODO

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Moingeon et Véronique Bodo de m'avoir donné la chance d'effectuer ma thèse et de découvrir le monde du travail au sein du département de R&D de Stallergenes.

Véronique, merci de m'avoir apportée ton expertise scientifique, merci pour ton exigence qui m'a permis d'aller au delà de mes limites et d'avancer dans mes projets. Je suis également très reconnaissante, du temps que tu m'as accordée, notamment pendant la rédaction de ma thèse.

Philippe, je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, de m'avoir donné la possibilité d'enrichir mes connaissances scientifiques et de présenter mes travaux aux quatre coins de l'Europe. Je me souviendrai de vos leçons de vie qui m'ont beaucoup appris. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous, aussi bien au quotidien que pendant les moments de « team building ». Je fais particulièrement allusion au tennis, au ski et au rock !

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Jean Kanellopoulos pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour son aide scientifique et sa réactivité face aux modalités administratives.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Je remercie ainsi Pierre Bobé de présider le jury, Michel Aubier et Salah Mécheri pour leur investissement en tant que rapporteurs et Philippe Bouso et Bernard Maillère pour leur participation en tant qu'examinateurs.

Un grand merci à Hélène Moussu qui fut un binôme hors-pair pendant ces trois années. Je suis ravie d'avoir eu l'occasion de travailler avec toi. Merci pour ton soutien, ton écoute et ton aide.

Je remercie également Erik Wambre, mon prédécesseur, pour m'avoir ouvert les portes des « tétramères », pour ses conseils techniques avisés ainsi que de m'avoir permis de bénéficier de sa grande découverte : les lymphocytes Th2A.

Je salue à présent les personnes avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler directement, mais avec qui j'ai passé de très bons moments. Tout d'abord Aline Zimmer, ma co-thésarde à la détermination inégalable, toujours disponible pour me donner son avis scientifique ou personnel. Laetitia, ce fut un plaisir d'avoir une amie comme toi au travail, merci pour ton humour et ton amitié. Sabi, je ne sais quels mots utiliser... Merci pour ton écoute, ta gentillesse, ton humour, pour toutes nos « barres de rire », ta patience, ta compréhension, ta voiture, ton soutien, bref, merci d'être la personne que tu es !! Michel, Julien, Maxime, je garderai un excellent souvenir de nos mémorables soirées « Stallergenes ». Nathalie, Martine, Adjeley, merci pour votre bonne humeur, votre écoute, vos conseils. Enfin merci à toute l'équipe et aux stagiaires qui se sont succédés, pour la bonne ambiance qui règne au sein du département scientifique et sans qui la R&D ne tournerait pas.

Je tiens également à remercier Thierry Batard, Henri Chabre et Laurent Mascarell et tout particulièrement Emmanuel Nony d'avoir été mes confidents et pour m'avoir fait bénéficier de leur expérience tant sur le plan humain que professionnel. Un merci particulier à Henri pour m'avoir fait profiter de sa petite voiture rouge, bien plus confortable que les transports en communs !

Merci à Laurence Van Overtvelt pour sa motivation et son dynamisme contagieux.

Je remercie également les personnes que j'ai pu rencontrer dans les différents services de Stallergenes et qu'il a été agréable de côtoyer, Eric Pousset, Alexandre Pépin, Tanguy Coradin, Grégoire Guillet, William Fortes...

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Marc Pallardy, qui m'a beaucoup aidé pendant mes études et sans qui je n'aurais surement pas fait ma thèse à Stallergenes.

Je tiens aussi à remercier la société Stallergenes et l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT) pour avoir financé ce travail.

Enfin, je n'aurais pas pu mener cette thèse jusqu'au bout sans le soutien de ceux qui me sont les plus proches :

Un grand merci aux cinq doigts de la main, Tiphaine, Laure, Julie, Claire et Arno, vous êtes des amis inestimables.

Je tiens également à remercier l'ensemble des pamplemousses : Alex, Camille, Niko, Anne-laure, Olivier, Max, Léonidas, Judy, François et Simon pour votre capacité à tout tourner en dérision et à toujours relativiser, merci pour votre amitié et votre présence.

J'en profite également pour faire un clin d'œil à mes confrères et amis pharmaciens, Diane, Sandra et Sylvio, en souvenir de tous ces bons moments partagés mais aussi des heures passées à bachoter avant les exams !

Pour finir, j'adresse mes plus profonds remerciements à mes parents et à mon frère pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

Encore merci à Tous !

TABLES DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	8
INDEX DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
1. PREAMBULE	15
2. INTRODUCTION.....	21
2.1 Hypersensibilités de type I et immunothérapie allergénique (ITA) sublinguale : Aspects cliniques	21
2.1.1 Les différents types d'hypersensibilités.....	21
2.1.2 Epidémiologie.....	23
2.1.3 Agents responsables	23
2.1.4 Pathologies associées.....	25
2.1.4.1 Rhinite.....	25
2.1.4.2 Asthme	27
2.1.5 Diagnostics	28
2.1.5.1 Diagnostic de la rhinite	28
2.1.5.2 Diagnostic de l'asthme.....	29
2.1.6 Traitements	30
2.1.6.1 Eviction de l'allergène	30
2.1.6.2 Traitements symptomatiques : pharmacothérapie.....	30
2.1.6.3 Traitements curatif : immunothérapie allergénique	31
2.1.7 L'immunothérapie allergénique sublinguale (ITA)	31
2.1.7.1 Indications et contre-indications	31
2.1.7.2 Conduite du traitement.....	32
2.1.7.3 Efficacité et sécurité.....	33
2.1.7.3.1 Efficacité	33
2.1.7.3.2 Sécurité.....	34
2.1.8 Les biomarqueurs	34
2.2 Hypersensibilité de type I et immunothérapie allergénique sublinguale : Mécanismes immunologiques	35
2.2.1 Les acteurs cellulaires.....	35
2.2.1.1 Les basophiles et les mastocytes.....	35
2.2.1.2 Les éosinophiles.....	36
2.2.1.3 Les cellules dendritiques.....	36
2.2.1.4 Les lymphocytes B.....	37

2.2.1.5	Les lymphocytes T	37
2.2.1.5.1	L'activation des lymphocytes T CD4	38
2.2.1.6	Les différents types de lymphocytes T CD4	39
2.2.1.6.1	La polarisation lymphocytaire T CD4	39
2.2.1.6.1.1	La mémoire lymphocytaire T CD4	43
2.2.2	Mécanismes de l'allergie	44
2.2.2.1	Phase de sensibilisation	45
2.2.2.2	Phase effectrice	45
2.2.2.2.1	Phase immédiate	45
2.2.2.3	Phase tardive	47
2.2.2.4	Les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes	48
2.2.2.5	Les mécanismes d'induction de tolérance.....	50
2.2.2.5.1	L'ignorance	50
2.2.2.5.2	L'anergie	50
2.2.2.5.3	La délétion clonale	51
2.2.2.5.4	L'immuno-déviation via les lymphocytes Treg.....	51
2.2.3	Mécanismes de l'immunothérapie allergénique	52
2.2.3.1	Effets sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles.....	54
2.2.3.2	Effets sur les DCs	54
2.2.3.3	Effets sur la réponse humorale.....	55
2.2.3.4	Effets sur les lymphocytes T CD4	56
2.3	Suivi des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques	60
2.3.1	Intérêts	60
2.3.2	Outils de suivi pour l'analyse des réponses immunitaires périphériques.....	60
2.3.2.1	Analyse <i>ex vivo</i> des PBMCs	63
2.3.2.2	Analyses de la réponse à l'antigène après stimulation <i>in vitro</i>	63
2.3.2.3	Analyses de la réponse à l'antigène après amplification <i>in vitro</i>	63
2.3.2.4	La sélection de populations cellulaires	63
2.3.2.5	Détection des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes : Les tétramères de molécules de classe II du CMH.....	64
2.3.2.5.1	Concept.....	64
2.3.2.5.2	Les épitopes immuno-dominants et leur identification.....	64
2.3.2.6	Combinaison d'outils.....	66
3.	OBJECTIFS	69
4.	RESULTATS.....	73
4.1	Article I : Les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes saisonniers (Bet v 1) et perannuels (Der p 1/Der p 2) présentent des profils de polarisation distincts.....	73
4.2	Article II : Les caractéristiques des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes périphériques ne permettent pas de prédire l'efficacité précoce de l'ITA sublinguale aux pollens de graminées.....	89
4.3	Résultats I : Evaluation des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes suite à une année d'ITA chez des enfants souffrant de rhinite allergique aux acariens	115
4.3.1	Contexte.....	115

4.3.2	Résultats	115
4.3.2.1	Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la sécrétion de cytokines par les PBMCs après stimulation allergénique <i>in vitro</i>	115
4.3.2.2	Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la production cytokinique intracellulaire des lymphocytes T CD4 après stimulation <i>in vitro</i>	116
4.3.2.3	Effets de l'ITA sur sublinguale aux acariens sur les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1 118	
4.3.3	Synthèse des résultats	120
4.4	Article III : Comparaison entre les marquages à l'aide de tétramères de molécules de classe II du CMH et l'analyse de l'expression de marqueurs membranaires d'activation pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes	121
5.	DISCUSSION/PERSPECTIVES.....	135
6.	CONCLUSION	151
7.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Mécanismes immunologiques des quatre types d'hypersensibilités	22
Figure 2 : Les 3 paramètres influençant le déclenchement d'un premier signal efficace	38
Figure 3 : Les lymphocytes T CD4 effecteurs impliqués dans les allergies et leurs cellules cibles	40
Figure 4 : Mécanismes de l'hypersensibilité de type I	44
Figure 5 : Modes d'action des lymphocytes Treg.....	52
Figure 6 : Mécanismes de l'immunothérapie allergénique	53
Figure 7 : Résumé des effets de l'ITA sur les acteurs cellulaires immunologiques	59
Figure 8 : Effet de l'ITA sublinguale aux acariens sur la sécrétion de cytokines par les PBMCs après stimulation allergénique in vitro.	116
Figure 9 : Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la production cytokinique intracellulaire des lymphocytes T CD4.	117
Figure 10 : Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la fréquence et le phénotype des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1.....	119

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Principaux allergènes	24
Tableau II : Classification des rhinites allergiques	27
Tableau III : Classification de l'asthme	28
Tableau IV : Propriétés des populations lymphocytaires T CD4	42
Tableau V : Fonctions des médiateurs libérés lors de la réaction allergique	47
Tableau VI : Techniques d'analyses des propriétés des cellules du sang périphérique ..	61
Tableau VII : Définition des épitopes immuno-dominants, sous-dominants et cryptiques	65
Tableau VIII : Pourcentages des différents allèles DRB1 dans des populations caucasiennes, africaines et asiatiques	136

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC	Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
ARIA	<i>Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique Messenger
BrdU	BromodeoxyUridine
CBA	<i>Cytokines Beads Assay</i>
CCL-	<i>Chemokine (C-C motif) ligand-</i>
CCR-	<i>Chemokine (C-C motif) receptor-</i>
CFSE	<i>CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPAs	Cellules Présentatrices d'Antigène
CSA	<i>Cytokine Secretion Assay</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4</i>
CXCL-	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand-</i>
CXCR-	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor-</i>
DCs	Cellules Dendritiques
ECP	<i>Eosinophil Cationic Protein</i> (protéine cationique des éosinophiles)
EDN	<i>Eosinophil-Derived Neurotoxin</i> (neurotoxine dérivée des neutrophiles)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ELIspot	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Spot</i>
EMEA	<i>European Medicines Evaluation Agency</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GA2LEN	<i>Global Allergy and Asthma European Network</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>

GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating-Factor</i>
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
HRB	HyperRéactivité Bronchique
ICOS	<i>Inducible T-cell Co-Stimulator</i>
ICS	<i>Intracellular Cytokine Staining</i> (marquage intracellulaire de cytokines)
IDO	Indole 2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunoglobuline
IL-	Interleukine-
ITA	ImmunoThérapie Allergénique
LAG3	<i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
mDC	<i>myeloid Dendritic Cell</i> (cellules dendritiques myéloïdes)
MFI	Moyenne d'Intensité de Fluorescence
mIg	Immunoglobuline membranaire
NIH	<i>National Institute of Health</i>
oLCs	<i>Oral Langerhans cells</i> (cellules de Langerhans orales)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Otho Rhino Laryngé
OX40	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i>
PAF	<i>Patelets Actvating Factor</i> (facteur d'activation des plaquettes)
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> (cellules mononuclées du sang périphérique)
pDC	<i>Plasmacytoïd dendritic cell</i> (cellules dendritiques plasmacytoïdes)
PGD2	ProstaGlandine D2
qPCR	<i>quantitative PolyChain Reaction</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>

TBXA2	Thromboxane A2
Tc	Lymphocytes T cytotoxique
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (récepteur des lymphocytes T)
Tfh	Lymphocyte T folliculaire
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	Lymphocytes T <i>helper</i> (effecteur)
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VEMS	Volume Expiratoire Maximum par Seconde

PREAMBULE

PREAMBULE

Les hypersensibilités de type I (ou allergies) sont actuellement une pathologie en pleine expansion, en faisant un problème majeur de santé publique. Parmi les thérapies développées, seule l'immunothérapie allergénique (ITA) est capable de traiter l'étiologie de cette maladie. Cependant, son efficacité clinique a pendant longtemps reposé sur des faits empiriques et les mécanismes d'action du traitement ne sont toujours pas clairement élucidés. La compréhension de ces mécanismes faciliterait l'amélioration des schémas thérapeutiques (composition des principes actifs, forme galénique, fréquence des prises, durée du traitement) et pourrait permettre d'identifier des biomarqueurs d'efficacité. Ces derniers constituent un enjeu stratégique car ils peuvent aussi bien servir au développement des produits pharmaceutiques, qu'au suivi des patients par les allergologues lorsque le médicament est sur le marché.

Stallergenes, laboratoire pharmaceutique spécialisé dans la désensibilisation allergénique, a mis en place un projet visant à approfondir la compréhension de ces mécanismes et à mettre en évidence des biomarqueurs d'efficacité prédictifs ou de suivi de l'ITA dans le traitement des allergies respiratoires. Parmi les différents paramètres immunologiques étudiés, nous nous focaliserons ici sur les lymphocytes T CD4, acteurs centraux de la physiopathologie des allergies. En effet, alors que de nombreux travaux soulignent le rôle essentiel des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes dans le développement des allergies, l'absence de consensus quant à leurs fonctions dans l'induction de tolérance à l'origine de l'efficacité clinique de l'ITA persiste.

Mon projet de thèse a donc consisté à participer au développement et à l'utilisation d'outils pour suivre les réponses lymphocytaires T CD4 périphériques spécifiques de pneumallergènes chez des sujets sains et allergiques, ainsi que chez les patients allergiques au cours de traitements par ITA sublinguale.

Dans l'introduction de ce document, après avoir succinctement rappelé les différents types d'hypersensibilités, nous aborderons les aspects cliniques des hypersensibilités de type I respiratoires (agents responsables, épidémiologie, pathologies associées, diagnostic et

traitements) et de l'ITA sublinguale (indications/contre-indications, conduite du traitement, efficacité et sécurité).

Nous détaillerons ensuite les acteurs immunologiques (basophiles, mastocytes, éosinophiles, cellules dendritiques, lymphocytes B et lymphocytes T) impliqués dans la physiopathologie de l'allergie ainsi que dans les mécanismes d'action de l'ITA, en précisant de quelle manière ils interviennent dans l'orchestration de la réponse immunitaire. Dans cette partie, l'accent sera mis sur les lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes qui occupent une place centrale dans la réponse aux allergènes.

Les différents moyens permettant de suivre les réponses cellulaires périphériques avec des degrés variables de spécificité vis-à-vis de l'antigène (analyse *ex vivo* des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs), étude de la réponse à l'antigène après stimulation *in vitro*) seront abordés. Puis, nous évoquerons les techniques pouvant y être associées et qui affinent le type de réponse étudiée (tris cellulaires, détection de lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes avec les tétramères de molécules de classe II du CMH).

Les résultats générés au cours de cette thèse seront ensuite présentés dans la partie « Résultats ». Nous avons tout d'abord étudié les caractéristiques des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'un allergène du pollen de bouleau (Bet v 1) et de deux allergènes d'acariens (Der p 1/Der p 2) chez les individus sains et allergiques avec des tétramères de molécules de classe II du CMH. Nous avons ensuite évalué les réponses cellulaires périphériques spécifiques d'allergènes, et plus précisément les lymphocytes T CD4, notamment à l'aide de tétramères de molécules de classe II du CMH, au cours de deux études cliniques d'ITA sublinguale menées en double aveugle avec un groupe contrôle placebo : l'une chez des adultes allergiques aux pollens de graminées traités pendant 4 mois et exposés aux allergènes dans une chambre à pollens, la seconde chez des enfants allergiques aux acariens traités pendant un an. Enfin, nous avons évalué si nous pouvions utiliser une combinaison de marqueurs d'activation membranaires comme alternative aux tétramères de molécules de classe II du CMH pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes après amplification *in vitro*, afin de s'affranchir des contraintes d'utilisation des tétramères de molécules de classe II du CMH.

Enfin, nous discuterons des résultats obtenus lors de l'étude des réponses lymphocytaires T CD4 entre sujets sains et allergiques, ainsi qu'au cours de traitement par ITA sublinguale. Puis, nous évoquerons la valeur ajoutée des tétramères de molécules de classe II du CMH

dans l'étude exhaustive des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes, ainsi que l'identification d'outils alternatifs à ces derniers pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

2.1 Hypersensibilités de type I et immunothérapie allergénique (ITA) sublinguale : Aspects cliniques

2.1.1 Les différents types d'hypersensibilités

Les réactions d'hypersensibilités se caractérisent par une réponse immunitaire disproportionnée ou inappropriée de l'organisme à un antigène *a priori* anodin. La classification de Gell et Coombs répertorie 4 types d'hypersensibilités qui se différencient selon les mécanismes immunologiques mis en jeu lors du contact avec l'agent responsable (Fig. 1):

- L'hypersensibilité de type I ou immédiate se caractérise par le déclenchement d'une réponse humorale à Immunoglobuline de type E (IgE) lors d'expositions répétées à des antigènes inoffensifs issus de notre environnement, communément appelés allergènes. Cliniquement, elle se manifeste sous forme de rhinite allergique (rhume des foins), d'asthme, d'urticaire, d'œdème de Quincke ou de choc anaphylactique.
- L'hypersensibilité de type II ou cytotoxique débute par la fixation spécifique d'IgG à un antigène exprimé ou adsorbé à la surface d'une cellule. Cette liaison provoque une destruction cellulaire dépendante du complément ou de l'ADCC (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), engendrant anémie hémolytique, cytopénie ou néphrite interstitielle.
- L'hypersensibilité de type III ou à complexes immuns se traduit par l'infiltration massive de neutrophiles suite à l'activation du complément induite par le dépôt de complexes immuns au niveau des tissus. Elle est responsable entre autres de maladies sériques, de vascularites nécrosantes, de glomérulonéphrites, de polyarthrites rhumatoïdes et de lupus érythémateux disséminés.
- L'hypersensibilité de type IV, retardée ou cellulaire est médiée par les lymphocytes T. Lorsque ces derniers rencontrent l'antigène au niveau des tissus, ils libèrent de nombreuses cytokines et chimiokines qui recrutent d'autres cellules immunitaires dont l'activation est à l'origine des lésions. Il en existe 4 sous-types [1, 2]:

- le type IVa fait intervenir les lymphocytes Th1 qui sécrètent de fortes proportions d'IFN- γ et de TNF- α entraînant l'activation de monocytes et de macrophages,
- le type IVb met en jeu les lymphocytes Th2 et leur production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 provoquant une inflammation éosinophile-dépendante,
- le type IVc repose sur les lymphocytes T cytotoxiques via la libération de perforine/granzyme B ou l'interaction Fas/FasL,
- le type IVd se caractérise par le recrutement de neutrophiles suite à la libération d'IL-8 par les lymphocytes T.

Elles se traduisent par des dermatites de contact, des lésions tuberculeuses ou des rejets de greffe.

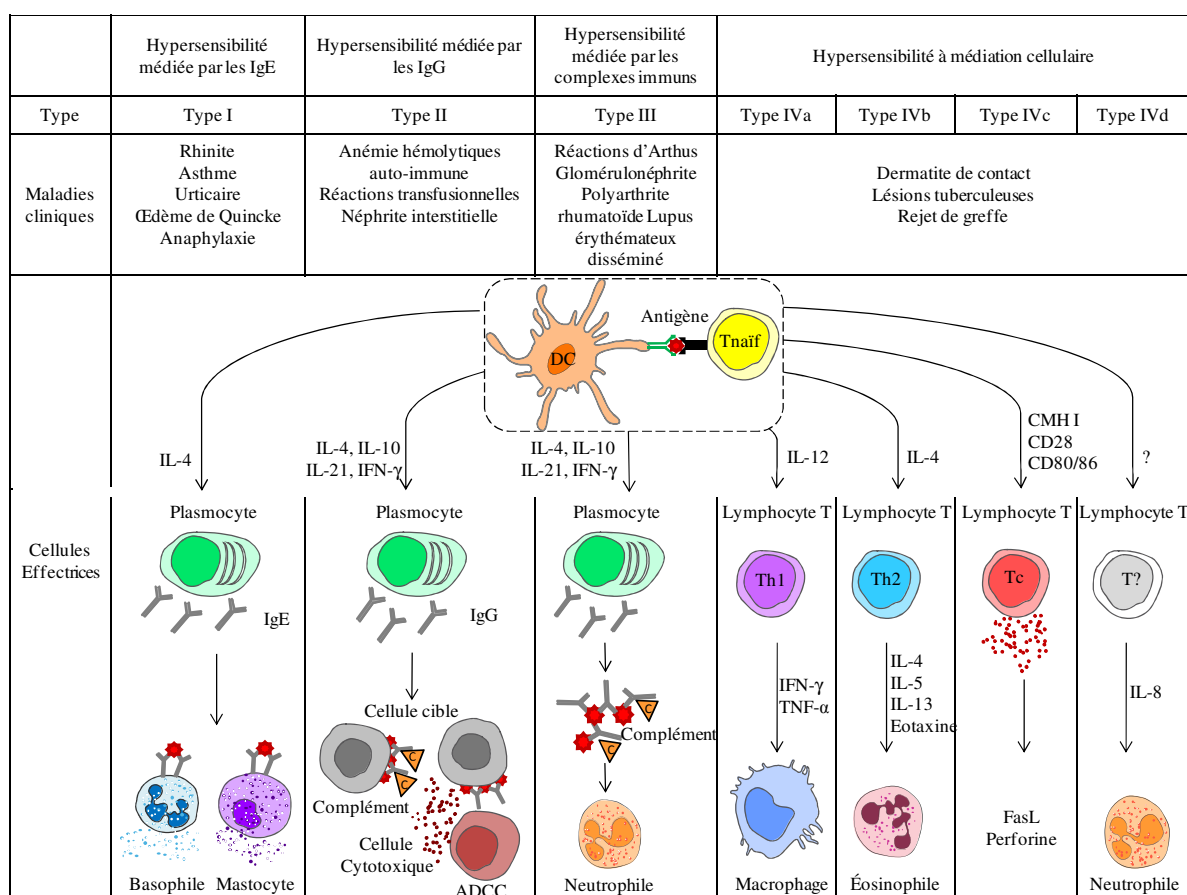


Figure 1 : Mécanismes immunologiques des quatre types d'hypersensibilités [adapté de 1, 2].

Dans ce projet, nous nous focaliserons sur les hypersensibilités de type I.

2.1.2 Epidémiologie

Depuis une cinquantaine d'années, l'hypersensibilité de type I est une pathologie en pleine croissance. En effet, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) la classe au 4^e rang des affections chroniques mondiales. La prévalence des rhinites allergiques et de l'asthme a doublé au cours des vingt dernières années, notamment chez des sujets plus jeunes. Elle est en constante augmentation dans la plupart des pays, particulièrement dans ceux où le taux de prévalence est faible ou modéré [3]. Les allergies respiratoires touchent aujourd'hui près de 500 millions de personnes dans le monde (OMS) et l'étude GA2LEN (*Global Allergy and Asthma European Network*) prévoit même qu'en 2015, 50% de la population sera atteinte d'une maladie allergique. Cette augmentation peut notamment s'expliquer par la théorie hygiéniste proposée par Strachan en 1989 qui met en avant la réduction de l'exposition aux infections comme justification de ce phénomène [3]. Toutefois, l'allergie est une maladie aux origines multifactorielles dont le développement est influencé par des facteurs aussi bien environnementaux que génétiques, en étroite relation avec l'atopie [4, 5]. En effet, les prédispositions génétiques, l'historique familial, les facteurs de risques de la petite enfance, l'origine ethnique, l'exposition aux allergènes, aux polluants environnementaux et aux infections sont autant de facteurs de risques pouvant être à l'origine du déclenchement de la maladie [3].

2.1.3 Agents responsables

Les hypersensibilités de type I peuvent être engendrées par différentes substances que l'on classe selon leur voie de pénétration dans l'organisme (tableau I). On distingue :

- les trophallergènes qui pénètrent dans l'organisme par voie orale (aliments, médicaments),
- les allergènes injectés par voie parentérale (médicaments, venins d'insectes),
- les allergènes déclenchant une allergie par contact cutané,
- les pneumallergènes qui s'introduisent dans l'organisme par les voies respiratoires. Ils peuvent être subdivisés en deux groupes, les allergènes perannuels auxquels nous

sommes exposés continuellement (par exemple les acariens) et les allergènes saisonniers qui ne sont présents dans l'environnement qu'à une période de l'année (par exemple les pollens).

Les deux premiers groupes vont le plus souvent provoquer des manifestations cliniques systémiques, alors que les deux derniers vont plutôt entraîner une symptomatologie locale. Cependant, ils peuvent aussi être à l'origine de réactions systémiques [6].

Tableau I : Principaux allergènes (d'après [7]).

Famille d'allergènes	Source d'allergènes	Espèce	Exemples d'allergènes majeurs
Allergènes injectés	Guêpe	<i>Vespa vulgaris</i> <i>Polistes dominula</i>	Ves v 1 Pol d 5
	Abeille	<i>Apis mellifera</i>	Api m 1
Trophallergènes	Arachide	<i>Arachis hypogea</i>	Ara h 1
	Pomme	<i>Malus domestica</i>	Mal d 1
	Pêche	<i>Prunus persica</i>	Pru p 1
Pneumallergènes	Acariens	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Der p 1 Der p 2
		<i>Dermatophagoides farinae</i>	Der f 1 Der f 2
	Pollens de graminées	<i>Dactylis glomerata</i> (dactyle) <i>Phleum pratense</i> (phléole) <i>Anthoxanthum odoratum</i> (flouve) <i>Lolium perenne</i> (ivraie) <i>Poa pratensis</i> (pâturin)	Dac g 1/Dac g 5 Phl p 1/Phl p 5 Ant o 1/Ant o 5 Lol p 1/Lol p 5 Poa p 1/Poa p 5
	Pollens d'arbres	<i>Betula pendula</i> (bouleau) <i>Cupressus sempervirens</i> (cyprès) <i>Olea europaea</i> (olivier)	Bet v 1 Cup a 1 Ole e 1
	Pollens d'herbacées	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> (ambroisie) <i>Artemisia vulgaris</i> (armoise) <i>Parietaria officinalis</i> (pariétaire)	Amb a 1 Art v 1 Par j 1
	Phanères de chien/chat	<i>Canis familiaris</i> <i>Felis domesticus</i>	Can f 1 Fel d 1
	Insectes	<i>Blattella germanica</i> (blatte)	Bla g 1
	moisissures	<i>Alternaria alternata</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Alt a 1 Asp f 1

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons plus particulièrement aux allergies respiratoires aux pollens de bouleau, de graminées ou aux acariens.

- Le bouleau (*Betula pendula*) appartient à la famille des *Betulaceae*. Il est présent de manière relativement uniforme sur le continent Européen. Sa période de pollinisation se déroule de mars à juin. Son allergène majeur (allergène vis-à-vis duquel au moins 50% des individus allergiques réagissent), Bet v 1, est une protéine de défense des plantes contenue dans les grains de pollen [8].
- Les graminées appartiennent à la famille des *Poacées*. Il en existe plus de 9000 espèces et représentent 20% de la végétation terrestre. Parmi les graminées allergisantes, sont distinguées les graminées fourragères et les graminées céréalières. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux graminées fourragères comme le dactyle (*Dactylis glomerata*), la phléole des prés (*Phleum pratense*), la flouve odorante (*Anthoxanthum odoratum*), l'ivraie vivace (*Lolium perenne*) et le pâturin des prés (*Poa pratensis*) dont le pouvoir allergisant est plus important que les graminées céréalières. De ce fait, ce sont les espèces les plus souvent contenues dans les préparations de désensibilisation. La période de pollinisation se situe entre avril et juillet avec un rebond en septembre/octobre [9]. Chaque espèce possède plusieurs allergènes pouvant être classés en 13 groupes selon leur nature et leurs fonctions biologiques. Toutefois, ce sont les allergènes des groupes 1 et 5 qui ont le plus fort pouvoir allergisant. 95% des patients sont sensibilisés aux allergènes du groupe 1 et 65-85%, à ceux du groupe 5 [10].
- Les acariens appartiennent à l'ordre des arachnides. Ils peuvent être divisés en deux groupes : les acariens domestiques et les acariens de stockage. Nous nous limiterons aux acariens domestiques qui sont essentiellement *Dermatophagoïdes pteronyssinus* et *Dermatophagoïdes farinae* car ce sont les plus allergisants. Ils se logent dans la literie, les rideaux, les peluches, les canapés, les tapis et les moquettes. Les allergies aux acariens se manifestent tout au long de l'année avec un rebond au début de l'automne, lorsque nous vivons plus confinés. Leurs allergènes majeurs comme Der p 1, Der p 2 (issus de *Dermatophagoïdes pteronyssinus*) et Der f 1, Der f 2 (issus de *Dermatophagoïdes farinae*) sont contenus dans leur carapace et dans leurs excréments [11].

2.1.4 Pathologies associées

2.1.4.1 Rhinite

Les hypersensibilités de type I respiratoires se traduisent cliniquement par deux pathologies chroniques principales : la rhinite dont la symptomatologie se manifeste au niveau nasal et

l'asthme dont les signes cliniques sont visibles au niveau pulmonaire. Toutefois, les allergènes incriminés peuvent également entraîner des événements aigus sévères comme des urticaires géants, des œdèmes de Quincke ou des chocs anaphylactiques.

Tout d'abord, il est nécessaire de préciser qu'il n'existe pas qu'un seul type de rhinite. Il est possible de classifier cette pathologie selon ses étiologies. Ainsi sont distinguées les rhinites infectieuses, les rhinites professionnelles, les rhinites médicamenteuses, les rhinites hormonales, les rhinites idiopathiques ou vasomotrices et enfin les rhinites allergiques [3, 7]. Parmi les rhinites allergiques, il existe les rhinites non dépendantes des IgE et les rhinites dépendantes des IgE. D'après ARIA (*Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma*), ces dernières se subdivisent selon la chronicité (intermittentes/persistantes) et l'intensité des symptômes (légères/modérées à sévères) [3] (tableau II).

Toutes deux se manifestent cliniquement par une irritation nasale responsable de prurit, des éternuements, des rhinorrhées claires, fluides, souvent très abondantes et une obstruction nasale. Elles peuvent être associées à une conjonctivite se traduisant par des sensations de brûlures oculaires, un larmoiement, des démangeaisons intenses et des conjonctives rouges et injectées. Toutefois, la conjonctivite est plus fréquente dans les rhinites allergiques provoquées par les pollens.

Les rhinites allergiques peuvent également donner lieu à des troubles de l'olfaction ou anosmie, dus à l'inflammation de la muqueuse nasale [12]. Dans certains cas, les rhinites allergiques peuvent altérer la qualité de vie des patients. L'intensité des crises et leur constance peuvent induire chez ces derniers une grande fatigabilité, une insomnie, un sommeil non réparateur ou des céphalées.

Tableau II : Classification des rhinites allergiques (d'après [3]).

Rhinite intermittente Symptômes présents < 4 jours par semaine ou < 4 semaines par an	Rhinite persistante Symptômes présents > 4 jours par semaine et > 4 semaines par an
Rhinite légère (tous les symptômes suivants) - Sommeil normal - Activités quotidiennes normales - Activités professionnelles et/ou scolaires normales - Pas de symptômes gênants	Rhinite modérée à sévère (un ou plus des symptômes suivants) - Sommeil perturbé - Activités quotidiennes perturbées - Activités professionnelles et/ou scolaires perturbées - Présence de symptômes gênants

2.1.4.2 Asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes associée à une hyperréactivité bronchique (HRB). Les symptômes caractéristiques de cette pathologie sont des toux nocturnes et à l'effort, une gêne et une oppression respiratoires, une striction thoracique et des bronchites sifflantes. Ils se traduisent cliniquement par une bronchoconstriction, un œdème des voies aériennes, une hypersécrétion de mucus et une inflammation qui aboutissent à l'obstruction des voies aériennes. Comme la rhinite, l'asthme n'a pas obligatoirement une origine allergique. Ainsi, il peut être divisé en deux catégories : l'asthme intrinsèque (non allergique) et l'asthme extrinsèque (allergique). Ce dernier peut être dépendant ou non des IgE [13]. Toutefois, d'un point de vue clinique, cellulaire et moléculaire, l'asthme intrinsèque est très semblable à l'asthme extrinsèque [14].

L'asthme peut également être classé en fonction de sa gravité et de sa sévérité. Le terme gravité est utilisé pour faire référence à l'intensité des crises, alors que le terme sévérité s'applique aux périodes inter critiques [15]. Les valeurs de paramètres fonctionnels respiratoires comme le VEMS (Volume Expiratoire Maximum par Seconde) sont également prises en considération. La gravité des crises est divisée en 4 stades qui vont de la crise légère à la crise menaçant le pronostic vital (*Global Initiative for Asthma*, GINA) (tableau III) [16].

Tableau III : Classification de l'asthme (d'après [16]).

Asthme	Symptômes	VEMS	Variabilité du VEMS
Intermittent (I)	- Symptômes < 1 fois/semaine - Exacerbations brèves - Symptômes nocturnes ≤ 2 fois/mois	≥80%	<20%
Léger persistant (II)	- Symptômes ≥ 1 fois/semaine mais < 1 fois/jour - Les crises peuvent altérer les activités normales et le sommeil - Symptômes nocturnes > 2 fois/mois	≥80%	20-30%
Modéré persistant (III)	- Symptômes quotidiens - Les crises altèrent les activités normales et le sommeil - Symptômes nocturnes > 1 fois/semaine	60-80%	>30%
Sévère persistant (IV)	- Symptômes quotidiens - Exacerbations fréquentes - Symptômes nocturnes fréquents - Limitation des activités physiques	≤60%	>30%

Bien que les symptômes diffèrent entre la rhinite allergique et l'asthme atopique, les mécanismes qui en sont à l'origine sont identiques. Dans un cas, la réaction se produit au niveau des muqueuses nasales (rhinite) et dans l'autre elle a lieu dans la partie inférieure du tractus respiratoire (asthme). Ainsi, il est de plus en plus courant de voir une rhinite allergique, le plus souvent persistante, associée à de l'asthme, en particulier quand les symptômes sont sévères [17, 18].

2.1.5 Diagnostics

2.1.5.1 Diagnostic de la rhinite

Le diagnostic des allergies se base sur quatre points fondamentaux : l'interrogatoire du patient, l'examen clinique, la pratique de tests cutanés et de tests sériques.

L'interrogatoire du patient constitue une étape indispensable pour la mise en évidence d'une allergie. Il permet d'effectuer un diagnostic différentiel avec d'autres affections et cherche à mettre en évidence (i) les symptômes, leur intensité et leur chronologie, (ii) les éléments évocateurs d'une origine allergique, (iii) les antécédents allergiques familiaux et personnels, et (iv) les facteurs déclenchants (unité de lieu, unité de temps).

L'examen clinique consiste d'abord en une auscultation générale (poids, tension artérielle), puis en une auscultation plus ciblée sur les organes touchés par l'allergie (poumons, sphère ORL).

L'examen clinique permet au praticien de faire un bilan des répercussions de l'allergie et l'oriente vers d'éventuelles explorations complémentaires comme les tests biologiques qui visent à dépister les maladies allergiques ou les explorations fonctionnelles respiratoires qui servent à diagnostiquer un asthme [15, 19].

Suite à l'examen clinique, ce sont les signes évocateurs d'une allergie qui poussent le médecin à réaliser les tests cutanés et sériques. Le test cutané le plus couramment utilisé est le Prick-test. Son principe repose sur la reproduction, à très petite échelle au niveau de la peau du patient, d'une réaction allergique de type "hypersensibilité immédiate". La réalisation du test consiste à piquer le derme avec une aiguille au travers d'une goutte d'allergène. Les résultats sont lus en mesurant le diamètre de la papule et éventuellement celui de l'érythème qui l'entoure [15, 19].

Enfin, le dosage sérique des IgE spécifiques de l'allergène est réalisé parallèlement aux tests cutanés. Il permet de confirmer leurs positivités. L'utilisation d'allergènes recombinants pour ces tests permet aujourd'hui d'affiner la spécificité des résultats.

Lorsque ces tests ne sont pas réalisables, c'est-à-dire qu'il s'agit d'allergènes rares ou non commercialisés (allergies médicamenteuses), d'autres techniques peuvent être mise en œuvre comme le test d'histaminolibération, de dégranulation des basophiles, le dosage de l'ECP et de la tryptase.

2.1.5.2 Diagnostic de l'asthme

Le diagnostic de l'asthme repose sur les mêmes bases que le diagnostic de la rhinite. Toutefois, il est complété par une radiographie thoracique et des explorations fonctionnelles respiratoires. La radiographie thoracique permet essentiellement d'exclure d'autres maladies [19]. Les explorations fonctionnelles respiratoires visent à déterminer des paramètres comme la compliance, les volumes et les débits pulmonaires ainsi que les résistances des voies aériennes. Des dispositifs comme le spiromètre et le débitmètre de pointe sont utilisés à cet effet [15, 19].

Actuellement, aucun biomarqueur permettant à lui seul de diagnostiquer ces pathologies n'a été identifié.

2.1.6 Traitements

Trois types d'approches thérapeutiques sont utilisées afin d'améliorer le confort des patients : l'éviction de l'allergène, la pharmacothérapie et l'ITA.

2.1.6.1 Eviction de l'allergène

L'éviction de l'allergène a pour but de limiter les contacts avec les allergènes.

2.1.6.2 Traitements symptomatiques : pharmacothérapie

La pharmacothérapie vise à atténuer la symptomatologie. Différentes classes pharmacologiques peuvent ainsi être utilisées dans le traitement des allergies respiratoires. Dans le cas de la rhinite allergique sont employés des α -stimulants (α adrénergiques) ou décongestionnants. Ils sont administrés par voie locale ou orale. Ces molécules sont caractérisées par leur capacité à provoquer la contraction des muscles lisses du tissu veineux érectile et ainsi réduire la sensation d'obstruction nasale.

Les antihistaminiques H1 sont administrés par voie orale ou intra nasale/intraoculaire. Ils agissent sur la rhinorrhée, les éternuements et le prurit. Ils n'ont cependant aucun effet sur l'obstruction nasale.

Ainsi, il est judicieux d'associer ces deux classes pharmacologiques car leur action complémentaire permet de soulager l'ensemble des symptômes de la rhinite allergique.

Un seul dérivé de l'atropine (bromure d'ipratropium) est utilisé dans le traitement des rhinites allergiques et vise à atténuer la rhinorrhée.

Deux anti-inflammatoires non stéroïdiens locaux appartenant à la classe des cromones peuvent être prescrits dans la prise en charge de cette pathologie. Ils auraient un effet stabilisateur sur les mastocytes et une action inhibitrice sur les éosinophiles, les macrophages et les plaquettes.

Les corticoïdes sont utilisés soit par voie locale, soit par voie systémique. Bien que leur efficacité soit supérieure aux antihistaminiques et aux cromones, il est nécessaire d'évaluer le rapport bénéfice/risque à long terme qui peut être en faveur du risque en raison des effets secondaires observés [3, 18].

Une dernière classe, les anti-leucotriènes, est aussi efficace que les antihistaminiques mais moins efficace que les corticoïdes locaux [9].

La prise en charge de l'asthme comprend, comme pour la rhinite allergique l'administration de corticoïdes, de cromones et/ou de bromure d'ipratropium. Trois autres classes sont également utilisées : (i) les bronchodilatateurs ou β 2-mimétiques qui agissent sur la bronchoconstriction par action sur les récepteurs β 2-adrénergiques, (ii) les méthylxanthines agissant également comme un bronchodilatateur mais en modifiant la concentration d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire par inhibition de la phosphodiesterase et (iii) les anticorps monoclonaux humanisés anti-IgE qui sont envisagés uniquement si les autres traitements sont insuffisamment efficaces [18, 20].

2.1.6.3 Traitements curatif : immunothérapie allergénique

L'immunothérapie allergénique (ITA) consiste à administrer des doses progressivement croissantes d'un vaccin allergénique à un sujet allergique, jusqu'à une dose qui améliore efficacement les symptômes provoqués par l'exposition ultérieure à l'allergène responsable [21]. Ce traitement alternatif à la pharmacothérapie est apparu suite aux travaux de Noon et Freeman en 1911 [22]. C'est, à ce jour, le seul moyen d'agir sur l'étiologie de la maladie et de réduire significativement les symptômes et la consommation médicamenteuse. D'abord injectée par voie sous-cutanée, elle s'administre désormais de plus en plus par voie sublinguale.

2.1.7 L'immunothérapie allergénique sublinguale (ITA)

2.1.7.1 Indications et contre-indications

La mise en place d'une ITA sublinguale nécessite la mise en évidence préalable et incontestable d'une hypersensibilité de type I, mais aussi l'identification indiscutable du ou des allergènes en cause. Une fois ces deux critères affirmés, des conférences de consensus ont déterminé que l'ITA sublinguale pouvait être prescrite en cas de rhinites légères, modérées ou sévères (classification ARIA) et en cas d'asthme léger à modéré (classification GINA) chez les patients :

- allergiques aux acariens et aux pollens
- dont les symptômes ne sont pas contrôlés par la pharmacothérapie conventionnelle

- qui ont eu des réactions systémiques lors d'ITA sous-cutanée
- qui ont une faible observance ou qui refusent les injections [3, 23].

L'ITA sublinguale est contre-indiquée chez les patients :

- âgés de moins de 5 ans
- âgés de plus de 50 ans
- présentant un asthme sévère et/ou non contrôlé par un traitement pharmacologique
- souffrant d'infections avec des complications et des processus inflammatoires aigus dans les organes cibles de l'allergie
- souffrant d'affections graves (déficits immunitaires sérieux, affections malignes, tuberculose, affections hépatiques, affections rénales, collagénoses, affections rhumatismales, encéphalites, thyroïdites) ou d'affections respiratoires chroniques avec des formes avancées d'emphysème et de cœur pulmonaire
- en cours de grossesse
- prenant des β -bloquants même par voie locale [3, 24].

2.1.7.2 Conduite du traitement

Le traitement se déroule en deux phases successives. La première phase dite "traitement initial" consiste à augmenter progressivement les doses d'allergènes jusqu'à atteindre la dose maximale la mieux tolérée par le patient. Cette phase initiale dure une dizaine de jours. La seconde étape, appelée phase d'entretien, consiste à administrer, à intervalles réguliers, la dose maximale tolérée par le patient à la fin de la première phase. Il s'agit de prises quotidiennes annuelles dans le traitement des allergies aux acariens et de prises pré/co-saisonnières dans celui des pollinoses. Le traitement dure environ 3 ans, toutefois, sa longévité tend à être réduite sans altération de l'efficacité [25].

Les formes galéniques utilisées dans l'ITA sublinguale sont des gouttes ou des comprimés lyophilisés. Ils doivent être pris le matin à jeun, conservés 2 minutes sous la langue, puis déglutis. Le patient doit avoir à sa disposition des médicaments capables de soulager les symptômes en cas de réactions indésirables. Il est également possible de réaliser une poly désensibilisation [11, 15, 26].

2.1.7.3 Efficacité et sécurité

A l'heure actuelle, l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité de l'ITA repose essentiellement sur l'observation de paramètres cliniques du fait de l'absence de la mise en évidence de biomarqueurs.

2.1.7.3.1 Efficacité

L'efficacité clinique de l'ITA sublinguale se base essentiellement sur deux paramètres : la réduction des symptômes et la réduction de la prise médicamenteuse. Ils sont mesurés à l'aide de scores arbitrairement établis (score symptômes et score médicamenteux).

Alors que l'efficacité de l'ITA sous-cutanée est depuis longtemps avérée, celle de l'ITA sublinguale a été controversée pendant des années. Toutefois, depuis la méta-analyse de Wilson *et al.* [27], plus aucun doute ne subsiste quant à l'efficacité de l'ITA sublinguale dans le traitement de la rhinite allergique. Depuis, d'autres méta-analyses ont été réalisées renforçant ces résultats [28-30]. La plus récente inclut 60 essais cliniques menés selon les « CONSORT guidelines ». Cette méta-analyse inclue les études réalisées sur de grande cohorte de patients avec un groupe contrôle placebo et en double aveugle. La plupart de ces études visent à évaluer l'efficacité de l'ITA sublinguale aux pollens de graminées, mais aussi à la pariétaire, à l'ambrosie, aux arbres (dont le bouleau) et aux acariens. L'amélioration de l'état des patients est exprimée par la différence moyenne standardisée (SMD) avec un intervalle de confiance de 95% (95% IC). Elle conclut que l'ITA sublinguale, tous allergènes confondu, réduit significativement les symptômes (SMD -0,49; 95% IC -0,64 à -0,34) et la prise de médicaments (SMD -0,32; 95% IC -0,43 à -0,21) [31].

Par ailleurs, l'efficacité de l'ITA sublinguale dans le traitement de l'asthme a également été étudiée. Deux méta-analyses ont analysé des études menées chez des enfants souffrant d'asthme allergique. Toutes deux concluent à une amélioration des symptômes et à une diminution de la prise médicamenteuse [32, 33].

De plus, il semblerait que l'ITA sublinguale aux acariens soit capable de réduire la symptomatologie de la dermatite atopique, pathologie ayant une composante allergique [34, 35]. Enfin, alors que l'ITA sous-cutanée est capable de réduire l'apparition de nouvelles sensibilisations, cet effet reste à démontrer pour l'ITA sublinguale [36].

2.1.7.3.2 Sécurité

A ce jour, la sécurité de l'ITA sublinguale a été amplement démontrée au cours de diverses études de phases I à IV (pharmacovigilance). Des effets indésirables comme des démangeaisons, des douleurs intestinales, des nausées, un gonflement des lèvres et de la face inférieure de la langue ont été observés. Ces symptômes sont d'autant plus fréquents que le dosage est élevé. Malgré tout, ces effets secondaires sont bien tolérés par les patients et ne nécessitent ni médication, ni modification du traitement. Des cas de réactions systémiques comme de l'asthme ou de l'urticaire ont été rapportées. Il semblerait que ces réactions soient dépendantes de l'allergène et de son dosage. Aucune mortalité liée à un traitement par ITA sublinguale n'a été enregistrée. Seuls deux cas d'anaphylaxie ont été signalés, toutefois sans menace du pronostic vital [3, 27, 31, 37].

2.1.8 Les biomarqueurs

Le diagnostic des hypersensibilités de type I repose sur l'analyse de différentes données cliniques et biologiques (interrogatoire du patient, tests cutanés, tests sériques, explorations fonctionnelles respiratoires). Alors que ces paramètres servent à déterminer quelle thérapie doit être envisagée, ils ne permettent pas d'évaluer la sécurité et l'efficacité du traitement entrepris. L'absence d'un critère fiable et objectif pour apprécier ces éléments soulève la nécessité de mettre en évidence des biomarqueurs permettant de déterminer l'efficacité et l'absence de toxicité de la prise en charge thérapeutique de la maladie. Plus précisément, d'après l'EMA (*European Medicines Evaluation Agency*) et le NIH (*National Institute of Health*), un biomarqueur est « un indicateur objectivement mesurable (c'est-à-dire avec une précision et une reproductibilité suffisantes) et évalué comme indicateur de processus physiologique ou pathologique, ou de l'action des médicaments » [38].

Les types de biomarqueurs recherchés sont :

- Les biomarqueurs de diagnostic pour stratifier la sévérité de la maladie et son pronostic.
- Les biomarqueurs de prédiction de la toxicité et de la réponse au traitement, pour pouvoir sélectionner et ne traiter que les patients répondeurs à l'ITA.
- Les biomarqueurs d'efficacité à court terme, pour démontrer la présence d'une réponse au traitement peu après son initiation. Ces marqueurs devraient permettre d'ajuster le traitement et d'augmenter l'observance des patients.

- Les biomarqueurs d'efficacité à long terme pour permettre de détecter l'apparition de la tolérance à l'allergène, prédire la maintenance de celle-ci d'une année à l'autre. Ces marqueurs devraient permettre d'ajuster le traitement en fonction de la réponse du patient à l'ITA.

Les principaux critères que doivent remplir ces biomarqueurs sont (i) la simplicité de détection, (ii) une faible variabilité biologique, (iii) de faibles erreurs de mesure et (iv) un lien avec l'efficacité clinique.

Afin d'identifier de tels biomarqueurs, une approche est de comprendre les mécanismes immunologiques de la pathologie ainsi que ceux de son traitement.

2.2 Hypersensibilité de type I et immunothérapie allergénique sublinguale : Mécanismes immunologiques

2.2.1 Les acteurs cellulaires

2.2.1.1 Les basophiles et les mastocytes

Les basophiles et les mastocytes sont issus de la lignée granulocytaire de l'hématopoïèse. Alors que les basophiles ont longtemps été considérés comme les précurseurs des mastocytes, ils appartiendraient, malgré des propriétés communes, à deux lignées distinctes. Les basophiles comme les mastocytes sont des cellules non phagocytaires, qui fonctionnent en libérant des substances actives de leurs granules. Ils expriment les récepteurs FcεRI de forte affinité permettant la fixation des IgE par leur fragment Fc. La fixation d'un allergène sur les IgE liées à ces récepteurs provoque la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques riches en substances pharmacologiquement actives [18, 39, 40].

De plus, il a été démontré dans des modèles murins que les mastocytes dérivés de la moelle osseuse exprimaient FcεRI et les molécules de classe II du CMH, leur conférant un rôle d'APCs via un mécanisme de présentation facilitée par les IgE [41, 42]. Toutefois, selon l'environnement cytokinique, ces mastocytes pourraient favoriser une inflammation allergique via l'expression d'IL-4 [43] ou une polarisation de type Th1 [44].

Les basophiles auraient également un rôle dans la régulation de la polarisation des lymphocytes T CD4. Les basophiles, suite à leur activation et à leur migration dans les

ganglions lymphatiques, favoriseraient une différenciation Th2 via la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 [45-48]. Les basophiles expriment les molécules de classe II du CMH et les molécules de co-stimulation, leur permettant de promouvoir une polarisation Th2 en tant que CPA [49-51]. Toutefois, cette dernière fonction est controversée [52-54].

2.2.1.2 Les éosinophiles

Les éosinophiles sont issus de la lignée granulocytaire de l'hématopoïèse. Ce sont des cellules phagocytaires mobiles qui peuvent migrer du sang vers les espaces tissulaires. Ils jouent un rôle dans la défense contre les parasites. Les substances contenues dans leurs granules pourraient léser la membrane de ces derniers. Les éosinophiles sont également impliqués dans les réactions allergiques, notamment de phase tardive [18, 55]. Les réactions de phase tardive seront évoquées dans un autre chapitre (2.2.2.3).

2.2.1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs), c'est-à-dire qu'elles ont pour rôle d'internaliser l'antigène au niveau des tissus par endocytose ou par phagocytose puis de le dégrader en peptides. Après migration dans les organes lymphoïdes (via les vaisseaux lymphatiques ou sanguins), le peptide dégradé, associé aux molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I ou CHM II), est présenté aux lymphocytes T. Les peptides issus d'antigènes exogènes, comme les allergènes, sont présentés par les molécules de classe II du CMH. Le complexe CMH/peptide alors formé pourra être spécifiquement reconnu par le récepteur des lymphocytes T (TCR), entraînant le déclenchement d'une réponse humorale ou cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T CD4 [18, 56].

Il existe différentes sortes de DCs que l'on peut classer selon leur localisation. On distingue les DCs myéloïdes (mDCs) et plasmacytoïdes (pDCs) circulantes, les DCs du derme présentant différents phénotypes, les DCs de l'épiderme ou cellules de Langerhans (LCs) et les DCs des muqueuses. Parmi les DCs mucosales, ont été décrites les cellules de Langerhans orales (oLCs) qui joueraient un rôle dans la tolérance immunitaire induite par l'ITA sublinguale [57].

2.2.1.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B naissent et mûrissent dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils passent dans le sang, ils sont encore naïfs, mais présentent à leur surface des anticorps membranaires (mIg) qui leur servent de récepteurs à l'antigène. Une rencontre avec l'antigène entraîne de nombreuses divisions cellulaires ainsi qu'une différenciation impliquant des mutations hypersomatiques et des commutations isotypiques. Ces étapes aboutissent à l'obtention de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes. Ces derniers ne possèdent pas d'anticorps membranaires, mais sont capables de sécréter une grande quantité d'anticorps (Ig).

Il existe 5 types d'immunoglobulines issues de la commutation isotypique, qui diffèrent par les séquences peptidiques de leurs chaînes lourdes. On distingue les IgA, IgD, les IgG, les IgM et les IgE. Elles possèdent toutes une région constante Fc ayant des propriétés biologiques diverses et une région variable Fv spécifique de l'antigène. Dans les réactions d'hypersensibilité de type I, ce sont les IgE qui interviennent. La commutation isotypique IgE est induite par l'IL-4 et l'IL-13, toutes deux sécrétées notamment par les lymphocytes Th2 [58, 59].

Chez les individus non allergiques, le taux sérique d'IgE est compris entre 0,1 et 0,4 µg/mL alors que chez les individus atopiques, ce taux équivaut souvent à 10 fois la concentration normale. Cependant, ce n'est pas toujours le cas et cette concentration peut être normale chez des individus atopiques.

Par ailleurs, les lymphocytes B peuvent aussi exercer une fonction de CPA car ils expriment des molécules de classe II du CMH ainsi que les molécules de co-stimulation CD80/CD86 [18].

2.2.1.5 Les lymphocytes T

Les cellules T, cellules mononucléées du sang produites au niveau de la moelle osseuse, interviennent à différents stades de la réponse immunitaire. Leur capacité fonctionnelle nécessite une maturation dans le thymus qui aboutit à la génération de lymphocytes T naïfs. Lors de cette maturation, les cellules acquièrent un récepteur des lymphocytes T (TCR) spécifique d'un complexe CMH/peptide et un co-récepteur CD4 ou CD8 qui permet de différencier respectivement les lymphocytes T effecteurs ou *helpers* (Th), des lymphocytes T cytotoxiques (Tc). Après avoir détaillé le processus d'activation d'un lymphocyte T CD4, nous aborderons les différents types de lymphocytes T CD4 ayant été décrits dans la littérature.

2.2.1.5.1 L'activation des lymphocytes T CD4

La reconnaissance de l'allergène par les lymphocytes T CD4 naïfs spécifiques va induire une activation cellulaire, suivie d'une réponse proliférative et d'une différenciation en cellules effectrices, sécrétrices de cytokines. L'activation d'un lymphocyte T naïf spécifique d'antigène nécessite trois signaux :

- Le premier signal correspond à la reconnaissance du complexe molécule de classe II du CMH/peptide présent à la surface des CPAs par le TCR du lymphocyte T CD4 [60, 61]. Le déclenchement ou non d'une réponse immunitaire à travers ce premier signal fait intervenir trois paramètres : (i) la fréquence des précurseurs spécifiques d'épitopes, (ii) la quantité d'épitopes présentée par les CPAs et (iii) l'avidité des TCRs du lymphocyte pour le complexe molécule de classe II du CMH/peptide (Fig. 2). Le point (ii) sera plus amplement détaillé dans le chapitre 2.3.2.5.2.

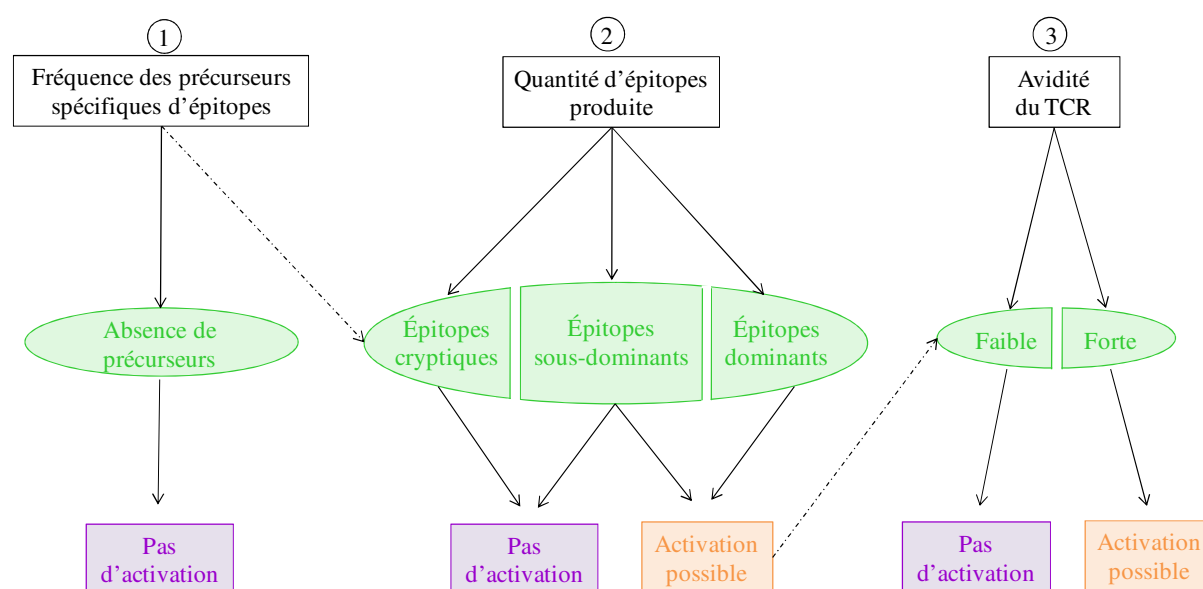


Figure 2 : Les 3 paramètres influençant le déclenchement d'un premier signal efficace :
 1. Fréquence des précurseurs spécifiques d'épitopes, 2. Quantité d'épitopes produite, 3. Avidité des TCR pour le complexe molécule de classe II du CMH/peptide.

- Le deuxième signal est donné par les molécules de co-stimulation exprimées par les CPAs. L'expression des ligands de ces molécules par les lymphocytes T est décisive pour le devenir de la réponse immunitaire. Les plus courants sont CD28 (signal activateur) et CTLA-4 (signal régulateur) qui se lient à CD80 et CD86 exprimés par les DCs matures [60, 62]. Cette liaison induit l'expression de différents marqueurs d'activation aux fonctions diverses, comme

CD154 (CD40L, membre de la superfamille des ligands au TNF- α) [63, 64], CD25 (sous-unité α du récepteur à l'IL-2) [65, 66], CD30 [67], CD137 [68], GITR [69], OX40 (membre de la superfamille des récepteurs du TNF) [70, 71], CD39 (ectonucléotidase) [72, 73], CD69 (membre de la famille des lectines dépendantes du calcium) [60, 61, 69], HLA-DR [60] ou ICOS (famille des récepteurs membranaires de CD28 et CTLA-4) [75-77].

- Le dernier signal met en jeu le microenvironnement cellulaire et cytokinique déterminant la polarisation des lymphocytes T CD4 par les CPAs [61].

2.2.1.6 Les différents types de lymphocytes T CD4

2.2.1.6.1 La polarisation lymphocytaire T CD4

Suite à une rencontre avec l'antigène, les lymphocytes T CD4 naïfs peuvent se différencier en quatre principaux types de lymphocytes T effecteurs: les lymphocytes Th1, Th2, Th17 et lymphocytes T régulateurs (Treg) [78, 79]. Les lymphocytes Th peuvent être divisés en différents groupes selon les cytokines qui orientent leur différenciation, les facteurs de transcription qui régulent l'expression de leurs gènes, la nature des cytokines qu'ils sécrètent et leurs rôles dans la réponse immunitaire (tableau IV).

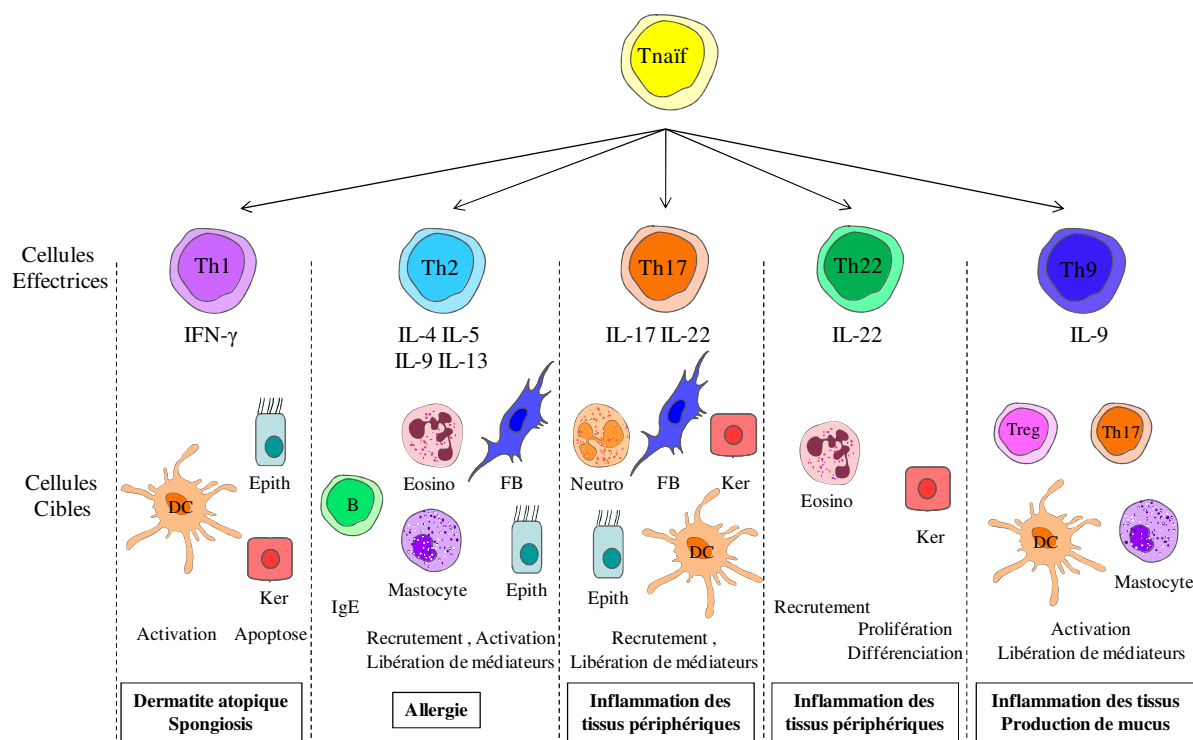


Figure 3 : Les lymphocytes T CD4 effecteurs impliqués dans les allergies et leurs cellules cibles (adapté de [80-86]). (Epith : cellule épithéliale ; Ker : kératinocyte, FB : fibroblaste, DC : cellule dendritique, Eosino : éosinophile ; Neutro : neutrophile).

Les lymphocytes Th1 et Th17 sont impliqués dans la défense contre les pathogènes intracellulaires et dans le développement des maladies auto-immunes. Les lymphocytes Th17 contribuent également aux réponses antifongiques et auraient un rôle dans la physiopathologie des allergies. Ils coordonneraient l'influx de cellules effectrices dans l'inflammation allergique et favoriseraient les réponses de type Th2 [34, 80, 85, 87, 88].

Les lymphocytes Th2 interviennent lors de réponses immunes contre les parasites extracellulaires et sont également impliqués dans les manifestations allergiques et l'asthme. Nous reviendrons sur ce point dans un autre chapitre (2.2.2.1).

Enfin les lymphocytes Treg jouent un rôle dans la tolérance immunitaire, l'homéostasie lymphocytaire et la régulation de la réponse immune. Il en existe deux populations, les Treg naturels (nTreg) et les Treg inductibles (iTreg). Alors que les nTreg se développent dans le thymus, les iTreg sont générés à partir de lymphocytes T naïfs suite à une rencontre avec l'antigène [89].

Par la suite, d'autres lignées de lymphocytes Th, issues des quatre précédentes ont été décrites, comme les lymphocytes Tr1, les lymphocytes Th3 et les lymphocytes Th9.

Les lymphocytes Tr1 se différencieraient à partir des 4 principales lignées, sous l'action de l'IL-10, en cellules régulant négativement différentes réponses immunes via la sécrétion d'IL-10 [90].

Les lymphocytes Th3, impliqués dans l'induction de tolérance orale par la production de TGF- β , seraient issus des lymphocytes Treg. Ils jouent un rôle prépondérant dans la commutation de classe en faveur des IgA [89].

Les lymphocytes Th9, dérivés des lignées Th2, Th17 et Treg, se caractérisent par une production majoritaire d'IL-9. Ils interviendraient dans la physiopathologie des allergies, de l'asthme et seraient impliqués dans la régulation des maladies auto-immunes [83, 91].

Deux dernières catégories de lymphocytes Th ont été décrites, les lymphocytes Th22 prépondérants dans l'homéostasie de la peau [92, 93] et les lymphocytes T folliculaires (Tfh) qui participent à la formation, à l'homéostasie des centres germinatifs et à la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et en lymphocytes B mémoire [94].

Les lymphocytes T CD4 effecteurs impliqués dans les réactions d'hypersensibilités et leurs cellules cibles sont synthétisés dans la Figure 3.

Tableau IV : Propriétés des populations lymphocytaires T CD4 [80-84, 89-101]. (Les caractères en gras correspondent aux marqueurs qui ont fait l'objet de consensus)

	Cytokines de différenciation	Facteurs de transcription	Molécules membranaires	Cytokines effectrices	Cibles cellulaires	Fonctions
Th1 [89, 92, 95]	IFN-γ IL-2 IL-12 IL18 α IL-27	T-bet Stat1 Stat4	CXCR3 CCR5 INF γ -R β IL12-R β 2 IL18-R α	IFN-γ IL-2 LT α Perforin Granzyme A Granzyme B Granulysine TNF- α	Macrophages Cellules NK	Défense contre les bactéries intracellulaires
Th2 [89, 92, 95]	IL-4 IL-2 IL-33	GATA3 Stat5 Stat6 IRF4 cMaf	CRTh2 CCR3 CCR4 CCR8 IL33-R α	IL-4 IL-5 IL-6 IL-13 IL-10 IL-25 IL-9 TNF- α Amphiréguline	Éosinophiles Mastocytes Basophiles Lymphocytes B	Défense contre les parasites Développement des allergies
Th17 [80, 82, 84, 89, 92, 95, 96]	TGF- β 1 IL-6 IL-1 α IL-1 β IL-21 IL-23	RORγt ROR α Stat3 IRF4	CD161 CCR4 CCR6 ICOS IL23-R	IL-17A IL-17F IL-21 IL-22 IL-26 IL-9 CCL20 TNF	Neutrophiles Macrophages	Défenses contre les champignons Induction d'auto-immunité Défense contre les infections extracellulaires Promotions des réponses CTL Participation à l'inflammation allergique
nTreg [89, 99, 101]	IL-2 TGF-β	Foxp3 Smad3 Stat5 Helios	CD127^{low} CD25^{high} CCR4 CD103 Nrp1 PD-1 OX-40 CD137 LAP GITR CCR7 CTLA-4 CD45RA CD39 CD73	IL-10 TGF-β IL-35 IL-9	DCs Lymphocytes T	Induction de tolérance immunitaire Homéostasie lymphocytaire Régulation de la réponse immune

	Cytokines de différenciation	Facteurs de transcription	Molécules membranaires	Cytokines effectrices	Cibles cellulaires	Fonctions
iTreg [89, 99, 101]	IL-2 TGF-β	Foxp3 Smad3 Stat5	CD127^{low} CD25^{high} CD103 OX-40 CD137 GITR CTLA-4	IL-10 TGF-β IL-9	DCs Lymphocytes T	Induction de tolérance immunitaire Homéostasie lymphocytaire Régulation de la réponse immune
Tr1 [89, 90, 92]	IL-4 IL-5 IL-13 IL-25 IL-27	cMaf	ICOS	IL-10	DCs Lymphocytes T	Induction de la tolérance au soi
Th3 [89, 97, 98]	IL-4 TGF- β	?	LAP CD69 TGF β -RII	TGF-β IL-4 IL-8 IL-9 IL-10 IFN- γ	DCs Lymphocytes T Lymphocytes B	Induction de tolérance orale
Th9 [83, 89, 91, 95]	IL-4 IL-10 IL-12 α TGF-β	PU.1 IRF4	TGF β -R IL4-R CTLA-4 Intégrine α E β 7	IL-9 IL-10	Mastocytes Lymphocytes T	Défense contre les helminthiases Développement des allergies Régulation de l'autoimmunité
Th22 [82, 84, 92, 93, 95]	IL-6 TNF	AHR	CCR4 CCR6 CCR10	IL-22 TNF	Kératinocytes Eosinophiles	Homéostasie de la peau Induction d'asthme et de dermatite atopique
Tfh [92, 94]	IL-21	Bcl-6 Stat3 cMaf	CXCR5 SAP SLAM-R	IL-21 CXCL13 IL-4	Lymphocytes B	Production d'anticorps

2.2.1.6.1.1 La mémoire lymphocytaire T CD4

Suite à la première rencontre avec l'antigène aboutissant à une réponse effectrice aigüe capable d'évincer l'agent pathogène, une mémoire immunitaire se met en place afin de réagir plus rapidement et plus intensément lors d'une deuxième agression. Cette mémoire immunitaire se traduit par la génération de lymphocytes T mémoires. Il en existe deux types : les lymphocytes T CD4 « mémoire centrale » et les lymphocytes T « mémoire effectrice ». Les lymphocytes T CD4 « mémoire centrale » ne présentent pas de profil de polarisation distinct, expriment CCR7 (marqueur de homing des organes lymphoïdes secondaires), participent à l'activation des DCs et sont capables de se différencier en cellules effectrices suite à une stimulation ultérieure. Les lymphocytes T CD4 « mémoire effectrice » se caractérisent phénotypiquement par une polarisation bien définie (Th1, Th2 ou Th17),

l'absence d'expression de CCR7 et des fonctions effectrices immédiates lors d'une seconde stimulation [102, 103]. Ce dernier type de lymphocytes T mémoire peut être divisé en trois sous-populations basées sur l'expression de CD27 et CD28. On distingue les lymphocytes T CD4 « mémoire effectrice » en stade de différenciation précoce ($CD27^+/CD28^+$), intermédiaire ($CD27/CD28^+$) et terminale ($CD27/CD28^-$) dont la capacité à sécréter des cytokines effectrices décroît avec la perte d'expression de ces marqueurs [104, 105].

2.2.2 Mécanismes de l'allergie

La réaction d'hypersensibilité de type I se déroule en deux phases. La phase de sensibilisation se produit lors du premier contact avec l'allergène. Elle est suivie par une phase effectrice qui a lieu suite à une deuxième rencontre avec l'allergène (Fig. 4).

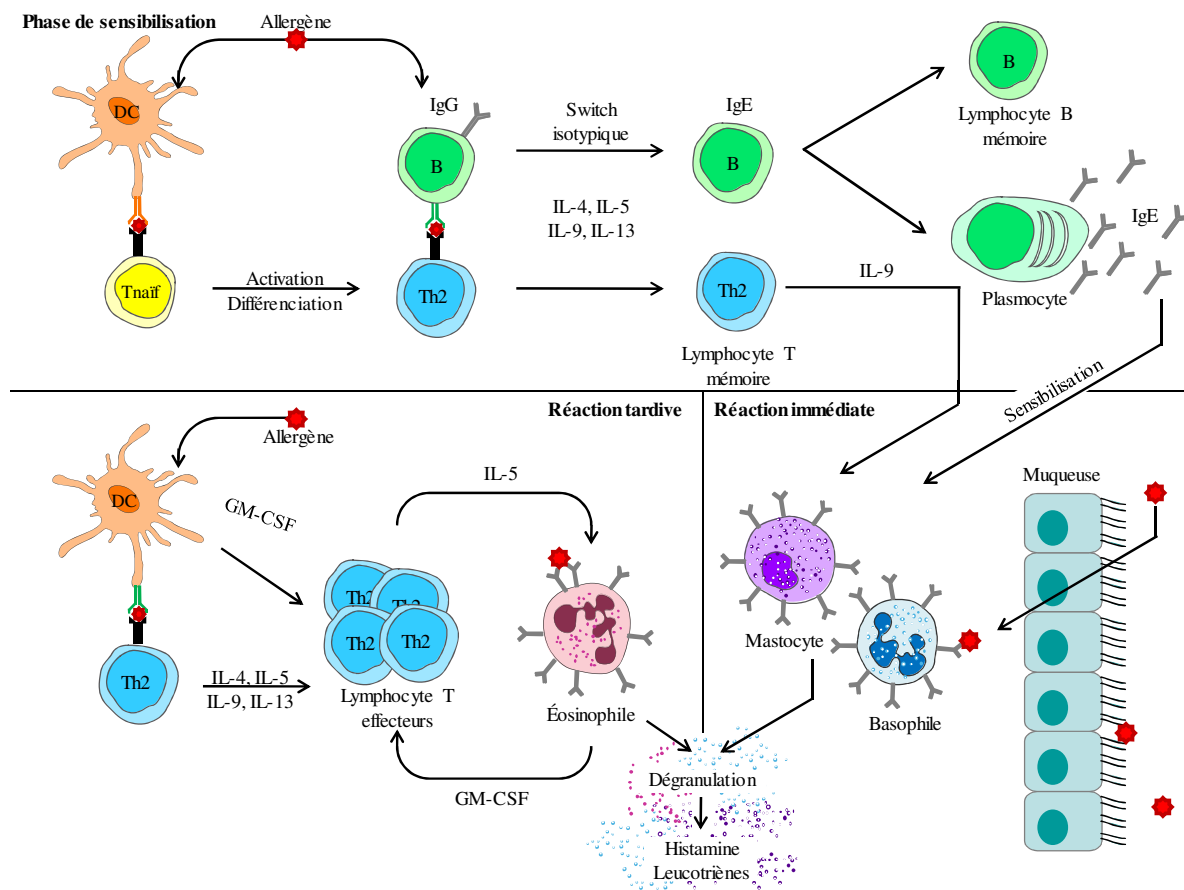


Figure 4 : Mécanismes de l'hypersensibilité de type I (adapté de [6]). Phase de sensibilisation : l'allergène rencontre les CPAs qui le présentent aux lymphocytes T naifs. L'activation de ces lymphocytes conduit à la mise en place d'une réponse CD4 Th2. Ces derniers activent les lymphocytes B naifs spécifiques de l'allergène. Parallèlement, les lymphocytes B peuvent être directement activés par l'allergène. Ces deux voies d'activation entraînent la différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoire et en

plasmocytes, avec une commutation isotypique en faveur des IgE. Ces IgE se lient aux récepteurs FcεRI exprimés par les mastocytes et les basophiles, et les sensibilisent. Réaction immédiate : lors d'un second contact avec l'allergène, ce dernier se fixe sur les IgE des basophiles et des mastocytes sensibilisés et entraîne leur dégranulation. Réaction tardive : les substances produites suite l'activation des lymphocytes Th2 induite par la rencontre de l'allergène avec les CPAs ainsi que les substances libérées lors de la dégranulation de réaction immédiate entraînent le recrutement et activent les éosinophiles qui à leur tour dégranulent.

2.2.2.1 Phase de sensibilisation

La phase de sensibilisation débute lors de la première introduction de l'allergène dans l'organisme. C'est en particulier au niveau des muqueuses du tractus respiratoire qu'il rencontre les CPAs préalablement recrutées par les substances libérées par les cellules épithéliales. La présentation de l'allergène par les CPAs aux lymphocytes T CD4 conduit à la mise en place d'une réponse Th2 majoritaire, avec une forte sécrétion de cytokines, notamment d'IL-4, d'IL-5, d'IL-9 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2. Ces derniers activent les lymphocytes B naïfs spécifiques de l'allergène. Parallèlement, les lymphocytes B peuvent être directement activés par la fixation de l'allergène sur leurs mIg spécifiques. Ces deux voies d'activation entraînent, au niveau des centres germinatifs, la différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoire et en plasmocytes, avec une commutation isotypique en faveur des IgE. Cette réponse immunitaire génère, en 7 à 15 jours après le contact avec l'allergène, des plasmocytes mémoire à IgE, des IgE anti-allergène qui diffusent dans tout l'organisme, des lymphocytes Th2 et des lymphocytes B spécifiques d'allergènes. Les IgE se lient via leur fragment Fc aux récepteurs FcεRI exprimés par les mastocytes et les basophiles et vont ainsi les sensibiliser [6, 18, 106]. Cette étape prépare l'organisme à réagir immédiatement lors d'un second contact avec l'allergène.

2.2.2.2 Phase effectrice

2.2.2.2.1 Phase immédiate

Lors d'une seconde exposition au même allergène, ce dernier se retrouve en contact avec les muqueuses où il rencontre les mastocytes, puis les basophiles et les éosinophiles sensibilisés circulants qui peuvent être recrutés secondairement dans les tissus. Les cellules sensibilisées fixent l'allergène par les IgE ancrées sur leurs FcεRI. La fixation d'allergènes multivalents assure le pontage des IgE liées au FcεRI, déclenchant l'agrégation des récepteurs, leur

activation puis la transduction du signal. Cela aboutit à la dégranulation cellulaire, à la libération et à la synthèse de molécules pro-inflammatoires [106].

Il existe deux types de médiateurs relargués lors de la dégranulation des mastocytes et des basophiles : (i) les médiateurs primaires synthétisés avant la libération des granules et stockés dans ces derniers comme l'histamine et diverses protéases (tryptase, chymotryptase, carboxypeptidase, kininogénase) et (ii) les médiateurs secondaires produits après activation de la cellule cible (cytokines et chimiokines), ou issus du métabolisme des phospholipides membranaires lié au processus de dégranulation (leucotriènes, prostaglandine D2 (PGD2), thromboxane A2 (TBXA2), facteur d'activation des plaquettes (PAF)). Les symptômes provoqués par ces dernières apparaissent dans les minutes qui suivent la dégranulation.

Brièvement, l'œdème des voies respiratoires se traduit par des rhinorrhées et une congestion nasale provoquée par l'ensemble de ces substances. L'histamine, les leucotriènes et les PGD2 entraînent une bronchoconstriction. L'hypersécrétion de mucus est engendrée par les leucotriènes et les chymases. Les autres protéases sont à l'origine de l'activation de cascades protéiques responsables de dommages tissulaires. Ces médiateurs sont également responsables du recrutement, au niveau du foyer inflammatoire, de cellules impliquées dans la phase tardive. Les leucotriènes B₄ mobilisent les neutrophiles et les éosinophiles. Alors que l'IL-5 et le GM-CSF attirent et activent les éosinophiles, l'IL-3 et l'IL-5 mobilisent les basophiles. Enfin, l'IL-4, l'IL-13 et le TNF- α entraînent l'augmentation de l'expression des molécules d'adhérence sur les cellules endothéliales, ce qui facilite l'infiltration des leucocytes au niveau des tissus [18, 89, 106, 107]. Des chimiokines comme CCL2, CCL4, CCL5, CXCL8 et CXCL10 vont participer au recrutement de lymphocytes T, de basophiles, d'éosinophiles et de neutrophiles [108].

L'ensemble des propriétés des substances pharmacologiquement actives libérées lors de la dégranulation sont répertoriées dans le tableau V.

Tableau V : Fonctions des médiateurs libérés lors de la réaction allergique [adapté de 13, 92].

(↑ : augmentation)

Médiateurs	Actions
Histamine	↑ Perméabilité vasculaire, vasodilatation, ↑ production de mucus, bronchoconstriction, activation des neurones nociceptifs
Protéases	Domages tissulaires, activation de protéines précurseurs, ↑ production de mucus, génération de bradykinine
Leucotriènes B₄, C₄, D₄	↑ Perméabilité vasculaire, ↑ production de mucus, bronchoconstriction, recrutement des éosinophiles et des neutrophiles (B ₄), ↑ molécules d'adhérence sur les leucocytes (B ₄)
PGE2	↑ Perméabilité vasculaire, bronchoconstriction
TBXA2	Bronchoconstriction
IL-3	Agents chimiotactiques des basophiles
IL-4	↑ Commutation isotypique IgE, ↑ différenciation Tnaïf en Th2, ↑ molécules d'adhérence sur l'endothélium, ↑ production de mucus
IL-5	↑ Prolifération et différenciation, facteur chimiotactique des basophiles et des éosinophiles
IL-9	↑ Croissance des mastocytes et des basophiles, ↑ expression du récepteur FcεRI, ↑ production de mucus
IL-13	↑ Commutation isotypique IgE, ↑ différenciation Tnaïf en Th2, ↑ molécules d'adhérence sur l'endothélium, ↑ production de mucus, ↑ HRB
GM-CSF	↑ Prolifération des granulocytes, ↑ perméabilité vasculaire, facteur chimiotactique des éosinophiles et des neutrophiles
TNF-α	↑ Molécules d'adhérence sur l'endothélium, facteur pro-inflammatoire

2.2.2.3 Phase tardive

Les médiateurs libérés lors de la réaction immédiate induisent une réaction de phase tardive. Elle commence à se développer 4 à 6 heures après la réaction de type I initiale et persiste pendant 1 ou 2 jours. Les substances comme l'IL-4 et le TNF-α, libérées lors de la dégranulation des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles pendant la phase immédiate entraînent l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence, comme VCAM1, par l'endothélium. Elles provoquent aussi la sécrétion des chimiokines CCL11, CCL24 et CCL26 par les cellules épithéliales dont le récepteur CCR3 est présent sur les mastocytes, les

basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes Th2. L'ensemble de ces événements favorisent le recrutement et la différenciation des cellules effectrices au niveau de la sous-muqueuse, de l'épithélium et de la lumière des voies respiratoires. Cette phase est principalement caractérisée par une infiltration d'éosinophiles mais aussi de neutrophiles, de macrophages, de lymphocytes Th2 et de basophiles dans les tissus [18, 106].

La dégranulation des éosinophiles entraîne la libération de médiateurs de l'inflammation, en particulier de leucotriènes, de protéines basiques majeures, de PAF, de protéines cationiques (ECP) et de neurotoxines dérivées des éosinophiles (EDN). Ces médiateurs contribuent à des lésions tissulaires étendues participant à l'inflammation chronique des muqueuses bronchiques qui caractérise l'asthme persistant. Ce phénomène ne se produit pas au niveau de la muqueuse nasale [18, 109].

Les neutrophiles possèdent aussi un rôle essentiel dans la phase tardive. Ils sont attirés vers la zone où s'effectue la réaction allergique par le facteur chimiotactique des neutrophiles libéré par les mastocytes en cours de dégranulation. De plus, de nombreuses chimiokines comme CXCL8 sont libérées au niveau du site inflammatoire, participant à l'activation des neutrophiles. Il en résulte une dégranulation libérant enzymes lytiques, PAF et leucotriènes [18].

Bien que de nombreux acteurs cellulaires soient impliqués dans la réaction allergique, c'est la présentation de l'allergène aux lymphocytes T CD4 qui détermine la suite des événements. C'est à ce moment qu'une réponse Th2 dominante est enclenchée et provoque les réactions en chaîne de l'allergie. Toutefois, les allergènes, selon le contexte dans lequel se déroule la reconnaissance antigénique, peuvent induire différents types de polarisation.

2.2.2.4 Les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes

Auparavant, l'hypothèse du développement ou non d'une allergie reposait sur l'absence ou la présence de réponse à l'allergène respectivement chez les individus sains et allergiques. En réalité, tout le monde développe des réponses spécifiques d'allergènes, mais de nature différente. Il est aujourd'hui avéré que les patients allergiques développent une réponse spécifique d'allergène de profil Th2, alors qu'il s'agit préférentiellement d'une réponse Th1/Treg chez les sujets sains, quel que soit l'allergène incriminé [110-118]. Ceci a d'abord été démontré suite à une stimulation spécifique des lymphocytes T CD4 totaux par dosage des cytokines dans les surnageants [113, 114, 119], par ELISpot [113-115, 119] ou par détection intracellulaire [110-112, 116-118]. Ces données ont ensuite été confirmées plus

spécifiquement par l'étude des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes via une détection par des tétramères de molécules de classe II du CMH [120-125]. Cette technologie a également permis de déterminer que la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes circulants chez les individus sains était moindre que celle des allergiques [120, 121, 124, 125]. Par ailleurs, il a récemment été démontré que les taux d'IL-17 sérique [126, 127] et que la proportion de lymphocytes T CD4 suite à une stimulation allergénique *in vitro* était plus élevée chez les patients allergiques que chez les sujets sains [87, 88, 128]. Une fréquence *ex vivo* plus importante de lymphocytes T CD4 coproduisant de l'IFN- γ et de l'IL-17 a également été décrite chez les sujets allergiques *versus* sains [87]. Ces éléments introduisent de nouvelles informations quant aux réponses spécifiques d'allergènes. De plus, il semblerait que la fréquence et la propension des lymphocytes T CD4 à proliférer *in vitro* suite à une stimulation allergénique soit plus élevée chez les individus atopiques que chez les non-atopiques [111-113, 116, 119, 129, 130].

Les analyses des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec les tétramères de molécules de classe II du CMH chez les patients allergiques s'accordent sur le fait que ces derniers sont majoritairement « mémoire » (*versus* naïfs) avec une prédominance des lymphocytes T CD4 « mémoire effectrice » par rapport aux lymphocytes T CD4 « mémoire centrale » [120-123, 125]. Il a aussi été montré qu'il peut parfois s'agir d'une réponse « mémoire centrale » [120]. Il semblerait que les individus allergiques aux pollens de bouleau présentent une réponse majoritairement « mémoire effectrice » alors qu'il s'agit d'une réponse « mémoire centrale » chez les sujets sains [125]. Cependant, ces réponses sont équivalentes dans une étude sur les réponses lymphocytaires T CD4 aux squames de vaches [122].

Bien que le type de réponse lymphocytaire T CD4 spécifique d'un allergène ne dépende pas uniquement du statut allergique *versus* sains, mais aussi de la nature de l'allergène, on ne sait pas exactement par quels mécanismes les individus allergiques privilégient une réponse Th2 alors que les individus sains manifestent préférentiellement une réponse Th1/Treg. Tandis que certaines études incriminent l'altération de la génération [131, 132] ou des propriétés fonctionnelles des lymphocytes Treg [119, 133-136] chez les sujets atopiques, d'autres mettent en cause une déficience des lymphocytes Tr1 [118, 137-140]. Certaines études révoquent également l'implication des Treg dans les réponses protectrices contre les allergènes [141-143].

Cela soulève la nécessité de déterminer quels moyens le système immunitaire met en place pour induire une tolérance vis-à-vis d'un allergène.

2.2.2.5 Les mécanismes d'induction de tolérance

L'induction de tolérance immunitaire se définit comme l'ensemble des mécanismes qui permettent d'inhiber spécifiquement et durablement une réponse immune vis-à-vis d'un antigène ou de reprogrammer une réponse immunitaire pathologique (par exemple induction d'une réponse de type Th1 à la place d'une réponse Th2 nocive). Elle peut être induite au niveau central ou périphérique. La tolérance centrale permet au système immunitaire d'éliminer les lymphocytes T auto-réactifs au cours de leur développement dans le thymus par des mécanismes faisant intervenir un processus de sélection négative ou des lymphocytes Treg. La tolérance périphérique intervient au niveau des organes lymphoïdes secondaires et/ou dans les tissus via l'ignorance, l'anergie, la délétion clonale et l'action de lymphocytes Treg. Nous nous focaliserons ici sur les mécanismes de la tolérance périphérique.

2.2.2.5.1 L'ignorance

L'ignorance décrit la coexistence de lymphocytes T naïfs potentiellement auto-réactifs et de leur antigène cible dans les tissus périphériques. L'antigène que reconnaissent spécifiquement ces lymphocytes T est présenté en très faible quantité par les cellules qui l'expriment. Dans les conditions physiologiques normales, les lymphocytes T rencontrent cet antigène dans un contexte non-inflammatoire, aboutissant à une non-réponse des lymphocytes. En revanche, si ces lymphocytes T rencontrent de grandes quantités de cet antigène dans des conditions inflammatoires, ils vont s'activer et détruire les cellules exprimant cet antigène [144, 145]. Une faible avidité des TCRs d'un lymphocyte T spécifique de cet antigène peut également aboutir à un phénomène d'ignorance [146].

2.2.2.5.2 L'anergie

L'anergie se définit comme l'incapacité d'un lymphocyte T CD4 à s'activer, à proliférer, à sécréter des cytokines et à donner naissance à des cellules effectrices et mémoires, suite à une stimulation via son TCR [147, 148]. C'est l'absence de signaux de co-stimulation qui induit une anergie de ces lymphocytes T CD4 [149]. La déplétion de l'environnement en tryptophane peut également induire une anergie lymphocytaire. L'expression d'IDO (enzyme

limitante dans le catabolisme du tryptophane) par les macrophages activés ou les DCs, entraîne une carence de cet acide aminé aboutissant à l'arrêt de la prolifération et de l'activité lymphocytaire [150, 151].

2.2.2.5.3 La délétion clonale

La délétion clonale périphérique résulte de l'induction d'apoptose. Elle peut être médiée par l'engagement de la voie Fas (Fragment inducteur d'apoptose) (Fas sur les lymphocytes T et FasL sur les CPAs) ou par différents mécanismes aboutissant à l'AICD (*Activation-induced cell death*). La stimulation chronique de lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes peut également induire une délétion par épuisement. Ce phénomène est observé dans les phases tardives des infections chroniques ou de croissance tumorale [152, 153].

2.2.2.5.4 L'immuno-déviatio n via les lymphocytes Treg

Plusieurs mécanismes, incluant la sécrétion de cytokines et le contact cellulaire ont été décrits expliquant la fonction suppressive des lymphocytes Treg. Ces mécanismes peuvent être regroupés en 4 « modes d'action » principaux (Fig. 5):

- Suppression au niveau de l'interaction DC/lymphocyte T reposant notamment sur les effets immuno-modulateurs des molécules CTLA-4, TGF- β , IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) et LAG-3 (*lymphocyte-activation gene 3*) [154]. Ce mécanisme inhiberait alors la maturation et la fonction des cellules dendritiques.
- Suppression par sécrétion locale de cytokines inhibitrices : IL-10, TGF- β et IL-35 [155]
- Suppression induite par une perturbation métabolique (compétition locale pour les facteurs de croissance). Les cellules Treg, par leur très forte expression du récepteur de haute affinité à l'IL-2 (CD25), consommeraient plus rapidement l'IL-2 environnante indispensable à la survie et à la prolifération des cellules, que les cellules T effectrices [156, 157].
- Un quatrième mécanisme a été récemment proposé, impliquant la libération de l'adénosine et l'action des molécules CD39 et CD73. Ces deux ectonucléotidases seraient impliquées dans la libération de l'adénosine en surface des cellules Treg, activant le récepteur 2A de l'adénosine ($A_{2A}R$) présent à la surface des cellules T effectrices [72, 158-160]. L'activation du récepteur $A_{2A}R$ aurait un effet suppressif sur les lymphocytes T effecteurs. De plus, cette activation induirait le développement des Treg par l'induction de la sécrétion de TGF- β et

l'inhibition de l'expression de l'IL-6, cytokine connue pour inhiber le développement des Treg au profit des Th17 [161, 162]. Toutefois, ces hypothèses restent controversées.

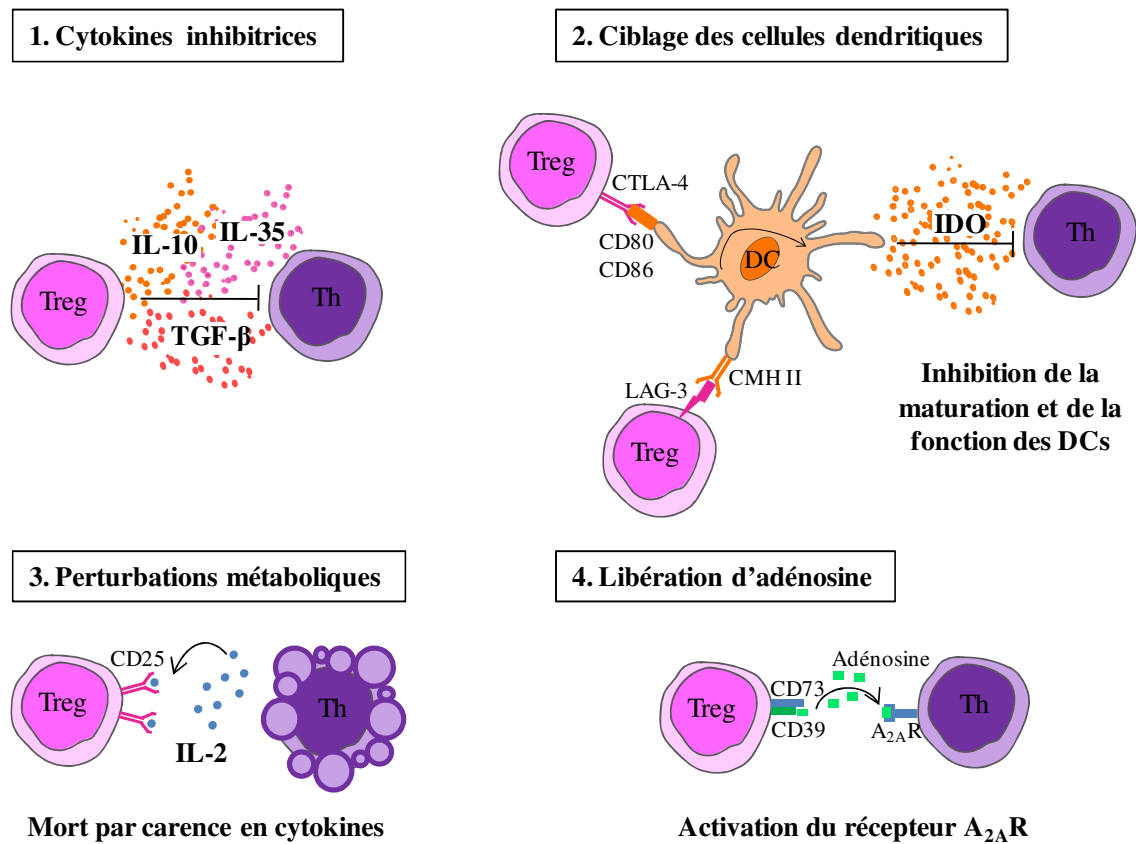


Figure 5 : Modes d'action des lymphocytes Treg (d'après [155]). Les lymphocytes Treg peuvent agir selon 4 modes d'action : 1. La sécrétion de cytokines, 2. L'inhibition de la maturation et des fonctions des DCs, 3. La perturbation métabolique et 4. La libération d'adénosine. Toutefois, ces mécanismes restent controversés.

2.2.3 Mécanismes de l'immunothérapie allergénique

Du fait de son antériorité, les mécanismes d'action de l'ITA sous-cutanée ont été plus étudiés que ceux de l'ITA sublinguale. Alors que l'efficacité des 2 voies d'administration est similaire [163], leurs mécanismes d'action ne sont pas clairement identifiés et aucun consensus n'a été établi, du fait de la non uniformité des observations. Ces divergences peuvent s'expliquer, entre autres, par des questions de méthodologie, comme la diversité des protocoles de traitements (allergènes et doses), l'inclusion d'un petit nombre de patients, une absence de groupe contrôle placebo et de double aveugle. Par ailleurs, alors que les techniques de dosages des immunoglobulines permettant de suivre les réponses humorales sont parfaitement maîtrisées, il est plus délicat de standardiser les méthodes relatives à

l'approche cellulaire. La faible fréquence, notamment des DCs et des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes, et le manque d'outils pour les suivre précisément, limitent la détection et l'étude de ces cellules. La variabilité inter-patient liée aux diversités génétiques et environnementales augmente également la difficulté de standardisation des essais cellulaires. Malgré tout, il semblerait que leurs modes d'action soient assez voisins, en agissant sur les cellules effectrices, les CPAs, la réponse humorale et les lymphocytes T CD4. (Fig. 6).

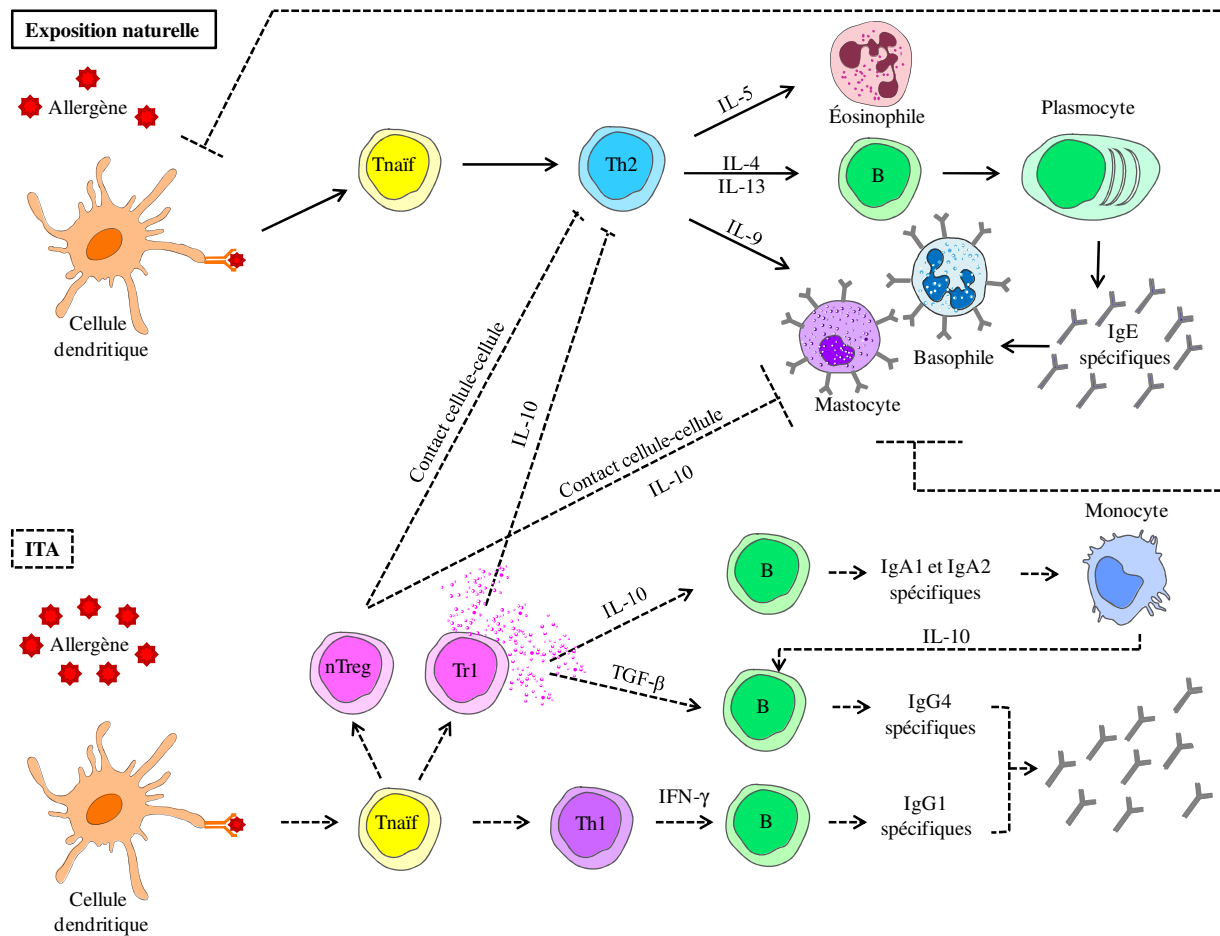


Figure 6 : Mécanismes de l'immunothérapie allergénique (adapté de [164]). L'ITA induirait des lymphocytes nTreg et Tr1 qui inhibent les basophiles, les mastocytes et la réponse Th2 via un contact cellule-cellule et/ou la sécrétion d'IL-10. Ces mêmes lymphocytes Tr1, en produisant du TGF-β et de l'IL-10, entraînent respectivement une commutation isotypique en faveur des IgG4 et des IgA1/IgA2, anticorps aux pouvoirs bloquants. Ces derniers sensibilisent de manière passive les monocytes provoquant une sécrétion d'IL-10, capable d'agir sur la commutation isotypique en faveur des IgG4. Enfin, l'ITA induit une polarisation des lymphocytes T naifs en lymphocytes Th1 produisant de l'IFN-γ qui induit une commutation isotypique en faveur des IgG1. Les IgG1 et les IgG4 sécrétées agissent sur les basophiles et les mastocytes en inhibant la libération d'histamine, ainsi que sur les DCs en inhibant la présentation IgE facilitée. (—) Mécanismes de l'allergie, (---) Mécanismes de l'ITA, (→) Induction, (—|) Inhibition.

2.2.3.1 Effets sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles

L'ITA serait capable d'augmenter très précocement le seuil d'activation des mastocytes et des basophiles nécessaires à la dégranulation suite à la libération progressive de l'histamine et des leucotriènes, en dessous du seuil d'anaphylaxie systémique [165-167]. Par la suite, l'effet supprimeur de l'ITA sur les mastocytes et les basophiles serait lié à la diminution du taux d'IgE spécifiques et à l'induction de lymphocytes Treg allergène-spécifiques sécrétant de l'IL-10. Cette cytokine serait capable de réduire significativement la densité et la croissance des mastocytes, la concentration locale d'histamine et d'inhiber la dégranulation [168]. De plus, les lymphocytes Treg sont capables d'inhiber la dégranulation des mastocytes médiée par le FcεRI via un contact cellulaire impliquant l'interaction OX40/OX40-L [169-172].

Les facteurs d'adhérence et chimiotactiques des éosinophiles et des neutrophiles ainsi que le recrutement de ces derniers au niveau des organes cibles seraient réduits suite aux expositions allergéniques consécutives à l'ITA. Une diminution des taux locaux et sériques d'ECP a également été observée [171, 173-175]. Bien que ces phénomènes aient déjà été corrélés à l'efficacité clinique de l'ITA dans certaines études [176, 177], d'autres études ne sont pas parvenues à de telles conclusions [178].

Par ailleurs, l'IL-10 sécrétée par les lymphocytes T pourrait être à l'origine d'une réduction de l'activité des éosinophiles [176].

Les observations relatives aux cellules effectrices de l'immunité innée s'accordent à dire, dans la majorité des cas, que l'ITA induit une diminution de l'activité des basophiles, des mastocytes et des éosinophiles, entraînant une réduction précoce des symptômes.

2.2.3.2 Effets sur les DCs

Alors que les DCs jouent un rôle majeur dans l'initiation de l'allergie, leurs implications dans l'efficacité de l'ITA sous-cutanée ont été moins étudiées que dans l'ITA sublinguale où elles semblent avoir un rôle prépondérant.

Les fonctions de l'immunité innée des DCs médiées par le TLR9 sont altérées chez les individus allergiques. Elles seraient restaurées chez les pDCs de patients ayant reçu une ITA aux acariens [179]. Par ailleurs, la proportion de ces pDCs périphériques est significativement diminuée suite à une désensibilisation aux venins d'hyménoptère [180]. Ainsi, ces

changements induits par l'ITA sous-cutanée pourraient contribuer à la suppression de l'inflammation allergique [164, 174].

Dans l'ITA sublinguale, une étude révèle qu'après un an d'ITA aux acariens, la capacité des DCs matures du sang à sur-exprimer CD86 et à produire de l'IL-12 est altérée, alors que leur sécrétion d'IL-10 est augmentée [181]. Une autre étude menée sur des biopsies mucosales post-mortem, démontre que Phl p 5, allergène de pollens de graminées est pris en charge par des oLCs via un mécanisme de présentation facilitée par les IgE. Ce mécanisme est médié par FcεRI, récepteur aux IgE exprimé à leur surface [182, 183]. L'engagement de FcεRI favoriserait la sécrétion d'IL-10 et de TGF-β, augmentant la production d'IDO et aboutissant à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T. De plus, les oLCs capturant l'allergène présenteraient des similitudes avec les DCs aux propriétés tolérogènes [57, 174, 183, 184]. Ainsi, la muqueuse orale semble entraîner une induction de tolérance envers les allergènes [174, 183, 185].

Il semblerait que les DCs soient impactées par l'ITA. Alors que les oLCs de la muqueuse orale joueraient un rôle dans l'induction de tolérance générée par l'ITA sublinguale, les DCs y participeraient à un degré moindre dans l'ITA sous-cutanée.

2.2.3.3 Effets sur la réponse humorale

La réponse humorale se caractérise essentiellement par la production d'anticorps. Elle est évaluée par le dosage des immunoglobulines spécifiques de l'allergène.

L'ITA sous-cutanée est connue pour induire au niveau systémique et des organes cibles une augmentation transitoire et précoce des IgE spécifiques des allergènes contre lesquels le patient se désensibilise [25, 186-201]. Cette augmentation peut s'expliquer par la différenciation des lymphocytes B mémoire, générés lors des précédentes expositions aux allergènes incriminés, en plasmocytes sécrétant des IgE. Dans le cas des allergies saisonnières, lors de la saison pollinique consécutive au traitement, cette sécrétion d'IgE est fortement altérée, l'ITA entraînant la génération de lymphocytes B spécifiques d'allergènes à IgG1 et à IgG4 [186-190]. Les augmentations locales et systémiques significatives d'IgG1 et d'IgG4 observées dans la majorité des études d'ITA [25, 139, 191-211], sont probablement liées à la sécrétion d'IFN-γ, d'IL-10 et de TGF-β par les lymphocytes T CD4. Ces cytokines sont connues pour entraîner une commutation isotypique en faveur des IgG1 et des IgG4 [164, 190, 212, 213]. Malgré ces fortes variations, les études menées n'ont pas mis en évidence un lien de cause à effet strict entre la concentration en IgG1/IgG4 et l'efficacité

clinique de l'ITA [111, 112]. Ces anticorps agiraient comme facteur bloquant en entrant en compétition directe avec les IgE pour la liaison avec l'antigène [192, 196, 199, 214]. Il en résulterait une inhibition de l'histamino-libération des basophiles [215, 216] et de la présentation des antigènes facilitée par les IgE [208, 217-220].

Deux études d'ITA aux pollens de graminées ont révélé une élévation des taux d'IgA2 monomériques et polymériques spécifiques d'allergènes. Cette commutation isotypique en faveur des IgA1 et des IgA2 serait provoquée par une sécrétion de TGF- β par les lymphocytes T et les CPAs. Par ailleurs, en présence d'allergènes, la sensibilisation passive de monocytes avec des IgA2 polymériques issus de sera de patients traités par ITA, entraîne la co-agrégation de ces immunoglobulines et provoque une sécrétion d'IL-10 [220, 221]. Ce phénomène pourrait être une autre source d'IL-10 à l'origine de la commutation isotypique en faveur des IgG4 [164].

Ces variations sont souvent plus marquées dans l'ITA sous-cutanée que dans l'ITA sublinguale [163].

2.2.3.4 Effets sur les lymphocytes T CD4

L'étude des réponses lymphocytaires T CD4 induites par l'ITA (sous-cutanée ou sublinguale) aboutit à 2 mécanismes hypothétiques qui agiraient de manière concomitante, séquentielle, ou indépendante : (i) l'immuno-déviations Th2 vers Th1, (ii) l'induction d'anergie et/ou de délétion médiée ou non par des lymphocytes T CD4 aux propriétés régulatrices. Toutefois, d'une étude à l'autre, les observations sont très hétérogènes et ne permettent pas d'établir un mécanisme consensuel. Cela est probablement lié à la difficulté de suivre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes. De plus, les études relatives à l'étude des réponses T incluent souvent un petit nombre de patients ($n < 15$) [139, 222-228], ou n'ont pas de groupe placebo (le groupe contrôle correspond à des patients sains ou allergiques non traités) [139, 163, 225, 227, 229-232], voire pas de groupe contrôle [222, 233-236]. Parmi ces études, seule une minorité est réalisée en double aveugle [224, 230, 237-240].

Généralement, l'analyse des réponses T CD4 consiste à évaluer l'effet d'une stimulation allergénique sur les PBMCs.

Après avoir détaillé l'impact de l'ITA sur les réponses lymphocytaires T CD4 au niveau périphérique, puis au niveau des organes cibles, nous évoquerons comment ces effets peuvent être générés.

L'hypothèse de l'immuno-déviaton repose sur l'augmentation du ratio de cytokines Th1 (IFN- γ)/Th2 (IL-4 ou IL-5 ou IL-13) [163, 222, 224, 233, 234, 238, 241-243]. Toutefois, certaines études ne mettent pas en évidence ces variations [223, 236, 239, 244, 245].

L'anergie est évaluée, par extrapolation, par une diminution de la prolifération cellulaire ou de la production de cytokines effectrices (Th2 $\pm$ Th1) en réponse à l'allergène [228, 230, 237, 240, 246-248], mais de telles modifications ne sont pas toujours détectées [223, 228, 229, 231, 242, 248, 249]. L'hypothèse de la délétion clonale est associée à l'induction d'apoptose des lymphocytes Th2 suite à une stimulation allergénique ou polyclonale [250, 251], ou à une diminution de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes identifiés à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH [226, 252]. Toutefois, le moyen le plus adapté pour évaluer des phénomènes d'anergie ou de délétion est la détection des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes associée à des analyses fonctionnelles. Des études suggèrent que ces phénomènes seraient induits grâce à la génération de lymphocytes T CD4 aux propriétés régulatrices, c'est-à-dire les lymphocytes Treg [222, 224, 241, 253], Tr1 [225, 228, 232, 248] ou iTreg [230], via la sécrétion de cytokines régulatrices comme l'IL-10 [139, 222, 228, 232, 238, 246, 248, 254, 255] et/ou le TGF- β [139, 224, 235]. En effet, l'IL-10 est capable de diminuer *in vitro* les cytokines Th1, Th2 et d'induire l'anergie de lymphocytes T effecteurs [246, 256, 257]. L'activité suppressive des lymphocytes Treg est aussi associée à la production de TGF- β , cytokine impliquée dans la régulation de la prolifération des lymphocytes T [246, 258]. Cependant, il n'est pas toujours prouvé que ces cytokines sont produites par les lymphocytes T CD4 car elles sont dosées dans les surnageants de culture de PBMCs [224, 229, 238, 259, 260]. De plus, des études révoquent également l'impact de l'ITA sur les lymphocytes Treg [232, 240].

Certaines études ont évalué les réponses lymphocytaires T CD4 à différents stades du traitement. La baisse de la sécrétion des cytokines Th2 [227, 228, 243, 248] et l'augmentation de la production de TGF- β [224] sont observées précocement (<6 mois), alors que l'IFN- γ serait sécrété plus tardivement (>6 mois) [222, 224]. L'augmentation de la production d'IL-10 est détectée plus ou moins précocement selon les études [222, 224, 235, 244]. Ces données suggèrent que les cinétiques d'induction/inhibition sont différentes et plus ou moins transitoires d'une cytokine à l'autre.

L'ITA agirait également sur les lymphocytes Th17, dont le rôle dans la physiopathologie des allergies a récemment été démontré [87]. Alors qu'une étude d'ITA aux pollens d'arbres

révèle que l'augmentation d'IL-17 est associée à une faible efficacité clinique [241], une autre étude rapporte que la diminution d'IL-17, corrèle avec l'efficacité de l'ITA [261]. Aucune influence du traitement sur les réponses Th9 et Th22 n'a été mise en évidence.

Comme les réponses T périphériques ne reflètent pas forcément les réponses locales, il est pertinent d'observer les modifications induites par l'ITA au niveau des organes cibles. Des études d'ITA sous-cutanée ont été réalisées sur biopsies ou sécrétions nasales. Il est détecté une augmentation de la production d'IFN- γ [262] concomitante ou non à la diminution de l'expression d'IL-5 [242, 263] et d'IL-9 [264] pendant les saisons polliniques de graminées consécutives au traitement. Deux de ces études révèlent une augmentation du ratio Th1/Th2 au niveau local, sans détecter de modification des réponses lymphocytaires T CD4 au niveau périphérique [242, 249]. L'augmentation de cytokines régulatrices et la détection au niveau de la peau de lymphocytes T produisant de l'IL-10 après challenge intradermique a principalement été décrite chez les patients se désensibilisant par voie sous-cutanée aux venins d'hyménoptères [246, 265, 266]. Des observations similaires ont été faites au niveau de la muqueuse nasale lors d'ITA sous-cutanée aux pollens de graminées [267]. L'unique étude réalisée sur des biopsies nasales suite à une ITA sublinguale aux pollens de graminées révèle une augmentation des lymphocytes Treg après 12 à 18 mois de traitement [220].

La réorientation de la polarisation ainsi que la génération de lymphocytes Treg sont probablement liées aux fortes doses administrées lors du traitement, supérieures à celles auxquelles le patient est exposé dans son environnement naturel. En effet, il a été démontré *in vitro* que de faibles doses d'allergènes induisaient une réponse Th2, alors que des doses plus élevées entraînaient une polarisation Th1 [248, 265]. Des observations similaires ont été faites quant à l'induction de lymphocytes Treg [258] ou de leurs propriétés régulatrices [133].

Il apparaît que les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes soient impactées par l'ITA. Ces changements semblent moins marqués au niveau systémique dans l'ITA sublinguale et sont probablement plus visibles localement [163, 220]. Toutefois, la corrélation avec l'efficacité clinique n'est pas toujours étudiée, remettant ainsi en question le lien de cause à effet avec les variations observées.

En conclusion, l'efficacité de l'ITA sublinguale reposerait sur les mêmes mécanismes impliquant les mêmes cellules (cellules effectrices, CPAs, lymphocytes B et lymphocytes T CD4) que l'ITA sous-cutanée avec une amplitude moins perceptible au niveau systémique

(Fig. 7). De plus, les premières études s'intéressant aux effets locaux de l'ITA sublinguale suggèrent que les modifications lymphocytaires induites par le traitement sont plus visibles au niveau des organes cibles. Cependant, le manque d'uniformité des données relatives aux réponses cellulaires systémiques, notamment des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes, rend difficile l'interprétation des données et soulève la nécessité de développer et d'optimiser des techniques visant à évaluer les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes, qui semblent être au centre des mécanismes impliqués dans l'efficacité de l'ITA.

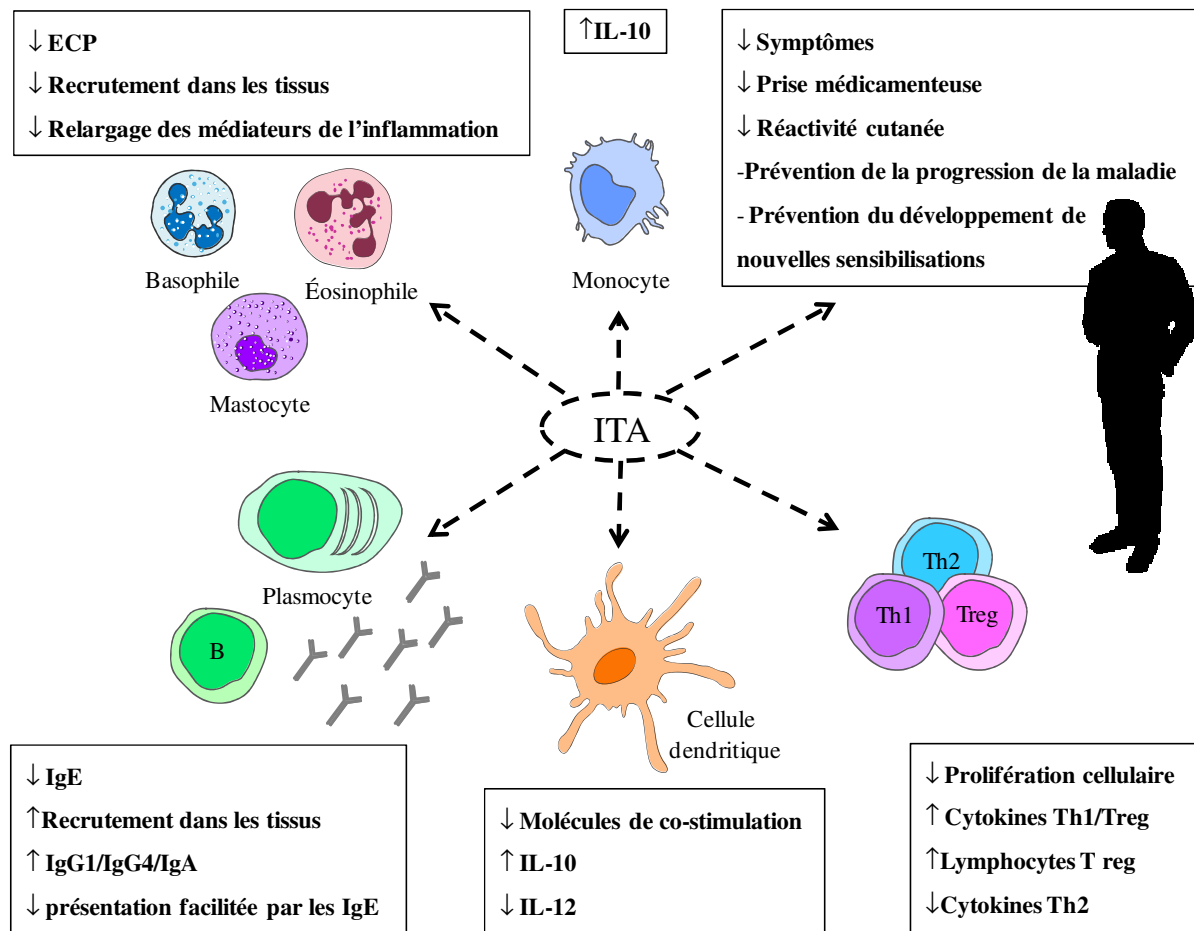


Figure 7 : Résumé des effets de l'ITA sur les acteurs cellulaires immunologiques

2.3 Suivi des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques

2.3.1 Intérêts

Les données suggérant l'importance des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes dans le contrôle de la réponse immunitaire à l'ITA et la difficulté de les suivre soulèvent la nécessité de développer des outils pour analyser les réponses lymphocytaires T CD4. Afin d'être optimaux, ces outils doivent :

- Prendre en compte les limites de détection et de quantification,
- Etre sensibles et spécifiques,
- Etre robustes et reproductibles,
- Etre faciles d'utilisation.

La spécificité fait référence à la justesse de l'interprétation des résultats observés (une grande spécificité correspond à une faible quantité de faux positifs). Elle est définie en comparaison à des standards ou des contrôles appropriés. La sensibilité, paramètre le plus affecté par le bruit de fond, est définie par les contrôles négatifs. Enfin, la robustesse et la reproductibilité impliquent que les résultats générés soient les mêmes quels que soient le manipulateur, l'instrument ou les réactifs utilisés.

2.3.2 Outils de suivi pour l'analyse des réponses immunitaires périphériques

Différentes techniques sont disponibles pour étudier les propriétés des cellules immunitaires mononuclées du sang périphérique (PBMCs) (tableau VI). Selon les protocoles expérimentaux utilisés (*ex vivo* ou après stimulation antigénique, sur la totalité des cellules ou sur une population cellulaire définie) les informations obtenues sont de degré variable quant à la spécificité antigénique de la réponse étudiée.

Tableau VI : Techniques d'analyses des propriétés des cellules du sang périphérique [268-284]. Le principe, les avantages (en vert) et les inconvénients (en rouge) des techniques de phénotypage, de mesure de la prolifération cellulaire (marquage à la thymidine tritiée ou au CFSE), de quantification génique (micro-arrays et PCR quantitative) et de détection de cytokines (ELISA, Luminex, ELISpot, marquage intracellulaire de cytokines (ICS), *Cytokine Secretion Assay* (CSA), nouveaux dispositifs).

		Principe	Avantages et inconvénients
Phénotype [264-267]		L'analyse phénotypique consiste à détecter des molécules de surface ou intracellulaires après perméabilisation de la membrane, à l'aide d'anticorps marqués spécifiques de la molécule d'intérêt. L'anticorps est couplé à un fluorochrome pour une détection en cytométrie de flux ou à un atome de métal pour une détection en cytométrie de masse.	-Analyse multiparamétrique possible -Peut être suivi d'une étape de purification (cytométrie de flux) - Sensible -Ne permet pas l'évaluation de la fonctionnalité
Mesure de la prolifération cellulaire [274-276]		Les techniques disponibles reposent sur deux principes: -Incubation des cellules avec des précurseurs marqués de l'ADN qui s'incorpore lors de la réplication, comme la thymidine tritiée détectée <i>in vitro</i> par comptage à scintillation, ou la bromodeoxyuridine (BrdU) détectée par immunocytochimie grâce à un anticorps spécifique anti-BrdU. -marquage des protéines cellulaires détecté par cytométrie de flux. Le plus courant, la carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) se fixe sur les chaînes latérales des lysines. Dans les deux cas, les marqueurs présents sur la cellule mère vont se répartir également dans les deux cellules filles lors de la division. L'intensité du signal sera alors divisée par deux.	<u>Marquage à la thymidine tritiée</u> -Très sensible -Analyse monoparamétrique -Ne permet pas l'identification des cellules ayant proliféré -Se limite à la détection des cellules ayant proliféré -Bruit de fond possible par effet <i>bystander</i> -Ne peut être suivi d'une étape de purification <u>Marquage au CFSE</u> -Analyse multiparamétrique possible -Peut être suivi d'une étape de purification -Se limite à la détection des cellules ayant proliféré -Bruit de fond possible par effet <i>bystander</i>
Quantification de l'expression génique	Micro-arrays [272, 273]	Les micro-arrays permettent l'analyse simultanée de tous les transcrits d'un génome. Son principe repose sur l'hybridation moléculaire. Le mélange des ADN complémentaires (ADNc) issu de la reverse transcription est marqué (fluorescence, biotinylation ou radioactivité), puis hybridé avec des ADNc de séquence connue, fixés sur un support solide.	-Sensible -Analyse multiparamétrique -Comparaison simultanée de deux échantillons -Permet de détecter l'expression de molécules intracellulaires ou sécrétées -Limitée au niveau transcriptionnel
	PCR quantitative [272, 273]	La PCR quantitative (qPCR), permet d'obtenir par réplication <i>in vitro</i> , de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. Afin de mesurer l'expression génique, les ARN messagers (ARNm) doivent être transcrits reverse en ADNc. La détection se fait au moyen d'intercalants de l'ADN fluorescents qui se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) ou de sondes fluorescentes que se lient sur une séquence d'ADN précise (technologie TaqMan). Ces molécules ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (soit parce que la fluorescence nécessite un ADN double brin, soit à cause d'un désactivateur (<i>quencher</i>)).	-Très sensible -Niveau de détection unicellulaire possible -Permet de détecter l'expression de molécules intracellulaires ou sécrétées -Analyse monoparamétrique -Limitée au niveau transcriptionnel

		Principe	Avantages et inconvénients
Mesure de la production de cytokines	ELISA [277]	L'Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) est une technique immuno-enzymatique de quantification qui permet de doser la cytokine d'intérêt grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.	-Très sensible -Analyse monoparamétrique -Ne permet pas une détection au niveau unicellulaire - Ne peut être suivi d'une étape de tri
	Luminex [284]	La technologie Luminex repose sur l'utilisation de microsphères aux propriétés fluorescentes bien définies sur lesquelles sont greffés des anticorps anti-cytokines. Suite à l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, puis à une double lecture après excitation par deux lasers, on peut déterminer quelles cytokines ont été produites et en quelles quantités.	-Analyse multiparamétrique possible -Très sensible -Ne permet pas une détection au niveau unicellulaire - Ne peut être suivi d'une étape de tri
	ELISpot [278].	L'Enzyme-linked immunosorbent spot (ELISpot) consiste à capturer les molécules sécrétées par des cellules déposées sur un support solide, sur lequel sont greffés des anticorps spécifiques de la cytokine d'intérêt. Après élimination des cellules, l'immunocomplexe est révélé à l'aide d'anticorps couplés à un substrat chromogène insoluble, dont la précipitation localisée génère des taches colorées ou « immunospots ».	-Niveau de détection unicellulaire -Permet de déterminer la fréquence des cellules ayant répondu à la stimulation -Très sensible -Analyse monoparamétrique -Dépendant du comptage cellulaire -Se limite à la détection des cellules ayant répondu à la stimulation -Bruit de fond possible par effet <i>bystander</i> -Ne permet pas d'analyse phénotypique
	ICS [279, 280]	Le marquage intracellulaire de cytokines consiste à détecter, grâce à des anticorps couplés à un fluorochrome, les cytokines accumulées dans le cytoplasme après stimulation.	-Analyse multiparamétrique possible -Niveau de détection unicellulaire -Nécessite peu de cellules -Sensible -Se limite à la détection des cellules ayant répondu à la stimulation -Bruit de fond possible par effet <i>bystander</i> -Analyse sur cellules fixées et perméabilisées
	CSA [281]	Le principe du Cytokine Secretion Assay (CSA) repose sur la capture de cytokines à la surface de la cellule juste au moment de leur sécrétion à l'aide d'anticorps bispécifiques. L'ajout d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permet l'analyse en cytométrie de flux.	-Analyse multiparamétrique possible -Niveau de détection unicellulaire -Peut être suivi d'une étape de purification -Se limite à la détection des cellules ayant répondu à la stimulation -Bruit de fond possible par effet <i>bystander</i> -Dépend de la cinétique de sécrétion des cytokines
	Nouveaux dispositifs [282, 283].	Le principe des <i>microwell array chips</i> consiste à mettre dans un puits, une cellule dont les cytokines qu'elle sécrète sont capturées puis révélées grâce à des anticorps marqués. Le principe des <i>integrated barcode chips</i> consiste à mettre une cellule dans une cassette. Les cytokines qu'elle sécrètent sont capturées par des anticorps placés en bande. Lors de la révélation, les anticorps marqués « s'allument » pour former un code barre.	-Analyse multiparamétrique -Niveau de détection unicellulaire - Ne tient pas compte du microenvironnement cellulaire

2.3.2.1 Analyse *ex vivo* des PBMCs

L'analyse *ex vivo* des PBMCs permet d'évaluer le phénotype, la fonctionnalité et l'expression génique de ces dernières à l'état basal (sans stimulation). Ce type d'analyse, du fait de la faible fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes en périphérie, rend très difficile l'acquisition d'informations sur les réponses lymphocytaires spécifiques d'allergènes.

2.3.2.2 Analyses de la réponse à l'antigène après stimulation *in vitro*

Alors que l'analyse des PBMCs *ex vivo* évalue un état basal, la stimulation spécifique *in vitro* des PBMCs après leur isolement, permet de détecter et de caractériser la réponse globale à l'antigène via l'expression de marqueurs d'activation, la mesure de la prolifération cellulaire, de la sécrétion cytokinique ou de l'expression génique.

Toutefois, ce n'est pas parce qu'une réponse cellulaire est détectable suite à la stimulation avec un antigène, qu'elle est spécifique de celui-ci. La réponse observée suite à une stimulation antigénique ne permet pas de faire la distinction entre activation spécifique due à l'antigène et activation liée aux cytokines produites par les cellules activées non spécifiquement (effet collatéral ou « *bystander* ») ou aux cellules mortes. De plus, elles ne prennent pas en compte les cellules spécifiques d'antigènes incapables de proliférer ou de sécréter des cytokines (anergiques).

2.3.2.3 Analyses de la réponse à l'antigène après amplification *in vitro*

Lorsque la fréquence des cellules répondant à l'antigène n'est pas suffisamment élevée pour détecter un signal après une stimulation antigénique des PBMCs, il est possible de les amplifier *in vitro* pendant 7 à 15 jours. Toutefois, cette phase d'expansion qui précède l'analyse peut biaiser la réponse à l'antigène.

2.3.2.4 La sélection de populations cellulaires

L'analyse des PBMCs reflète une réponse globale, sans distinction des types cellulaires. Il est possible d'affiner le type de réponse étudiée en sélectionnant, sur la base de marqueurs phénotypiques, les populations cellulaires d'intérêt (les lymphocytes T CD4 par exemple). Cette sélection se fait après un marquage avec des anticorps spécifiques des marqueurs de discrimination choisis, soit au moyen d'un tri physique avec des billes magnétiques, soit lors de l'analyse en cytométrie de flux.

2.3.2.5 Détection des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes : Les tétramères de molécules de classe II du CMH

2.3.2.5.1 Concept

L'utilisation d'un complexe CMH-peptide donné sous forme soluble devrait permettre de repérer l'ensemble des lymphocytes T qui lui sont spécifiques quel que soit leur état fonctionnel. Cependant, la faible avidité des TCR pour leur ligand ne permet pas aux complexes CMH-peptide sous forme monomérique de se fixer sur les lymphocytes T [285]. C'est en 1996 que l'équipe d'Altman a résolu ce problème en utilisant des formes tétramériques de complexes CMH I-peptide, augmentant ainsi l'avidité du système pour le TCR des lymphocytes T CD8 [286].

Le développement des tétramères de molécules de classe II du CMH pour l'analyse des réponses T CD4 est apparu peu de temps après chez la souris [287]. Son utilisation a été plus délicate chez l'Homme en raison de la faible fréquence de lymphocytes T CD4 spécifiques dans le sang circulant [288-290]. L'utilisation des tétramères de molécules de classe II du CMH s'est étendue à de multiples domaines comme la cancérologie [291-293], les maladies auto-immunes [294-296], l'infectiologie (cytomégalovirus, virus de l'hépatite C, agent de la tuberculose) [290, 297-300] ou l'allergologie (allergies aux pollens de bouleau, de graminées et d'armoise, aux phanères de chat et de vache, à l'arachide et au venin de guêpe) [120, 121, 123-125, 226, 301-303], permettant la caractérisation précise des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes.

2.3.2.5.2 Les épitopes immuno-dominants et leur identification

Les épitopes T (ou déterminants antigéniques T) sont des séquences peptidiques reconnues par le TCR de certains lymphocytes T lorsqu'elles sont associées à une molécule de classe II du CMH. Il est possible de classer les épitopes en 3 groupes : les épitopes immuno-dominants, les épitopes sous-dominants et les épitopes cryptiques. Alors que les épitopes immuno-dominants sont produits en grande quantité lors de la dégradation de l'antigène par les CPAs, les épitopes sous-dominants sont générés en plus faible quantité. Les épitopes cryptiques ne sont pas produits. Ainsi, lors d'une immunisation *in vivo* avec l'antigène natif, seule une restimulation *in vitro* avec un épitope immuno-dominant aboutira à une prolifération lymphocytaire. En revanche, les épitopes sous-dominants et cryptiques n'entraîneront une réponse *in vitro*, qu'après une immunisation *in vivo* avec ces peptides sous-dominants et cryptiques, respectivement. Tous les épitopes possèdent un site de liaison de

spécificité différente pour le TCR (épitope) et pour la molécule de classe II du CMH (agrétope). [304]. Pour engendrer une réponse immunitaire, ces peptides doivent présenter une forte affinité pour un TCR et pour une molécule du CMH donnés. L'incapacité d'un peptide sous-dominant ou cryptique à être immunogène est en partie liée à un défaut d'apprêtement de celui-ci, ceci en liaison directe avec le contexte moléculaire dans lequel il se trouve au sein d'une protéine [305-307]. Dans le domaine de l'allergie, les épitopes de nombreux allergènes ont été identifiés [120, 121, 124, 302, 308-310]. Les études menées à ce sujet révèlent une grande variabilité dans la reconnaissance épitopique inter- et intra-patients. Les différentes isoformes d'un allergène (Phl p 5a et Phl p 5b par exemple) possèdent des épitopes différents n'étant pas reconnus par les mêmes individus. De plus, un épitope immuno-dominant peut interagir avec des molécules de classe II du CMH différentes et inversement, une molécule de classe II du CMH est capable de lier des épitopes différents. Le polymorphisme des haplotypes HLA permet alors d'expliquer la diversité et la variabilité des épitopes T d'allergènes décrits. Chaque individu exprime un jeu de plusieurs molécules de classe II du CMH (4 à 8) qui possèdent des propriétés de liaison différentes qui lui sont propres, expliquant ainsi les variabilités inter- et intra-individuelles des épitopes générés et reconnus [311, 312].

Tableau VII : Définition des épitopes immuno-dominants, sous-dominants et cryptiques.
(+) : réponse proliférative ; (-) : pas de réponse proliférative.

Immunisation <i>in vivo</i>	Réponse <i>in vitro</i>			
	Antigène natif	Épitope immuno-dominant	Épitope sous-dominant	Épitope cryptique
Antigène natif	+	+	-/+	-
Épitope immuno-dominant	+	+	-	-
Épitope sous-dominant	+	-	+	-
Épitope cryptique	-	-	-	+

Deux approches sont envisageables pour identifier ces épitopes immuno-dominants. La première consiste à prédire bioinformatiquement avec des algorithmes l'affinité des différents peptides d'une protéine pour une molécule HLA, puis à valider *in vitro* la capacité de liaison du peptide à la molécule de classe II du CMH considérée, exprimée par des lignées cellulaires [305, 313]. La seconde repose sur un criblage d'épitopes appelé TGEM (*tetramer-guided epitope mapping*) appréciant à la fois la capacité de liaison des peptides sur les molécules de

classe II du CMH, et la détection de ce complexe CMHII/peptide par des lymphocytes T CD4 [314].

2.3.2.6 Combinaison d'outils

De récentes analyses soulignent qu'un suivi des réponses T spécifiques doit englober l'utilisation de plusieurs tests immunologiques, qui ensemble permettent d'évaluer la fréquence, la fonction effectrice, le type de marqueurs spécifiques exprimés et la capacité migratoire des cellules T spécifiques [315]. Ainsi, combiner la technologie des tétramères de molécules de classe II du CMH à d'autres outils biologiques est un des meilleurs moyen de préciser le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes et de mettre en évidence les mécanismes et des biomarqueurs d'efficacité de l'ITA [316-319].

OBJECTIFS

OBJECTIFS

La place centrale des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes dans la physiopathologie des allergies est aujourd'hui avérée. Toutefois, les mécanismes à l'origine d'une réponse tolérogène chez les individus sains *versus* une réponse pathologique chez les sujets allergiques ne sont pas clairement élucidés. Il n'y a pas non plus de consensus quant au rôle des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes dans l'induction de tolérance liée à l'efficacité clinique de l'ITA, et si cette réponse tolérogène est identique à celle observée chez les individus sains. Cela est notamment dû au manque d'outils permettant de suivre précisément ces réponses chez l'ensemble des individus. De ce fait, aucun biomarqueur lié aux lymphocytes T CD4 n'a encore été identifié pour déterminer objectivement l'efficacité du traitement par ITA.

L'objectif de cette thèse a donc été de poursuivre le développement et de mettre en application des outils de suivi des lymphocytes T CD4, pour d'une part mettre en évidence les différences entre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes des individus sains et allergiques, et d'autre part, mieux comprendre les mécanismes d'action et identifier de nouveaux marqueurs biologiques associés à l'efficacité de l'ITA sublinguale. Le but final est de faciliter le développement de nouveaux candidats vaccins et/ou schéma d'administration et d'optimiser la prise en charge thérapeutique de chaque patient.

Le travail effectué pendant ma thèse s'est articulé autour de trois problématiques :

Dans la première, nous avons utilisé des tétramères de molécules de classe II du CMH spécifiques de l'allergène majeur du pollen de bouleau, Bet v 1 et avons développé des tétramères de molécules de classe II du CMH spécifiques des allergènes majeurs de *D. pteronyssinus*, Der p 1 et Der p 2 pour détecter puis caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de ces allergènes respectivement, saisonnier et perannuels, chez les individus sains et allergiques (Article I).

Puis, l'étude clinique de phase I (VO56.07A) menée en chambre à pollens, en double aveugle avec un contrôle placebo chez 89 patients atteints de rhinoconjonctivite aux pollens de graminées a permis d'évaluer les réponses périphériques cellulaires au cours d'une ITA sublinguale efficace. Afin d'identifier des modifications immunologiques en relation avec l'efficacité clinique de l'ITA, nous avons suivi *ex vivo* les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes T CD4 totaux. Puis, nous avons évalué l'évolution de la réponse des PBMCs

suite à une stimulation allergénique *in vitro*. L'identification des épitopes des allergènes majeurs de *P. pratense*, Phl p 1 et Phl p 5, a permis la synthèse de tétramères de molécules de classe II du CMH correspondants. Nous avons ensuite caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes des patients présentant un typage HLA compatible avec les tétramères de molécules de classe II du CMH (Article II).

Dans le cadre de l'étude VO64.08 menée en double aveugle avec contrôle placebo chez 423 enfants atteints de rhinoconjonctivite aux acariens a été réalisée, pour évaluer l'efficacité de l'ITA sublinguale après une année de traitement. Les réponses lymphocytaires T CD4 périphériques ont été analysées sur un sous-groupe de 21 patients via la détection de cytokines au niveau extra et intracellulaire. Le phénotype des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1 des 3 patients présentant un haplotype compatible avec nos tétramères de molécules de classe II du CMH a également été réalisé (Résultats supplémentaires I).

Les contraintes d'utilisation des tétramères de molécules de classe II du CMH, comme l'identification des épitopes et la restriction HLA, qui limitent le nombre d'individus pouvant être analysés, nous a amenés à rechercher une alternative à ces outils pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes. L'objectif était d'évaluer les réponses lymphocytaires chez la totalité des individus avec une spécificité et une sensibilité de détection se rapprochant au mieux de celle des tétramères de molécules de classe II du CMH. Ainsi, nous avons recherché la combinaison optimale de marqueurs d'activation membranaires pouvant remplacer au mieux un marquage « tétramère de classe II » pour identifier les lymphocytes T CD4 spécifiques d'un allergène. Nous avons donc corrélé l'expression de marqueurs d'activation membranaires à des marquages « tétramères de classe II » (Article III).

RESULTATS

RESULTATS

4.1 Article I : Les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes saisonniers (Bet v 1) et perannuels (Der p 1/Der p 2) présentent des profils de polarisation distincts

Dans cet article, nous avons analysé les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de Bet v 1 (allergène saisonnier) et de Der p 1/ Der p 2 (allergènes perannuels) chez 48 individus allergiques et non allergiques. L'objectif était de caractériser ces réponses dans des contextes pathologiques et sains pour mieux comprendre respectivement les mécanismes responsables d'allergie et de tolérance. En effet, cela pourrait permettre d'optimiser les stratégies thérapeutiques visant à atteindre une réponse tolérogène naturelle et de mettre en évidence des biomarqueurs d'efficacité de l'ITA.

L'identification des épitopes de Der p 1 et Der p 2 les plus affins pour les molécules HLA-DRB1*0101, *0301, *1501 et HLA-DPB1*0401 était un pré-requis à la synthèse des tétramères de molécules de classe II du CMH, outil permettant de suivre les lymphocytes T CD4 spécifiques de ces allergènes. Nous avons ensuite caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les lymphocytes T CD4 spécifiques de Bet v 1, Der p 1 et Der p 2, à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH après amplification *in vitro*, du fait de la faible fréquence de ces cellules en périphérie.

Des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes ont été détectés chez 19 individus allergiques aux acariens, 7 au pollen de bouleau, 13 allergiques à la fois aux acariens et au pollen de bouleau et 9 non allergiques. L'avidité des clones spécifiques de Bet v 1₁₄₁₋₁₅₅ était plus élevée que celle des clones spécifiques de Der p 1_{16-30, 110-124, 171-185} et Der p 2_{26-40, 107-121}. De plus, nous avons observé que, chez les individus sains, quel que soit l'allergène considéré, les lymphocytes T CD4 spécifiques présentent un profil de polarisation dominant de type « Th1/Treg », sécrétant majoritairement de l'IFN- γ , un degré moindre d'IL-10 et exprimant plus fortement à leur surface les marqueurs CXCR3 et CTLA-4. De plus, les cellules spécifiques de l'allergène présentent un phénotype de type « mémoire centrale » (CCR7⁺/CD62L⁺).

Chez les individus allergiques, alors que les lymphocytes T CD4 spécifiques de Bet v 1 répondent de manière homogène à l'allergène par une réponse de type « Th2 » « mémoire

effectrice » (faible expression de CCR7 et CD62L et sécrétion majoritaire d'IL-5), les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1/Der p 2 présentent des réponses beaucoup plus hétérogènes. En effet, ces derniers, selon les patients, ont des profils de polarisation Th2 (IL-5/IL-13), Th1/Th2 (IFN- γ /IL-10/IL-13) ou Th2/Th17 (IL-4/IL-10/IL-17). Toutefois, ils présentent généralement un phénotype « mémoire centrale ».

La fréquence *ex vivo* des lymphocytes T CD4 périphériques spécifiques de Der p 1 et Der p 2 se situe entre 1 et 6 parmi 10⁴ lymphocytes T CD4, sans variation au cours de l'année.

Ces résultats montrent que chez les sujets sains, la réponse lymphocytaire T CD4 spécifique d'allergène présente un même profil de polarisation « Th1/Treg » dominant, quel que soit l'allergène étudié. Chez les patients allergiques, ces réponses diffèrent selon la nature saisonnière ou perannuelle de l'allergène incriminé. Alors que les lymphocytes T CD4 spécifiques de Bet v 1 présentent une polarisation Th2 homogène, les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de Der p 1/Der p 2 sont plus hétérogènes.

Distinct characteristics of seasonal (Bet v 1) vs. perennial (Der p 1/Der p 2) allergen-specific CD4⁺ T cell responses

E. Wambre^{1*†}, M. Bonvalet^{1*}, V. B. Bodo¹, B. Maillère², G. Leclert¹, H. Moussu¹, E. Von Hofe³, A. Louise⁴, A.-M. Balazuc⁴, D. Ebo⁵, C. Hoarau⁶, G. Garcia⁷, L. Van Overtvelt¹ and P. Moingeon¹

¹Stallergenes SA, Antony, France, ²CEA, Gif Sur Yvette, France, ³Antigen Express Inc., Worcester, MA, USA, ⁴Plateforme de cytométrie de flux, Institut Pasteur, Paris, France, ⁵Department of Immunology, Allergy and Rheumatology, Antwerp University, Antwerp, Belgium, ⁶Unité transversale d'allergologie et Immunologie clinique, CHRU Tours, Tours, France and ⁷Département de Pneumologie, Hôpital Bécélère, Clamart, France

Clinical & Experimental Allergy

Summary

Background A better understanding of allergen-specific CD4⁺ T cell responses is needed to help improving immunological therapies.

Objective To compare CD4⁺ T cell responses against seasonal (Bet v 1) and perennial (Der p 1, Der p 2) allergens.

Methods Major histocompatibility complex class II peptide tetramers were engineered to monitor allergen-specific T cell responses. After *in vitro* expansion, tetramer⁺ cells were tested for surface markers using cytofluorometry. Cytokine gene expression and production were assessed using quantitative PCR and cytokine surface capture assays, respectively.

Results Tetramer⁺ cells were detected in 19 patients allergic to house dust mites (HDM), seven allergic to birch pollen, 13 allergic to both and nine non-allergics with either an HLA-DRB1*0101, *0301, *1501 or an HLA-DPB1*0401 background. High-avidity T cells are elicited against the immunodominant Bet v 1_{141–155} epitope, whereas broader low-avidity T cell responses are induced against Der p 1_{16–30,110–124,171–185} and Der p 2_{26–40,107–121} epitopes. Responses against Bet v 1 involve effector (CDL62 low, CCR7 low) or central (CD62L⁺, CCR7⁺) memory cells in allergic and non-allergic individuals, respectively, whereas central memory cells are mostly detected against mite allergens. In non-allergics, both mite and Bet v 1-specific T cells produce IFN-γ and IL-10. In contrast to Bet v 1-driven Th2 responses, mite allergens induce highly polymorphic responses in allergics, including Th1, Th2/Th17 or mixed Th1/Th2 profiles. Mite-specific T cell frequencies in the blood remain in the range of 1–6 × 10^{−4} CD4⁺ T cells throughout the year.

Conclusion Different memory CD4⁺ T cell responses are elicited in the context of chronic vs. seasonal stimulation with the allergen(s). The heterogeneity in the patterns of CD4⁺ T cell responses observed in patients allergic to HDMs should be taken into account for specific immunotherapy.

Keywords allergens, immunotherapy, MHC class II tetramers, T cell polarization, tolerance

Submitted 15 June 2010; revised 17 September 2010; accepted 27 September 2010

Correspondence:

Philippe Moingeon, Research and Development, Stallergenes SA, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92183 Antony Cedex, France.
E-mail: pmoingeon@stallergenes.fr
Cite this as: E. Wambre, M. Bonvalet, V. B. Bodo, B. Maillère, G. Leclert, H. Moussu, E. Von Hofe, A. Louise, A.-M. Balazuc, D. Ebo, C. Hoarau, G. Garcia, L. Van Overtvelt and P. Moingeon, *Clinical & Experimental Allergy*, 2011 (41) 192–203.

Introduction

Allergen-specific CD4⁺ T cells play a central role in both the pathogenesis and the regulation of allergic inflammation, depending on which cytokines they produce [1–4]. Specifically, excessive production of Th2 cytokines is considered as the hallmark of allergic T cell responses [2,

3, 5, 6]. In contrast, IL-10-producing regulatory T cells as well as IFN-γ-secreting Th1 cells are rather associated with the establishment of tolerance, whether it be during successful immunotherapy [3, 6–10] or during the course of the natural immune responses observed in healthy individuals exposed to allergens [11–13]. Beyond these observations, it remains of interest to further characterize and compare allergen-specific CD4⁺ T cell responses in detail in both allergics and non-allergics in order to document potential patient heterogeneity on the one hand, and

*Contributed equally.

†Present address: Benaroya Research Institute, Seattle, WA, USA.

further, to better understand the mechanisms underlying natural protective responses in healthy individuals. The latter information should help designing optimized allergy vaccines recapitulating natural tolerogenic responses.

The identification within common allergens of immunodominant epitopes restricted to various HLA-DR or -DP haplotypes [11–15] facilitates the design and development of major histocompatibility complex (MHC) class II peptide tetramers as reagents to investigate allergen-specific CD4⁺ T cell responses [6, 16, 17]. Such tetramers classically consist of complexes composed of four MHC class II heterodimers loaded with a peptide representing a high-affinity T cell epitope [18–20]. MHC molecules coupled to biotin can be multimerized subsequently with fluorescently labelled streptavidin, thus providing high-avidity reagents to detect epitope-specific T cells by flow cytometry. Studies with MHC class II peptide tetramers to identify, quantify and characterize antigen-specific CD4⁺ T cells are often limited by low progenitor frequencies within peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [18–20], thereby necessitating the *in vitro* expansion of rare specific T cells before tetramer staining [17]. Tetramer-based approaches have now been applied successfully to the analysis of CD4⁺ T cell responses against several common allergens, including Lol p 1, Fel d 1, Bet v 1, Der p 1, Bos d 2 and Art v 1 [6, 13, 16, 17, 21–23].

Using such a tetramer-based approach, we established recently that birch pollen (BP)-allergic patients and healthy individuals mount distinct CD4⁺ T cell responses to the Bet v 1_{141–155} immunodominant epitope [13, 17]. Whereas allergics consistently elicit specific Th2 cells, healthy patients have rather Th1 and Foxp3⁺ IL-10-producing T Reg cells circulating in their blood [13]. In the present study, we developed MHC class II peptide tetramers to extend those comparative analyses to perennial Der p 1 and Der p 2 allergens from the house dust mite (HDM) *Dermatophagoides pteronyssinus* species. Using those tools, we demonstrate in single or double BP/mite allergic patients as well as in healthy individuals that distinct CD4⁺ memory T cell responses are induced to mite allergens when compared with Bet v 1, with most noticeably, highly variable patterns of cytokines produced in response to the former in allergic patients.

Materials and methods

Patients and HLA-DR typing

Citrated peripheral blood was obtained after informed consent from BP- or HDM-allergic patients recruited at Antwerp University Hospital (Belgium), Hospital Bécélère (Clamart, France) or CHRU Tours (France). Blood samples from healthy donors were obtained from Etablissement Français du Sang (Rungis, France). The study protocol was approved by the ethical committee (CPP) from Bicêtre

hospital, Kremlin Bicêtre, France. BP- and HDM-allergic patients were selected based on their clinical record, a positive skin prick test and documented IgE reactivity. All patients had allergic rhinitis and none of them had asthma or atopic dermatitis. For healthy patients, *in vitro* basophil activation assays were performed with BP and HDM extracts (Stallergenes, France) to confirm their non-allergic status.

Up to 220 individuals (including BP and/or HDM allergics as well as healthy individuals) were PCR-typed for their HLA-DR and -DP allotypes, using an Easy DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). From this cohort, 125 individuals were selected for this study, based on their HLA-DRB1*0101, *0301, *1501 or HLA-DPB1*0401 background, allowing tetramer analysis.

Bioinformatics analysis and HLA-DR (or -DP) peptide *in vitro* binding assays

Epitopes from Der p 1 and Der p 2 restricted to HLA-DRB1 or HLA-DPB1 molecules were preselected by bioinformatics analyses performed using TEPITOPE and Propred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred>) algorithms. For each allergen, peptides spanning the whole protein sequence and preserving putative anchor motifs were synthesized by NeoSystem (Strasbourg, France) with a purity grade >75% confirmed by HPLC. Peptide-binding assays to human HLA-DR or -DP molecules purified from human EBV-transformed B cell lines were performed as described elsewhere [24, 25]. Biotinylated reporter peptides were incubated in the presence of serial dilutions of each allergen-derived peptide tested and appropriate purified MHC class II molecules. After a 24-h or a 72-h incubation at 37 °C, peptide-MHC class II complexes were added for 2 h to 96-well plates coated with the L243 antibody directed to a monomorphic determinant of MHC class II molecules. Bound biotinylated peptides were detected as described elsewhere [24]. Data were expressed as a ratio between concentrations of tested peptides over reporter peptide inhibiting 50% binding (IC₅₀) of biotinylated reporter peptides [24].

Staining with major histocompatibility complex class II peptide tetramers and characterization of tetramer⁺ cells

PBMCs were isolated from peripheral blood by centrifugation over Ficoll-Paque plus (Amersham Biosciences, Orsay, France) [13]. For *in vitro* expansion of epitope-specific CD4⁺ T cells, PBMCs were stimulated with conjugate peptide mixes comprising complete or truncated versions of peptides corresponding to each of Bet v 1-, Der p 1- or Der p 2-derived T cell epitopes, conjugated with a polymethylene linker to the Ii-Key moiety of the MHC class II-associated invariant chain [17, 26]. Freshly isolated PBMCs (5 × 10⁶/mL) were stimulated in 12-well

Table 1. Binding capacities of Der p 1 and Der p 2 peptides to purified HLA-DR and HLA-DP molecules

		HLA-DRB1 alleles				HLA-DPB1 allele
Amino acid sequences		0101	0301	0401	1501	0401
<i>(a) Der p 1 peptides</i>						
p3-17	ACSINGNAPAEIDLR	3594	> 261	> 1 748	> 949	> 1895
p16-30	LRQMRTVTPIRMQGG	6	14	10	18	> 1895
p37-51	FSGVAATESAYLAYR	342	8	14	17	721
p44-58	ESAYLAYRNQSLDLA	5	> 261	29	1	699
p91-105	ESYYRYVAREQSCR	13	281	54	321	> 1895
p110-124	RFGISNYCQIYPPNV	29	72	417	1	7
p113-127	ISNYCQIYPPNVNKI	1	> 261	26	388	> 1895
p138-152	IAVIIGIKDLDAFRH	63	37	1	0.1	> 1895
p147-161	LDAFRHYDGRTHQR	13	70	61	3	> 1895
p156-170	RTIIQRDNGYQPNYH	> 4722	55	1144	282	> 1895
p171-185	AVNIVGYSNAQGV	1757	> 261	3	1	> 1895
p207-221	NIDLMMIEEYPYVVI	122	> 261	1436	1	9
<i>(b) Der p 2 peptides</i>						
p10-24	NHEIKKVLVPGCHGS	198	187	> 1748	121	> 1895
P26-40	PCIIHRGKPFQLEAV	3	> 261	> 1748	12	> 1895
p32-46	GKPFQLEAVFEANQN	58	> 261	1	107	> 1895
p37-51	LEAVFEANQNTKTAK	784	261	35	> 949	> 1895
p58-72	IDGLEVDVPGIDPNA	> 4722	20	> 1748	> 949	> 1895
p77-91	KCPLVKGQQYDIKYT	762	> 261	> 1748	92	> 1895
p85-99	GQQYDIKYTWNVPKIAP	3200	172	649	206	> 1895
p107-121	TVKVMGDDGVLA	1593	1	26	176	1221

Peptide-binding capacities of (a) Der p 1-derived and (b) Der p 2-derived peptides to immunopurified HLA-DR and HLA-DP molecules. Results are expressed as a ratio between the IC₅₀ (inhibitory concentration) values obtained with either tested peptides or the corresponding reference peptides out of two independent experiments, as described in 'Materials and methods'. The HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide was used as a reporter peptide for both HLA-DRB1*0101 (IC₅₀ = 2 nM) and DRB1*0401 alleles (IC₅₀ = 6 nM). Peptides HLA-A3₁₅₂₋₁₆₆ and MT₂₁₃₋₂₃₆ were used as reference peptides for binding to either the HLA-DRB1*1501 (IC₅₀ = 10 nM) or the HLA-DRB1*0301 alleles (IC₅₀ = 200 nM), respectively, and the Oxy₂₇₁₋₂₈₇ peptide for the HLA-DPB1*0401 allele (IC₅₀ = 10 nM). High-affinity peptides (IC₅₀ ratio < 50) are in bold.

plates with appropriate conjugate peptide mixes (10 µg/mL) in 2 mL of complete RPMI 1640 medium (Invitrogen). After 5 days at 37 °C, 20 U/mL IL-2 (Roche, Meylan, France) was added to cell cultures every 3 days. On day 14, cells were restimulated with autologous PBMCs pulsed with the conjugate peptide mix plus IL-2.

All MHC class II peptide tetramers used in this study were made by Beckman Coulter (Marseille, France). Briefly, the α and β chains of HLA-DR or -DP molecules were produced as a fusion to biotin in a baculovirus expression system, as described elsewhere [27]. Tetramers prepared using streptavidin were complexed with either peptides corresponding to T cell epitopes from Der p 1 and Der p 2 (Table 1) or the Ii CLIP peptide (LPKPPKPVSKMRMATPLLMQALPM) or MAGE 3₄₈₋₆₃ used as negative controls. Tetramers engineered to assess CD4⁺ T cells responses to the Bet v 1₁₄₁₋₁₄₅ epitope have been described elsewhere [17]. All tetramers were conjugated to PE and obtained at a 100 µg/mL concentration. All conjugate peptide mixes as well as tetramers used in this study were tested for endotoxin content using the Limulus Amoebocyte Lysate test and found to be negative or to contain < 2 EU/mL. The DRB1*1501 Der p 2₂₆₋₄₀ tetramer contains 15 EU/mL endotoxin.

For tetramer staining, 10⁶ cells were incubated with 10 µg/mL MHC class II peptide tetramers for 2 h at 37 °C in RPMI 1640 medium. After washing in cold PBS, antibodies (i.e. FITC-labelled anti-CD4, ECD-labelled anti-CD14, PC7-labelled anti-CD3, all from Beckman Coulter) and ViaProbe reagent (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) were added for 20 min in the dark at 4 °C. Cells were stained with the corresponding isotype-matched antibodies as controls. After washing, samples were analysed using an FC500 flow cytometer (Beckman Coulter), after excluding dead cells and CD14⁺ monocytes. In selected experiments, cells were further incubated with fluorescently labelled antibodies directed against various surface markers (i.e. CD45RO, CD62L, CXCR3 and CCR7, all from BD Biosciences; CD25, CD69 from Beckman Coulter; CTLA-4 from R&D Systems, Lille, France) or corresponding isotype-matched antibodies, before FACS analysis. A minimum of 50 000 cells were analysed, corresponding to at least 100 tetramer⁺ cells.

To assess the frequencies of Der p 1- or Der p 2-specific T cells, tetramer staining was performed after purification of CD4⁺ T cells from PBMCs, either using a MoFlo (Dako, Glostrup, Denmark) cell sorter or by negative selection using a Dynal CD4⁺ isolation kit (Invitrogen) according to

the manufacturer's instructions. The frequencies of allergen-specific cells were calculated as a ratio between the number of cells stained with the specific tetramer minus number of cells stained with the CLIP tetramer over the total number (at least 50 000) of CD4⁺ T cells analysed.

Cytokine surface capture assays

Cells were stained with 5 µg/mL MHC class II peptide tetramers at 37 °C in RPMI 1640 medium for 30 min. 2.5×10^6 cells were subsequently washed and stimulated in RPMI 1640 complete medium with 2.5×10^5 autologous PBMCs pulsed with Ii key peptide mixes. After 3–4 h at 37 °C, cells were harvested, washed in ice-cold buffer containing 0.5% BSA + 5 mM EDTA and labelled with 50 µg/mL of either anti-IFN-γ/CD45, anti-IL-5/CD45 or anti-IL-10/CD45 Ab–Ab conjugates (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany) for 10 min at 4 °C. Cells were resuspended in a complete culture medium and incubated for 45 min at 37 °C to allow cytokine secretion. Cells were then washed, resuspended in ice-cold buffer containing 0.5% BSA plus 5 mM EDTA and stained with PC7-labelled anti-CD4, ECD-labelled anti-CD14, ViaProbe reagent and either FITC-labelled anti-IFN-γ or APC-labelled anti-IL-10 or anti-IL-5 mAbs. After 30 min at 4 °C, cells were washed and analysed immediately by flow cytometry.

PCR analysis of purified major histocompatibility complex class II peptide tetramer⁺ CD4⁺ T cells

Both tetramer-positive and -negative CD4⁺ T cells were sorted from cultures obtained from allergic and non-allergic individuals, using a MoFlo (Dako). Total RNA was extracted from the various cell populations using the RNeasy Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and cDNAs were synthesized using a TaqMan Reverse Transcription Reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Messenger RNA expression corresponding to cytokine genes was evaluated by quantitative PCR on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using pre-designed Taqman Gene Expression reagents (Applied Biosystems) [13]. Data were obtained after normalizing the target gene amplification value with an endogenous control (β-actin). The relative amount of target genes in each sample was assessed in comparison with tetramer[−] CD4⁺ T cells purified from the same donor.

Statistical analyses

Data were analysed for statistical significance using a non-parametric Mann–Whitney test. A *P*-value ≤ 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Design of major histocompatibility complex class II Der p 1 and Der p 2 tetramers

Using computer algorithms (TEPITOPE and ProPred) to predict HLA-DR- and -DP-(i.e., HLA-DRB1*0101, *0301, *0401, *1501 and HLA-DPB1*0401) binding motifs, potential MHC class II restricted T cell epitopes were identified within Der p 1 and Der p 2 allergens. Corresponding peptides were synthesized and tested for binding to those common Caucasian MHC class II molecules using an ELISA competition assay, in parallel with reporter peptides. This analysis revealed multiple epitopes within both Der p 1 and Der p 2 with a good affinity for MHC class II molecules (Table 1). For example, peptide Der p 1_{16–30} has a good affinity for both HLA-DRB1*0101, *0301, *0401 and *1501 alleles and Der p 1_{138–152} for DRB1*0401 and 1501. The Der p 1_{171–185} peptide was also selected, given its high affinity for HLA-DRB1*1501 alleles. Furthermore, two Der p 1 peptides, namely Der p 1_{110–124} and Der p 1_{207–221}, exhibit a high affinity for HLA-DPB1*0401. The Der p 2_{26–40} peptide has a high binding affinity for both DRB1*0101 and *1501 molecules, whereas Der p 2_{107–121} binds well to HLA-DRB1*0301 and Der p 2_{32–46} to HLA-DRB1*0401 (Table 1). These results are consistent with other studies establishing that Der p 1 epitopes are presented by DRB1 and DPB1, whereas Der p 2 epitopes are rather restricted to DRB1 but not DPB1. Among the peptides selected, we were successful in engineering-specific MHC class II peptide tetramers encompassing Der p 1_{16–30}, Der p 1_{110–124} and Der p 1_{171–185} as well as Der p 2_{26–40} and Der p 2_{107–121} epitopes. In parallel, synthetic peptides corresponding to such epitopes of interest were chemically conjugated with the Ii-Key peptide from the MHC invariant chain in order to produce reagents allowing to expand Der p 1- and Der p 2-specific CD4⁺ T cells *in vitro* from PBMCs, as described elsewhere [17, 26].

Identification of Der p 1- and Der p 2-specific CD4⁺ T cells in allergic and non-allergic patients

PBMCs from 220 HDM and/or BP allergic or healthy individuals were PCR-typed for their MHC class II haplotypes, and 125 subjects were selected based on a favourable MHC class II background allowing tetramer staining. Cells from such individuals were stimulated with appropriate Der p 1- or Der p 2-derived epitope Ii-Key conjugate mixes for 14–24 days (Table 2). After *in vitro* stimulation, Der p 1- or Der p 2-specific CD4⁺ T cells were detected in approximately 30% of the blood samples analysed (i.e. from 19 HDM allergics, seven BP allergics, 13 dual HDM and BP allergics and nine non-allergics) and such responses were directed to multiple epitopes restricted to various MHC class II haplotypes (Table 2, Fig. 1). Bet v

Table 2. Detection of MHC class II-peptide tetramer⁺ CD4⁺ T cells in allergic and non-allergic individuals

Status of donors	Identification of donors	HLA-DR or DP typing	% tetramer ⁺ cells among CD4 ⁺ T cells				Days <i>in vitro</i> stimulation	Month of blood collection
			Control*	Der p 1 [†]	Der p 2 [‡]	Bet v 1 [§]		
HDM allergic	HDM1	DP4	0.1	1.9	ND	ND	15	March
	HDM2	DR15	0.1	0.8	0.3	1.2	21	February
	HDM3	DR3	0	ND	0.3	ND	15	February
	HDM4	DR1	0.1	1.4	2.1	0.3	17	March
	HDM5	DR15	0	ND	0.3	0.5	14	August
	HDM6	DR1	0.1	ND	2	1.2	14	August
	HDM7	DR3	0.1	ND	0.8	ND	16	May
	HDM8	DR15	0	0.5	ND	0.2	17	June
	HDM9	DR15	0.1	0.7	ND	0.4	17	June
	HDM10	DR15	0	0.4	0.4	ND	16	July
	HDM11	DR15	0.1	0.7	0.4	ND	17	June
	HDM12	DR1	0	0.3	0.5	ND	21	November
	HDM13	DP4	0.2	2.8	ND	ND	10	May
	HDM14	DR15	0	0	0.4	ND	12	November
	HDM15	DR15	0	1.1	0.4	ND	14	November
	HDM16	DR15	0	0.4	ND	ND	19	December
	HDM17	DR15	0	0.4	0.2	ND	14	December
	HDM18	DR15	0	2	0	ND	14	January
	HDM19	DR15	0.2	ND	ND	1	14	June
BP allergic	BP1	DR3	0.2	ND	0.6	ND	18	September
	BP2	DR15	0.1	1	0.3	1.4	14	May
	BP3	DR15	0.1	0.3	0.2	0.9	14	June
	BP4	DR15	0	2.2	ND	ND	11	November
	BP5	DR1	0	ND	ND	4.5	6	June
	BP6	DR15	0.2	ND	ND	1.9	15	June
	BP7	DR1	0	ND	ND	1.5	14	December
HDM and BP allergic	HB1	DR15	0.2	0.6	0.5	0.6	23	December
	HB2	DR15	0.1	1.2	1.5	17.7	14	April
	HB3	DR15	0.1	0.4	0.9	18.5	14	July
	HB4	DR1	0	0.6	1.2	1.5	15	April
	HB5	DR15	0.1	0.4	ND	2.2	15	July
	HB6	DR15	0.1	0.4	0.8	1.9	21	November
	HB7	DR3	0.1	ND	2.9	ND	24	November
	HB8	DR15	0	ND	0.3	1.5	16	March
	HB9	DR15	0.1	0.6	0.8	3.8	20	March
	HB10	DR1	0.2	1.9	2.6	14.1	18	March
	HB11	DR1	0	ND	0.2	0	16	November
	HB12	DR15	0.2	ND	ND	15.1	15	July
	HB13	DR15	0.1	4.1	0	6.1	16	January
Non-allergic	NA1	DR15	0.1	0.2	0.8	ND	19	February
	NA2	DR1	0.1	0.9	ND	ND	21	February
	NA3	DR15	0	0.4	0.5	0.6	18	July
	NA4	DR15	0.1	0.8	0.4	1.4	18	June
	NA5	DR3	0.1	ND	0.7	ND	17	December
	NA6	DR3	0.1	ND	0.4	ND	17	December
	NA7	DR1	0.1	0.5	0	ND	17	November
	NA8	DR15	0	0.3	0	ND	13	December
	NA9	DR15	0	0.3	0	ND	16	January

Blood samples were obtained from individuals in Belgium and France. PBMCs were stimulated *in vitro* with conjugate peptide mixes before tetramer staining. Percentages of Der p 1-, Der p 2- or Bet v 1-specific CD4⁺ T cells detected with the corresponding MHC class II peptide tetramers in allergic and non-allergic individuals are indicated.

*Control epitope is always CLIP, except for DPB1*0401 patients, where MAGE-3₄₈₋₆₃ is used.

[†]Epitopes p16-30 for DRB1*0101 and *1501 (i.e. DR1 and DR15) patients; p110-124 for DPB1*0401 (i.e. DP4) patients and p171-185 for DRB1*1501 (i.e. DR15) patients.

[‡]Epitopes p26-40 for DRB1*0101 and *1501 (i.e. DR1 and DR15) patients and p107-121 for DRB1*0301 (i.e. DR3) patients.

[§]Epitopes p141-155 for all patients.

ND, not done.

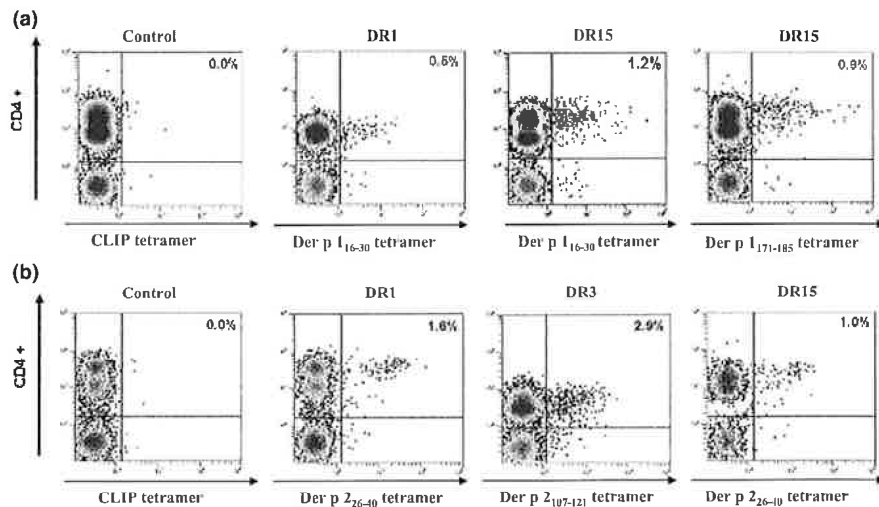


Fig. 1. Detection of (a) Der p 1- or (b) Der p 2-specific CD4⁺ T cells with various major histocompatibility complex class II peptide tetramers. Freshly isolated PBMCs from various HDM-allergic individuals were stimulated for 14–24 days with Der p 1- or Der p 2-derived epitope li-Key conjugates (10 µg/mL). Percentages of CD4⁺ tetramer-positive cells within CD3⁺ cells are indicated in the upper right quadrant. CLIP tetramer staining was used as a negative control.

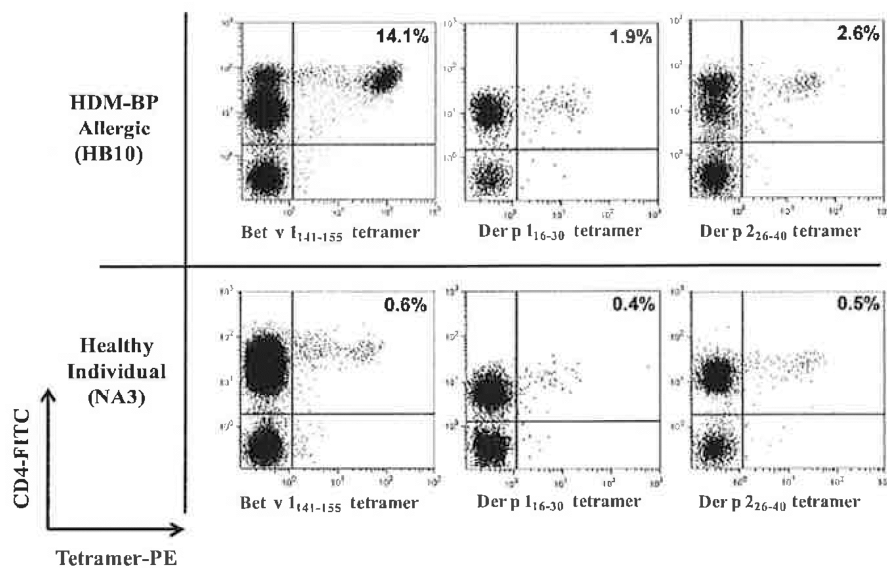


Fig. 2. Detection of either Bet v 1-, Der p 1- or Der p 2-specific CD4⁺ T cells in allergic and healthy individuals. PBMC from HLA-DRB1*1501 or HLA-DRB1*0101 individuals were stimulated for 18 days with either Bet v 1_{141–155}-, Der p 1- or Der p 2-derived epitope li-Key conjugates (10 µg/mL). Percentages of CD4⁺ tetramer-positive cells within CD3⁺ cells are indicated in the upper right quadrant. Background staining with the corresponding CLIP tetramers was always ≤0.1% CD4⁺ T cells.

1_{141–155}-specific CD4⁺ T cells were detected in most of the individuals tested (Table 2, Fig. 2), in agreement with our previous studies [13, 17]. Such tetramer staining is specific as only background reactivity (0.2% or less) is observed with irrelevant tetramers (i.e. corresponding HLA molecules associated with the CLIP or MAGE-3 peptides). Also, most tetramer staining is obtained within CD4⁺, but not CD4[−] T

cells (Fig. 1). Interestingly, Der p 1- and Der p 2-specific CD4⁺ T cells were also detected in healthy individuals, as well as in BP-allergic patients with no clinical history of HDM allergy, although often in lower quantities when compared with HDM allergics (Table 2 and Fig. 2, lower panel). As shown in Fig. 2 (upper panel), analyses conducted with PBMCs from a double HDM-BP allergic patient

confirm that a much stronger staining, reflecting superior tetramer avidity, is observed in Bet v 1_{141–155}-specific CD4⁺ T cells (MFI=81.9) when compared with mite-specific T cells (with MFI=8.3 and 13.2 for Der p 1_{16–30} and Der p 2_{26–40}-specific T cells, respectively).

Characterization of allergen-specific CD4⁺ T cells against Bet v 1, Der p 1 and Der p 2 in both allergic and healthy individuals

In a first set of experiments, we assessed the expression of surface markers by allergen-specific CD4⁺ T cells detected with either Bet v 1-, Der p 1- or Der p 2-specific MHC class II peptide tetramers. As shown in Fig. 3 (left panel), most Der p 1- and Der p 2-specific CD4⁺ T cells from mite-allergic patients ($n=8$) are CD45RO⁺, and a significant fraction are CD62L⁺ and CCR7⁺, corresponding to a central memory phenotype. In contrast, Bet v 1-specific CD4⁺ T cells from BP-allergic individuals ($n=7$) rather exhibit an effector memory profile (CD45RO⁺, CD62L low, CCR7 low), in agreement with our previous findings [13]. Interestingly, a central memory profile is always found for BP- and HDM allergen-specific CD4⁺ T cells in healthy individuals ($n=6$, Fig. 3, right panel). Importantly, two markers are better expressed by tetramer⁺ cells from non-allergic individuals when compared with allergics, independent of the allergen specificity. The latter include Cytokine T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4), which may provide a regulatory signal during immune responses [28]. Although not statistically significant, a trend is also observed for CXCR3, considered as a Th1 marker [29]. Surprisingly, significant differences are also found within allergics in terms of CXCR3 expression between mite and Bet v 1-specific responses.

We subsequently assessed cytokine production by tetramer⁺ cells. With the relatively low avidity of mite-specific tetramers as a limitation, we could perform a single-cell analysis of cytokine secretion using a surface capture assay in samples from nine individuals, including three

BP allergics, two mite allergics, four HDM/BP double allergics and one non-allergic (NA3) individual (Fig. 4a). These experiments confirmed that Der p 1- and Der p 2-specific cells from non-HDM-allergic individuals (Fig. 4a, patients BP4 and NA3) produce mostly IFN- γ , with or without IL-10 and IL-5, similarly to what is observed in non-BP allergics for Bet v 1_{141–155}-specific cells (e.g. Fig. 4a, patients HDM 19 and ref 13). Surprisingly, such a Th1 pattern of polarization biased towards IFN- γ production was also observed in Der p 1- or Der p 2-specific cells from 3 mite-allergic individuals (Fig. 4a, patients HDM15, HB10 and Fig. 4b, patient HB1) out of seven tested. Interestingly, T cell responses analysed in parallel in a double HDM-BP allergic individual (HB13) revealed that Th2 responses were stronger to Bet v 1 when compared with Der p 1. These experiments also confirmed that Bet v 1-specific CD4⁺ T cells in BP allergics (Fig. 4a, patients BP5, BP7, HB12, HB13) are mostly IL-5-producing *bona fide* Th2 cells. To further analyse CD4⁺ T cell polarization in mite allergics, we sorted tetramer-positive and -negative cells in four allergic patients for which cytokine surface capture assays were not possible, due to limited numbers of tetramer⁺ cells, and assessed, after RNA extraction, the expression of multiple cytokine genes by quantitative RT-PCR. As shown in Fig. 4b, significant differences were observed between donors, with mite-specific CD4⁺ T cells from allergic individuals expressing IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 and occasionally IL-17 cytokine genes, thus resulting in Th1 (patient HB1), Th2/Th17 (patient HDM13) or Th1/Th2 (patients HB8 and HB9) patterns of polarization, respectively.

Frequencies of Der p 1- and Der p 2-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood of mite-allergic patients

After purification of CD4⁺ T cells from PBMCs of mite-allergic patients, tetramer staining was performed without *in vitro* stimulation. In an analysis conducted in a blood sample collected in April, Der p 1- and Der p 2-specific

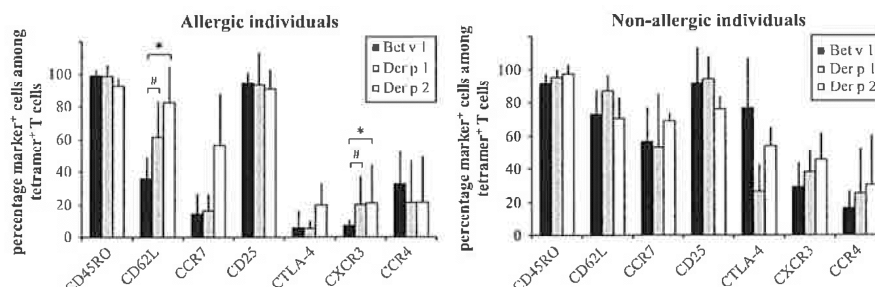


Fig. 3. Phenotypic analysis of either Bet v 1, Der p 1 or Der p 2 tetramer⁺ CD4⁺ T cells. PBMCs from allergic ($n=7$ for Bet v 1; $n=8$ for Der p 1; $n=4$ for Der p 2 tetramers) or non-allergic ($n=4$ for Bet v 1; $n=6$ for Der p 1; $n=3$ for Der p 2 tetramers) individuals were stained after 10–24 days of *in vitro* stimulation with appropriate major histocompatibility complex class II peptide tetramers together with a combination of antibodies directed against surface markers. Expressions of cell surface molecules by tetramer⁺ CD4⁺ T cells are indicated as median percentages $\pm$ SD. Statistical significance was determined using the Mann–Whitney test (* $P<0.05$; # $P=0.05$).

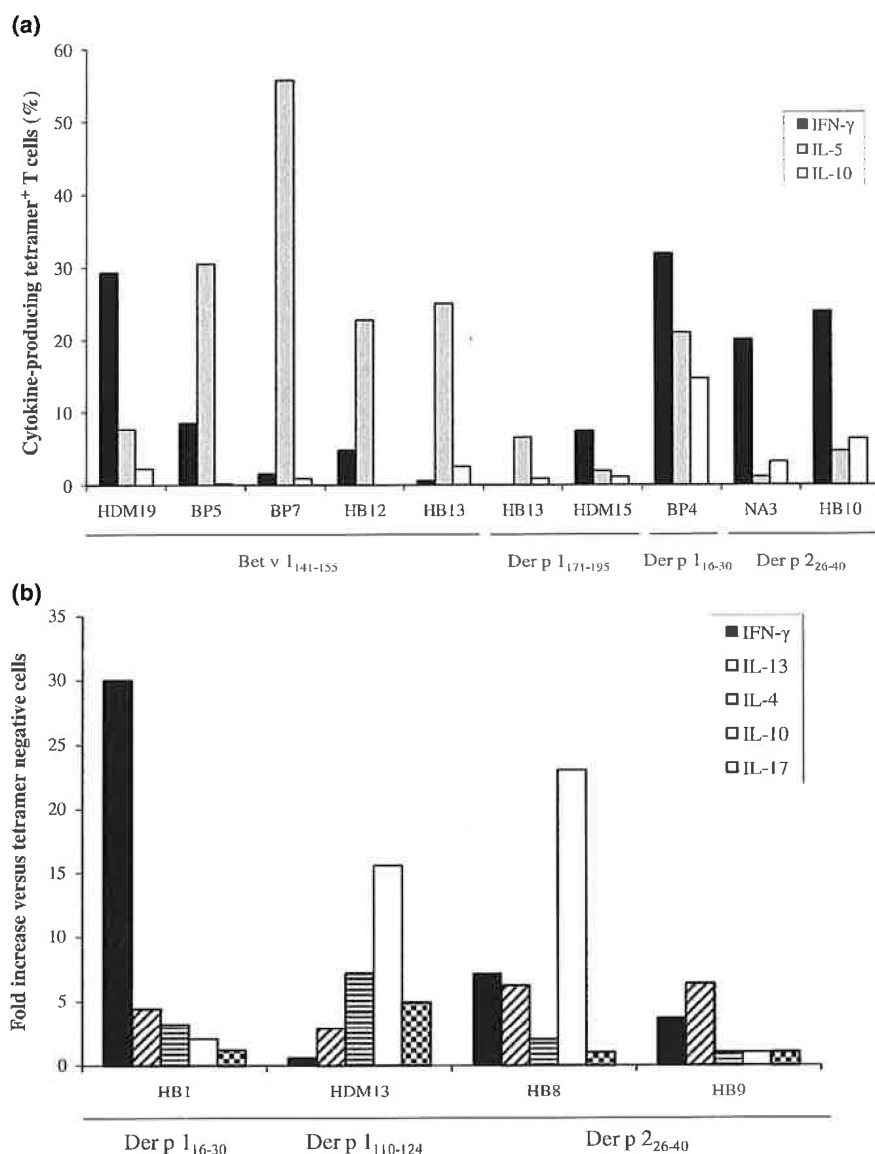


Fig. 4. Analysis of patterns of differentiation in Bet v 1-, Der p 1- or Der p 2-tetramer⁺ CD4⁺ T cells. (a) Bet v 1, Der p 1 or Der p 2 tetramer⁺ CD4⁺ T cells were analysed for IL-5, IL-10, IFN- γ production at a single cell level using a cytokine surface capture assay. (b) Tetramer⁺ CD4⁺ T cells from mite-allergic individuals were sorted using a MoFlo. Gene expression was analysed by quantitative PCR. Data are expressed as relative amounts of mRNA in sorted tetramer⁺ CD4⁺ T cells in comparison with sorted tetramer⁻ CD4⁺ T cells from the same donor. Data are normalized to amounts of β -actin.

CD4⁺ T cells were detected at frequencies between 1 and 2 cells among 10 000 CD4⁺ T cells, respectively, whereas none were stained with the control CLIP tetramer (Fig. 5). Circulating Der p 1_{16–30}, Der p 1_{171–185}, Der p 2_{26–40}, Der p 2_{107–121}-specific CD4⁺ T cells were detected at frequencies ranging from 1 to 6/10 000 cells in blood samples harvested throughout the year from 11 independent donors. Overall, as expected in the context of perennial exposure to the antigen, these results suggest that no major variation of circulating mite-specific CD4⁺ T cells occurs with time, besides a possible limited amplification in the last months of the year. We failed to detect

mite-specific T cells, and thus, to determine progenitor frequencies under those conditions in non-allergic individuals, consistent with our observation that the latter are usually present in lower quantities in the blood of non-allergics (Table 2).

Discussion

The present study was undertaken to compare CD4⁺ T cell responses against highly immunogenic seasonal Bet v 1 and perennial Der p 1 and Der p 2 allergens, in both allergic and non-allergic individuals. For this purpose, we

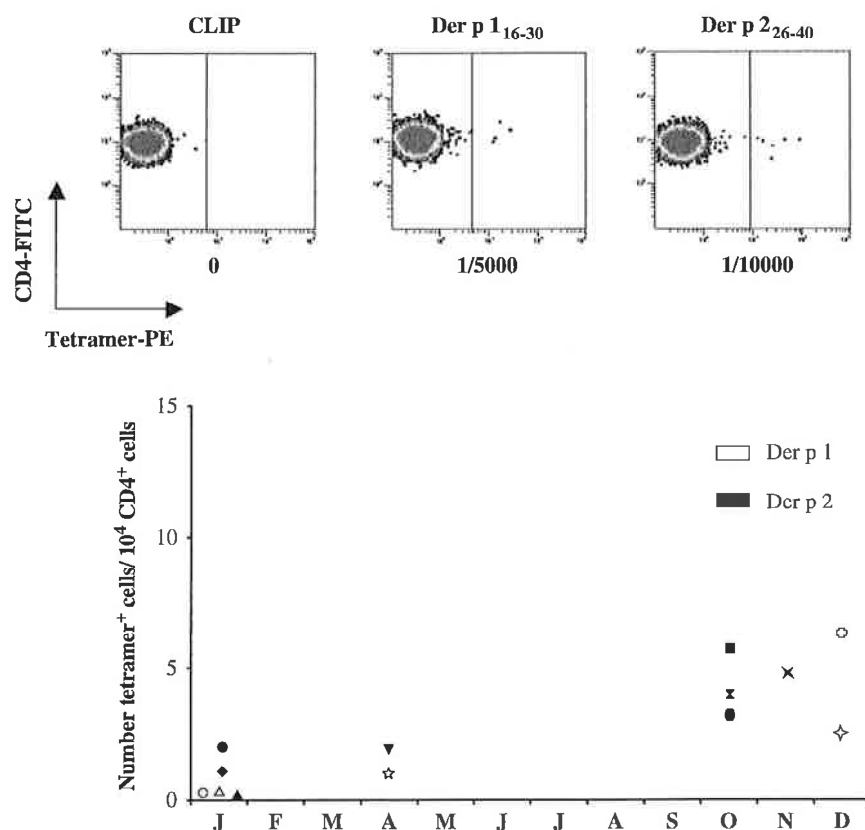


Fig. 5. Frequencies of Der p 1- and Der p 2-specific T cell progenitors. (a) CD4⁺ T cells were purified from PBMCs and stained with the following tetramer-peptide complexes: HLA-DRB1*0101-Der p 1₁₆₋₃₀, -Der p 2₂₆₋₄₀ or -CLIP as a control. The frequencies of specific T cells were evaluated as a ratio between the numbers of cells stained with specific tetramers minus the number of cells stained with CLIP tetramers over the number of CD4⁺ T cells analysed. (b) CD4⁺ T cells were purified from PBMCs from 11 independent donors at various time-points during the year and stained with tetramer-peptide complexes or -CLIP as above. The frequencies of specific T cells are expressed as the number of cells stained with specific tetramers minus the number of cells stained with CLIP tetramers per 10⁴ CD4⁺ T cells.

relied on MHC class II peptide tetramers as the most accurate tool to assess antigen-specific CD4⁺ responses. One prerequisite for developing stable high-avidity MHC class II peptide tetramers is to identify epitopes with a high affinity for HLA molecules within the allergen. To this end, we used computer algorithms to identify HLA-DR- or DP-restricted epitopes within Der p 1 (i.e. peptides 16–30, 37–51, 44–58, 110–124, 113–127, 138–152, 171–185, 207–221) and Der p 2 (peptides 26–40, 32–46, 107–121). We further confirmed, using *in vitro* binding assays, the presence of multiple MHC class II-restricted T cell epitopes within both Der p 1 and Der p 2 in agreement with previous studies [30–36]. Corresponding tetramers were subsequently engineered and successfully used to detect specific cells directed against some of those epitopes. Using these tools, we could detect mite-specific CD4⁺ T cells not only in allergic patients but also in non-allergics with various MHC class II haplotypes. This observation corroborates our previous findings observed with Bet v 1_{141–155} tetramers [13], with the difference that CD4⁺ T cell responses to mite allergens are directed to a broader

range of epitopes (i.e. Der p 1_{16–30}, 110–124, 171–185, Der p 2_{26–40}, 107–121), as opposed to a single immunoprevalent epitope within Bet v 1, in agreement with other reports from the literature [11, 14, 17, 30–36].

Allergen-specific CD4⁺ T cells from both allergic and non-allergic individuals are found within the CD45RO⁺ population. However, distinct memory profiles are observed between CD4⁺ T cells directed to seasonal Bet v 1 vs. perennial Der p 1 and Der p 2 allergens. At least two main categories of antigen-specific CD4⁺ T cells have been described, including (i) central memory cells, highly replicative, with lymph node-homing capacity and involved in long-lived responses to the antigen, and (ii) effector memory cells, rather poorly replicative, with tissue-homing capacity and effector function [37]. Both the nature and the timing of antigenic stimulation have been shown to influence the generation of memory T cells [38–40], raising the possibility that different conditions of allergen exposure may induce phenotypically and functionally distinct CD4⁺ T cell memory subsets. Indeed, we found that Bet v 1_{141–155}-specific CD4⁺ T cells exhibit a

higher TCR avidity for tetramers when compared with mite-specific T cells. Chronic exposure to HDM allergens likely explains the persistent central memory profile (CD62L⁺, CCR7⁺) observed most particularly in Der p 2 (and to a lesser extent in Der p 1)-specific CD4⁺ T cells, both in allergic and in non-allergic individuals. Interestingly, our results are consistent with the observation that CD4⁺ T cells directed to the perennial Fel d 1 cat allergen also maintain a central memory phenotype [16]. In contrast, BP allergics transiently exposed to Bet v 1 during the pollen season have rather circulating Bet v 1-specific CD4⁺ T cells with an effector memory profile (CD62L low, CCR7 low).

Irrespective of the allergen, specific CD4⁺ T cells from non-allergic individuals express higher levels of CTLA-4 and CXCR3 when compared with allergics. CTLA-4 plays a role in peripheral CD4⁺ T cell tolerance by negatively regulating T cell responses [28] and CXCR3 has been proposed to be a marker associated with Th1 responses [29]. Whereas we could detect Foxp 3⁺ bright Bet v 1-specific T cells in healthy individuals [13], such an analysis could not be conducted in Der p 1- or Der p 2-specific T cells due to the low avidity of the corresponding tetramers. Nonetheless, together with the observation that mite-specific CD4⁺ T cells express IFN- γ and to a lesser extent IL-10 in non-allergics (Fig. 4), our results are consistent with the hypothesis that the latter encompass predominantly Th1 and regulatory T cells, as also suggested by others [12]. Surprisingly, in contrast to *bona fide* Th2 responses directed to Bet v 1 observed in BP allergics, highly polymorphic CD4⁺ T cell responses are found in mite-allergic patients (Fig. 4). Specifically, CD4⁺ T cells directed to mite allergens often produce predominantly IFN- γ with or without Th2 cytokines, as reported in some studies [41, 42] but not others [43, 44]. In addition, some of these cells express the Th1 marker CXCR3 even in allergics, in contrast to Bet v 1-specific T cells (Fig. 3, left panel). The induction of such Th1 responses is surprising, most particularly for Der p 1, as the cysteine protease activity of this allergen has been linked to its propensity to elicit Th2 responses [45]. This discrepancy can possibly be explained by the fact that both Der p 1 and Der p 2 are presented within mites or dust samples in the context of high levels of endotoxin or other natural Th1 adjuvants [46, 47]. Alternatively, persistent exposure to high doses of antigen may lead to IFN- γ -producing CD4⁺ T cells, even in allergics [40, 42]. In addition, whereas most patients exposed to Bet v 1 develop allergic rhinitis linked with Th2 responses, mite-allergic patients with chronic exposure to such allergens also develop allergic dermatitis or asthma, possibly involving sustained Th1 or even Th17 responses [5, 48].

Using tetramers, we detected in HDM allergics circulating CD4⁺ T cells specific for Der p 1 and Der p 2 at frequencies in the range of 1 to 6/10 000 cells, in agreement with other studies relying either on limiting dilution

assays to quantify allergen-specific proliferating cells [41] or purification of cytokine-producing T cells [12]. Our results suggest that such frequencies do not vary significantly throughout the year, as expected for CD4⁺ T cells directed to perennial allergens. This result contrasts with our previous observation of a three-log transient expansion in BP-allergic patients as well as healthy individuals of circulating Bet v 1_{141–155}-specific CD4⁺ T cells during the BP season [13].

Altogether, with the limitation that only a few patients have been investigated, our study establishes that the CD4⁺ T cell responses differ between seasonal and perennial allergens, both in terms of the broadness and the spectrum of epitopes involved as well as the affinity of TCRs for corresponding antigens. We also observed that the Th2 vs. Th1/T Reg patterns of CD4⁺ T cell responses observed with Bet v 1 in allergics vs. non-allergics do not apply to mite allergens. Whereas it cannot be excluded that such differences are due to the inherent characteristics of Bet v 1 vs. Der p 1 and Der p 2 allergens, we hypothesize that distinct exposure conditions (i.e. sustained presence in the environment, association with natural Th1 adjuvants) lead to a variety of chronic inflammatory conditions, which in turn influence dramatically the nature of CD4⁺ T cells responses observed in peripheral blood. As an end result, whereas Bet v 1-specific CD4⁺ T cell responses are remarkably homogeneous in BP allergics or healthy individuals, mite-specific responses in HDM-allergic individuals are extremely variable. Immunotherapy protocols aiming to modulate existing immune responses to mite allergens should take into account such a diversity among patients, and efforts should be made to link selected patterns of T cell polarization with clinical benefit induced by such treatments.

Acknowledgements

We thank Martine Pinheiro for excellent secretarial assistance.

Conflict of interest: Some authors (M. B., V. B. B., H. M., L. V. O., P. M.) are employees at Stallergenes SA.

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Ebner C, Siemann U, Bohle B *et al.* Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:1007–5.
- 2 Till S, Dickason R, Huston D *et al.* IL-5 secretion by allergen-stimulated CD4⁺ T cells in primary culture: relationship to

- expression of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:563–9.
- 3 Akdis CA, Blaser K. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2000; 55:522–30.
 - 4 Robinson DS, Larche M, Durham SR. T regs and allergic disease. *J Clin Invest* 2004; 114:1389–97.
 - 5 El Biaze M, Boniface S, Koscher V et al. T cell activation, from atopy to asthma: more a paradox than a paradigm. *Allergy* 2003; 58:844–53.
 - 6 Macaubas C, Wahlstrom J, Galvao da Silva AP et al. Allergen-specific MHC-class II tetramer+ cells are detectable in allergic, but not in non allergic, individuals. *J Immunol* 2006; 176:5069–77.
 - 7 Durham SR, Till SJ. Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:157–64.
 - 8 Till S. Immunotherapy: readdressing the balance between TH2 and TH1 cells. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:981–5.
 - 9 Mavroleon G. Restoration of cytokine imbalance by immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1998; 28:943–9.
 - 10 Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006; 61:151–65.
 - 11 Ebner C, Schenk S, Najafian N et al. Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995; 154:1932–40.
 - 12 Akdis M, Verhagen J, Taylor A et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567–75.
 - 13 Van Overtvelt L, Wambre E, Maillère B et al. Assessment of Bet v 1-specific CD4⁺ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class II peptide tetramers. *J Immunol* 2008; 180:4514–22.
 - 14 Jahn-Schmid B, Radakovics A, Luttkopf D et al. Bet v 1 142–156 is the dominant T-cell epitope of the major birch pollen allergen and important for cross-reactivity with Bet v 1-related food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:213–9.
 - 15 Bateman EA, Ardern-Jones MR, Ogg GS. Identification of an immunodominant region of Fel d 1 and characterization of constituent epitopes. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1760–8.
 - 16 Bateman EA, Ardern-Jones MR, Ogg GS. Persistent central memory phenotype of circulating Fel d 1 peptide/DRB1*0101 tetramer-binding CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1350–6.
 - 17 Wambre E, Van Overtvelt L, Maillère B et al. Single cell assessment of allergen-specific T cell responses with MHC-class II peptide tetramers: methodological aspects. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146:99–112.
 - 18 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274:94–6.
 - 19 Danke NA, Kwok WW. HLA class II-restricted CD4⁺ T cell responses directed against influenza viral antigens postinfluenza vaccination. *J Immunol* 2003; 171:3163–9.
 - 20 McMichael AJ, Kelleher A. The arrival of HLA class II tetramers. *J Clin Invest* 1999; 104:1669–70.
 - 21 Ardern-Jones MR, Black AP, Bateman EA, Ogg GS. Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:5557–62.
 - 22 Kinnunen T, Jutila K, Kwok WW et al. Potential of an altered peptide ligand of lipocalin allergen Bos d 2 for peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:965–72.
 - 23 John-Schmidt B, Sirven P, Leb V et al. Characterization of HLA class II/peptide TCR interactions of the immunodominant T cell epitope in Art v 1, the major Artemisia pollen allergen. *J Immunol* 2008; 181:3636–42.
 - 24 Texier C, Pouvelle S, Busson M et al. HLA-DR restricted peptide candidates for bee venom immunotherapy. *J Immunol* 2000; 164:3177–84.
 - 25 Castelli FA, Buhot C, Sanson A et al. HLA-DP4, the most frequent HLA II molecule, defines a new supertype of peptide-binding specificity. *J Immunol* 2002; 169:6928–34.
 - 26 Kallinteris NL, Lu X, Blackwell CE, Von Hofe E, Humphreys RE, Xu M. Ii-Key/MHC class II epitope hybrids: a strategy that enhances MHC class II epitope loading to create more potent peptide vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:1311–21.
 - 27 Fourneau JM, Cohen H, van Ender PM. A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells. *J Immunol Methods* 2004; 285:253–64.
 - 28 Samoilava EB, Horton JL, Zhang H, Khoury SJ, Weiner HL, Chen Y. CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. *Int Immunol* 1998; 10:491–8.
 - 29 Campbell JD, Gangur V, Simons FE, HayGlass KT. Allergic humans are hyporesponsive to a CXCR3 ligand-mediated Th1 immunity-promoting loop. *FASEB J* 2004; 18:329–31.
 - 30 Ardern-Jones MR, Black AP, Bateman EA, Ogg GS. Bacterial superantigen facilitates epithelial presentation of allergen to T helper 2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:5557–62.
 - 31 Higgins JA, Thorpe CJ, Hayball JD, O'Hehir RE, Lamb JR. Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol* 1994; 93:891–9.
 - 32 Yssel H, Johnson KE, Schneider PV et al. T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p 1. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p 1-specific CD4⁺ T cell clones. *J Immunol* 1992; 148:738–45.
 - 33 Hales BJ, Thomas WR. T-cell sensitization to epitopes from the house dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Euroglyphus maynei*. *Clin Exp Allergy* 1997; 27:868–75.
 - 34 Joost van Neerven R, van t'Hof W, Ringrose JH et al. T cell epitopes of house dust mite major allergen Der p 2. *J Immunol* 1993; 151:2326–35.
 - 35 O'Hehir RE, Verhoef A, Panagiotopoulou E et al. Analysis of human T cell responses to the group II allergen of *Dermatophagoides* species: localization of major antigenic sites. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92:105–13.
 - 36 Verhoef A, Higgins JA, Thorpe CJ et al. Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp. identification of HLA-DR and DQ restricted T cell epitopes. *Int Immunol* 1993; 5:1589–97.
 - 37 Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:326–32.
 - 38 Kalia V, Sarkar S, Ahmed R. Fine-tuning CD4⁺ central memory T cell heterogeneity by strength of stimulation. *Eur J Immunol* 2008; 38:15–9.
 - 39 Malavige GN, Jones L, Black AP, Ogg GS. Varicella zoster virus glycoprotein E-specific CD4⁺ T cells show evidence of recent activation and effector differentiation, consistent with frequent exposure to replicative cycle antigens in healthy immune donors. *Clin Exp Immunol* 2008; 152:522–31.

- 40 Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J Immunol* 2005; **174**:1037–45.
- 41 Thomas WR, Hales BJ. T and B cell responses to HDM allergens and antigens. *Immunol Res* 2007; **37**:187–99.
- 42 Gardner LM, Spyroglou L, O'Hehir RE, Rolland JM. Increased allergen concentration enhances IFN γ production by allergic donor T cells expressing a peripheral tissue trafficking phenotype. *Allergy* 2004; **59**:1308–17.
- 43 Wierenga EA, Snock M, Henk M *et al.* Human allergen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J Immunol* 1991; **147**:2942–9.
- 44 Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP *et al.* Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**:4538–42.
- 45 Chapman MD, Wünschmann S, Pomés A. Protease as Th2 adjuvants. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; **7**:363–7.
- 46 Trivedi B, Valerio C, Slater JE. Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2003; **111**:777–83.
- 47 Barret NA, Maekawa A, Rahman OM, Austen KF, Kanaoka Y. Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *J Immunol* 2009; **182**:1119–28.
- 48 Zhang N, Van Zele T, Perez-Novo C *et al.* Different types of T-effector cells orchestrate mucosal inflammation in chronic sinus disease. *J Allergy Clin Immunol* 2008; **122**:961–8.

4.2 Article II : Les caractéristiques des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes périphériques ne permettent pas de prédire l'efficacité précoce de l'ITA sublinguale aux pollens de graminées

Alors que l'efficacité clinique de la désensibilisation par voie sublinguale est largement démontrée, les mécanismes d'action et les biomarqueurs d'efficacité prédictifs et de suivi de l'ITA n'ont pas encore été clairement identifiés. Certaines études montrent que le traitement induit une réorientation de la polarisation des lymphocytes T CD4 d'un profil « Th2 » vers un profil « Th1 », et la génération de lymphocytes Treg, tandis que d'autres ne parviennent pas aux mêmes conclusions. De plus, la mise en évidence de corrélations entre l'efficacité clinique et les changements immunologiques relatifs aux réponses lymphocytaires T lors d'études longitudinales sur grande cohorte est limitée par la difficulté de standardiser l'analyse *in vitro* des lymphocytes T CD4.

L'étude clinique de phase I VO56.07A a été menée en double aveugle chez 89 patients allergiques aux pollens de graminées, pour évaluer l'efficacité et la rapidité d'action d'un comprimé sublingual de désensibilisation pris quotidiennement pendant 4 mois et contenant un extrait de 5 graminées ou un placebo. Cette étude réalisée hors saison pollinique était ponctuée de challenges allergéniques en chambre à pollens. Ceci a permis d'évaluer le score symptôme de rhinite total moyen de chaque patient tout au long du traitement et de le corrélérer aux 140 paramètres immunologiques testés en parallèle. Ces paramètres ont été sélectionnés sur la base des connaissances relatives aux mécanismes d'action supposés de l'ITA, comme l'activation des basophiles ou la réponse humorale. Dans cet article, nous nous concentrerons sur les réponses lymphocytaires T CD4 périphériques. Ces dernières ont été étudiées sur des échantillons prélevés avant les stimulations en chambre avant, et après 2 et 4 mois d'ITA, via l'analyse de la prolifération, du phénotype, de la sécrétion de cytokines et de l'expression de gènes des lymphocytes T CD4 totaux. Nous avons également suivi les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec des tétramères de molécules de classe II du CMH.

A l'issue de cette étude, l'ITA s'est avérée cliniquement efficace avec une amélioration de 29.3% du score symptôme de rhinite total moyen par rapport au groupe placebo. Au niveau de la réponse lymphocytaire T CD4 totale, nous avons observé une diminution significative de la proportion de lymphocytes Th2 (CRTh2⁺ et CCR4⁺), une augmentation des lymphocytes

Treg (CD127⁻/CD25⁺/Foxp3⁺) et aucune variation au niveau des lymphocytes Th1 (CXCR3⁺). Toutefois, ces variations ont été observées à la fois dans les groupes actif et placebo. L'analyse phénotypique simultanée de 5 marqueurs membranaires récemment décrits comme permettant de discriminer les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes (Th2A) a également été réalisée. A l'échelle de la cohorte, le pourcentage de lymphocytes Th2A est stable au cours du temps dans le groupe placebo, alors qu'il est significativement diminué après 4 mois de traitement dans le groupe actif. A l'échelle individuelle, nous avons observé que chez les patients placebo la proportion de lymphocytes Th2A varie de manière aléatoire au cours du traitement, alors qu'elle est stable ou diminuée chez les actifs.

Après 4 mois d'ITA, l'expression des gènes codant pour l'IL-4 et d'IL-10 par les PBMCs suite à une stimulation spécifique *in vitro* est diminuée dans le groupe actif. Des résultats similaires ont été obtenus quant à la sécrétion d'IL-10. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de lien entre ces modifications et l'efficacité clinique à l'échelle individuelle. Le suivi des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec les tétramères de molécules de classe II du CMH a été réalisé pour 32 patients. Il a confirmé l'absence de modifications du phénotype et de la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes reliées au traitement.

Ainsi, aucune modification des réponses des lymphocytaires T CD4 périphériques n'a pu être reliée à l'efficacité clinique de l'ITA dans cette étude de 4 mois. Elles ne peuvent donc pas être utilisées comme biomarqueurs d'efficacité clinique précoce de l'ITA sublinguale. De plus, nous avons soulevé la difficulté de mettre en œuvre des conditions expérimentales standardisées pour l'étude des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques lors d'études longitudinales.

Allergen-specific CD4⁺ T cell responses in peripheral blood do not predict the early onset of clinical efficacy during grass pollen sublingual immunotherapy.

M. Bonvalet¹, H. Moussu¹, E. Wambre², C. Ricarte¹, S. Horiot¹, AC. Rimaniol³, WW. Kwok², F. Horak⁴, O. de Beaumont¹, V. Baron-Bodo¹, P. Moingeon¹.

¹ Stallergenes, 92160 Antony, France

² Benaroya Research Institute, Seattle, WA, USA

³ Bertin Pharma, 78180 Montigny le Bretonneux, France

⁴ The ENT Department, Medical University, Vienna, Austria

Correspondence: Philippe Moingeon, Research and Development, Stallergenes,

6 rue Alexis de Tocqueville, 92160 Antony, France,

Tel : +33 1 55 59 25 20

Fax : +33 1 55 59 21 02,

e-mail : pmoingeon@stallergenes.fr

Short Title: CD4⁺ T cell responses during sublingual immunotherapy

Key Words: CD4⁺ T lymphocyte, grass pollen, MHC class II tetramers, sublingual immunotherapy

Word count: 4322 (max: 2500)

ABSTRACT

Background: Surrogate biomarkers of efficacy are needed in support of allergen specific immunotherapy. The aim of this study was to relate changes in peripheral CD4⁺ T cell responses to clinical efficacy during sublingual immunotherapy (SLIT).

Methods: CD4⁺ T cell responses were assessed in PBMCs from 89 grass pollen allergic individuals enrolled in a double blind placebo-controlled SLIT study conducted in an allergen exposure chamber. Surface phenotype, proliferative responses, cytokine production and gene expression were analyzed in coded samples at baseline, and after 2 and 4 months of SLIT, either *ex vivo*, in PBMCs after *in vitro* allergen stimulation or in MHC class II/peptide (pMHCII)-tetramer reactive CD4⁺ T cells.

Results: The four-month SLIT course induced a 29.3% improvement of the average rhinoconjunctivitis total symptom score in the active group, when compared to the placebo group. In parallel, only minor changes in Th1 (CCR5⁺), Th2 (CRTh2⁺, CCR4⁺) and Treg (CD25⁺ CD127⁻ Foxp3⁺) markers were detected in CD4⁺ T cells from patients in both active and placebo groups. A down-regulation of IL-4 and IL-10 (p<0.001) gene expression and IL-10 secretion (p<0.01) were observed, as well as a decrease in potential “pro-allergic” Th2A cells from patients receiving active tablets (p<0.01), but without any correlation with clinical benefit. pMHCII-tetramer analysis of Phl p 1- and Phl p 5-specific CD4⁺ T cells confirmed that SLIT clinical responses are not associated with dramatic alterations in T lymphocyte polarization.

Conclusion: Changes in patterns of peripheral CD4⁺ T cells are not a marker for the early onset of efficacy during SLIT.

Word Count: 252 (max: 250)

INTRODUCTION

There is a major interest in monitoring immunological changes induced by allergen-specific immunotherapy to identify surrogate markers of clinical efficacy. Herein, we focus on sublingual immunotherapy (SLIT), now well established as an efficacious treatment for type I respiratory allergies (1, 2). SLIT has been proposed to reorient allergen-specific CD4⁺ T cells from a Th2 to a Th1 profile (immunodeviation) (3-7). In addition, it induces regulatory T cells exhibiting a suppressive activity, via IL-10 or TGF- β secretion as well as cell-cell contact (3-16). Although most of these changes have been observed in peripheral blood, recent studies have suggested an alteration in patterns of CD4⁺ T cell responses within the nasal mucosa (12). In contrast, other studies failed to document changes in allergen-specific T cell responses during SLIT longitudinal studies (17, 18). Importantly, in all circumstances, the link between modulation of circulating allergen-specific CD4⁺ T cells and clinical improvement remains to be firmly established.

One inherent difficulty to document the impact of immunotherapy on CD4⁺ T cells is to rely upon well standardized assays (19). In this regard, allergen-specific CD4⁺ T cell responses are commonly analyzed by monitoring proliferation, activation and cytokine secretion in PBMCs following *in vitro* allergen stimulation. More recently, the availability of MHC class II-peptide (pMHCII)-tetramers made it possible to investigate at a single cell level the polarization of adaptive immune responses against selected epitopes within a given allergen (20, 21). Herein, combining those approaches, we took advantage of a successful double blind placebo-controlled study conducted in an allergen challenge chamber to thoroughly investigate early effects of SLIT on allergen-specific CD4⁺ T cell responses. In this study, clinical efficacy was documented at an individual patient level in a cohort of grass pollen allergic patients as early as after 1 month of SLIT and over the 4 month study period, thereby offering an opportunity to investigate a potential correlation with changes in T cell polarization. We document that changes in phenotype and cytokine secretion in grass pollen-specific CD4⁺ T cells induced by SLIT in such a time frame are limited and unrelated to clinical improvement.

MATERIAL AND METHODS

Design of the VO56.07A SLIT study conducted in an allergen challenge chamber

Details of this study have been published elsewhere (22). Briefly, this randomized, double-blind placebo-controlled study was performed after approval from Austrian health authorities between the 2007 and 2008 grass pollen seasons in an allergen exposure chamber, at the Allergy Center of Vienna West (Austria). Patients (men and women 18 to 50 years old) suffering from moderate-to-severe grass pollen-related allergic rhinoconjunctivitis were selected based on both seric IgE levels ≥ 0.7 kU/L for timothy grass (assayed with the UniCAP system, Phadia, Uppsala, Sweden), a positive skin prick test and a positive response to a grass pollen challenge test (22). After screening and providing written informed consent, 89 subjects were randomized 1:1 to receive sublingually once a day for 4 months, either a placebo or a 300-IR SLIT tablet containing a pollen extract obtained from orchard, meadow, perennial rye, sweet vernal and timothy grasses (Stallergenes SA, Antony, France) (23, 24). Patients were challenged with grass pollens before treatment (baseline challenge), as well as after 1 week and 1, 2, and 4 months of SLIT, with nasal and eye symptoms quantified as reported elsewhere, to establish an average rhinoconjunctivitis total symptom score (ARTSS) (22).

Blood collection and processing

Venous blood samples were collected from each patient into citrate tubes before (visit 3 or V3) and after 2 (visit 6 or V6) and 4 (visit 7 or V7) months of treatment, prior to *in vivo* allergen challenge. PBMCs were isolated by centrifugation on Ficoll-Paque Plus (PAA, les Mureaux, France) and re-suspended in cell culture medium (RPMI 1640-glutamax medium supplemented with 10% heat-inactivated AB serum (PAA), 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycin Antibiotic Mixture, 50 μ M β -mercaptoethanol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 mM HEPES buffer (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). All analyses, except surface phenotyping and proliferative responses, were conducted on frozen cells. To this aim, PBMCs were re-suspended in cold Fetal Calf Serum (FCS, PAA) containing 10% DMSO (Sigma-Aldrich) and frozen at 10^7 cells/mL in cryovials (Nunc, Roskilde, Denmark). Vials were placed in a pre-cooled Mr. Frosty-style freezing container at -80°C

for at least 24 hours, then stored in liquid nitrogen. For functional analyses, PBMCs from a given patient collected at V3, V6 and V7 were thawed at the same time and processed in parallel. All samples were coded to the operators with respect to their origin (i.e. patient from active or placebo group, clinical responder *versus* non responder) until completion of biological analyses.

***Ex vivo* phenotyping of CD4⁺ T cells**

Freshly isolated PBMCs were surface stained for 20 min at 4°C in the dark with the following antibodies: PC7 anti-CD3, FITC anti-CD45RO, PC5 anti-CD62L, PC5 anti-CCR5, PC5 anti-CXCR3 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), ECD anti-CD4, PE anti-CRTh2 (clone BM16.23), PC5 anti-CD25 (Beckman Coulter, Villepinte, France), FITC anti-CD30, PE anti-CD127, PE anti-GITR (eBioscience, San Diego, CA, USA), FITC anti-CD103 (Dako, Trappes, France), FITC anti-CCR4 (clone 205410), PE anti-CTLA-4 (R&D Systems, Lille, France). As a control, cells were stained with corresponding isotype-matched mAbs. Foxp3 expression was measured using a specific antibody (Clone PCH101, eBioscience) after cell permeabilization, according to the manufacturer's instructions. Cells were then analyzed with a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter).

Potential highly “pro-allergic” Th2 (i.e. Th2A) cells were detected among terminally differentiated memory Th2 (i.e. CD45RO⁺/CD27⁻/CRTh2⁺) cells in frozen PBMCs based upon a combination of 5 surface markers. These cells were shown to contain allergen-specific CD4⁺ T cells with a capacity to produce high levels of Th2 cytokines (Wambre et al., unpublished results). Percentages of Th2A cells among memory CD4⁺ T cells were normalized to 100 for each patient at baseline.

Proliferative responses of allergen-stimulated PBMCs

Freshly isolated PBMCs were seeded in quadruplicate in flat-bottomed 96-well microplates at 2×10^5 cells in 200 µL of cell culture medium. Cells were then stimulated with medium alone or with allergens [i.e. 1000 IR/mL 5 grass pollen extract, or 10 µg/mL purified Dac g 5, (Stallergenes SA), or 10 µg/mL recall antigens such as Diptheria toxoid (DT) + Tetanus toxoid (TT) (Sanofi-Pasteur, Marcy l'Etoile, France) + purified protein derivative (PPD) from *Mycobacterium bovis* (Statens Serum

Institute, Copenhagen, Denmark)] or 1 µg/mL Phytohemagglutinin-P (PHA-P, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) as a positive control. Cells were cultured for 6 days at 37°C in a 5 % CO₂ atmosphere. After 3 or 6 days of PHA or allergen/antigen stimulation, respectively, [³H]-Thymidine (1 µCi per well, Amersham, Aylesbury, United Kingdom) was added to each well. Cells were then incubated for 8 hours at 37°C in 5 % CO₂, and DNA-incorporated radioactivity was quantified using a Wallac Beta scintillation counter (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Results are expressed as a stimulation index, obtained as a mean ratio of responses induced by antigen *versus* culture medium alone.

Analysis of cytokine secretion or gene expression by PBMCs.

PBMCs frozen at visits V3, V6 and V7 from a given patient were thawed and re-suspended in culture medium overnight at 37°C in 5% CO₂. PBMCs were then seeded at a 2 x 10⁶/mL concentration and stimulated with grass pollen extract (400 IR/mL, Stallergenes SA) or recall antigens (DT+TT+PPD) prior to collecting cells and culture supernatants. IL-2, IL-6, IL-10 and TNF-α, as well as IFN-γ, IL-5, IL-10, and IL-13 were measured in supernatants after 1 or 5 days of stimulation, respectively, by CBA Flex Sets from BD Biosciences, according to the manufacturer's instructions. TGF-β was measured at days 1 and 5, and IL-17A at day 5 by ELISA Ready-SET-Go kit (eBioscience).

Total RNA was extracted from unstimulated and stimulated PBMCs with a RNeasy Mini kit using Qiacube (Qiagen, Courtaboeuf, France) and reverse transcribed in cDNAs using the TaqMan Reverse transcription reagent kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17, TGF-β, Foxp3, GATA3 and T-bet gene expression was assessed by quantitative PCR using pre-designed Taqman Real-Time PCR System (Applied Biosystems). IL-4 and IL-17 mRNAs were quantified in stimulated cells in comparison with β-actin mRNA as a control. For other genes, results were normalized to levels of β-actin and expressed as fold-changes in comparison with baseline mRNA levels in unstimulated cells.

pMHCII-tetramer analysis of CD4⁺ T cells specific for Phl p 1 and Phl p 5

pMHCII-tetramer analyses were performed as previously described (25, 26). Briefly, after extraction of genomic DNA from blood and HLA typing, patients with HLA-DRB1*0101 (DR1), HLA-DRB1*0301 (DR3), HLA-DRB1*0401 (DR4) or HLA-DRB1*1501 (DR15) haplotypes were selected (25). DR15 patients were analyzed using HLA-DRB5 pMHCII-tetramers (27).

To expand CD4⁺ T cells specific for Phl p 1 and Phl p 5, frozen PBMCs from patients with either a DR1, DR3, DR4 or DR15 haplotype (n=32), were thawed and seeded in culture medium at 37°C in 5% CO₂, in 12- or 48-well plates at 3-5 x 10⁶ cells/mL. Cells from DR1 and DR3 patients were stimulated for 14-16 days with Phl p 1₁₅₃₋₁₇₂ or Phl p 1₁₇₁₋₁₈₅ peptides (used at 10 µg/mL). Cells from DR4 patients were incubated with 20 µg/mL Phl p 1₁₀₀₋₁₁₄ peptides in the form of Ii-key conjugate peptide mixes, as described elsewhere (25, 28). Cells from patients with a DR15 haplotype were stimulated with 10 µg/mL of a pool of Phl p 5a₃₃₋₅₂, Phl p 5a₂₃₃₋₂₅₂ and Phl p 5b₁₂₉₋₁₄₈ peptides. At day 6, and every 3 days thereafter, 20 UI/mL recombinant IL-2 (Roche, Meylan, France) was added to cell cultures. After amplification for 14-16 days, epitope-specific CD4⁺ T cells were stained for one hour with corresponding PE-conjugated pMHCII-tetramers (1 µg/mL at room temperature, or 10 µg/mL at 37°C for DRB5 pMHCII-tetramers). All pMHCII-tetramers used in this study were produced by the Benaroya Research Institute (Seattle, WA, USA) (29). pMHCII-tetramers loaded with irrelevant peptides were used as controls.

For phenotyping, tetramer⁺ cells from DR1, DR3 and DR4 patients were subsequently stained for 20 min at 4°C with the following antibodies: FITC anti-CD25 (Beckman Coulter), FITC anti-CD45RO, APC anti-CD62L, APC anti-CTLA-4, PC7 anti-CCR4, PC7 anti-CCR7, Alexa Fluor 488 anti-CXCR3 (BD Biosciences), FITC anti-CCR6 (eBioscience). Cells were also stained with APC or PC7 anti-CD4, ECD anti-CD14 and ECD anti-CD19 antibodies (all from Beckman Coulter) and subsequently with Via-Probe (BD Biosciences) for 10 minutes at 4°C to exclude monocytes, B cells and dead cells, respectively (30). Cells were analyzed using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter), with a minimum of 100 pMHCII-tetramer⁺ CD4⁺ T cells accumulated.

IL-5, IL-10 and IFN- γ secretion was assessed in Phl p 1-specific CD4⁺ T cells using a cytokine secretion assay (CSA) (30), whereas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17 and IFN- γ production was measured in Phl p 5-specific CD4⁺ T cells using intracellular cytokine staining, as described elsewhere (26). Cells were stimulated for 4-5 hours with appropriate peptide mixes (10-20 μ g/mL) for CSAs and with 50 ng/mL PMA and 1 μ g/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) in presence of 10 μ g/mL monensin (BD Pharmingen) for intracellular cytokine staining. After fixation and permeabilization, cells were further stained with various combinations of antibodies including: Alexa Fluor 700 anti-IFN- γ (4S.B3), PC7 anti-IL-17 (BL168), Alexa Fluor 488 anti-IL-10 (JES3-9D7) and APC anti-IL-4 (8D4-8; eBioscience) or corresponding isotype-matched mAbs. Cells were then analyzed using a LSRII flow cytometer (Becton Dickinson), with a minimum of 500 pMHCII-tetramer reactive cells acquired.

Statistical analysis

The gaussian distribution of data obtained was evaluated using Agostino and Pearson omnibus normality tests. Accordingly, results were further analyzed using either non parametric Kruskal-Wallis tests with Dunn's multiple comparison or parametric one-way ANOVA tests with Bonferonni's multiple comparison. Spearman and Pearson tests were used as specified for correlation analyses. Data are represented using Tukey box plots summarizing median, upper and lower quartiles as well as minimum and maximum data values excluding outliers (i.e. values inferior or superior by 1.5 fold to lower and upper quartiles, respectively).

RESULTS

Summary of clinical efficacy results

Clinical results of the study were previously reported in details elsewhere (22). Briefly, in the active group, the ARTSS mean improvement from baseline reached 30.9% and 41.8% after 1 month and 4 months of treatment, respectively, and 12.9% and 18.5% after 1 and 4 months of treatment, respectively in the placebo group. Changes of ARTSS from baseline were significantly higher in the active group when compared to the placebo group ($p<0.001$), thus establishing unambiguously the clinical efficacy of this SLIT protocol (22). Symptom improvement determined for each individual patient was plotted against SLIT-induced changes in biological parameters (see below).

Phenotyping of peripheral blood CD4⁺ T cells

PBMCs isolated from each patient before (V3), and after 2 (V6) and 4 (V7) months of SLIT, were surface stained with antibodies specific for various markers associated with either Th1, Th2 or Treg cells. Percentages of Th2 (i.e. CRTh2⁺ or CCR4⁺) cells significantly decreased in both active and placebo groups after 2 months of treatment ($p<0.01$ and $p<0.001$ for the placebo and active groups, respectively) and then remained stable (Fig. 1A). CXCR3⁺ Th1 cells underwent no significant variation during the treatment. In contrast, CCR5 expression, also associated with Th1 polarization, significantly decreased after 2 months of SLIT, in both placebo and active groups ($p<0.001$). Potential CD4⁺ Treg cells (i.e. CD25⁺ CD127⁻ Foxp3⁺) increased substantially after 4 months of immunotherapy, irrespective of the treatment group ($p<0.001$). CTLA-4⁺ CD4⁺ T cells were marginally increased from baseline after 2 months of treatment in both active and placebo groups (data not shown), whereas GITR expression decreased during treatment in the active group ($p<0.001$) (Fig. 1A). Although not shown, no variations were observed regarding CD45RO⁺/CD62L⁺ CD45RO⁺/CD62L⁻, CD30⁺ and CD103⁺ CD4⁺ T cell subsets.

To complement those analyses conducted on global T cell populations irrespective of their specificity, circulating potential “pro-allergic” CD4⁺ T cells producing high levels of Th2 cytokines in response to

allergen, further referred as “activated” Th2A cells, were detected within PBMCs with a combination of 5 antibodies. Percentages of Th2A cells remained stable in the placebo group, whereas they significantly decreased after 4 months of SLIT in the active group (from 100% to 82.8% $\pm$ 38, $p < 0.01$) (Fig. 1B, left panel). At an individual level, a decrease in percentages of Th2A cells was observed in most active patients whereas a larger heterogeneity was seen for placebo patients (Fig. 1B, right panels). Collectively, although some phenotypic changes in peripheral CD4⁺ T cells were detected in this study, only the small decrease in Th2A cells, thought to contain most allergen-specific CD4⁺ T cells was observed in the active but not placebo group.

Proliferative response, gene expression and cytokine production in allergen-stimulated PBMCs

The proliferative capacity of allergen-stimulated PBMCs was further assessed by measuring [³H]-Thymidine incorporation before, and after 2 and 4 months of SLIT, following *in vitro* stimulation with either grass pollen allergens, purified Dac g 5 or recall antigens. PHA-induced proliferation was used as a positive control in those experiments. Proliferative responses to grass pollen extract observed in all patients at baseline were not altered during SLIT, in both active and placebo groups (Fig. 2, upper left panel). A slight but significant decrease in cell proliferation in response to Dac g 5 stimulation was observed in placebo-treated patients after 4 months of SLIT ($p < 0.05$) (Fig. 2, upper right panel). However, the relevance of such variation is questionable since a decrease in proliferative responses to recall antigens was also seen over time, even if responses to PHA stimulation remained stable (Fig. 2 lower panels).

We subsequently analyzed the expression of genes encoding transcription factors or cytokines in PBMCs stimulated for 1 and 5 days with either a 5-grass pollen extract or recall antigens to those in unstimulated cells at various time points during SLIT. Regarding transcription factors, the expression of T-bet, but not GATA3 or Foxp3, was up-regulated in PBMCs obtained after 2 months of SLIT ($p < 0.001$) from patients in both placebo and active groups, but it did not differ from baseline levels after 4 months (Fig. 3A, upper panels). TGF- β gene expression was significantly up-regulated at V7 in PBMCs from the placebo group ($p < 0.01$) (Fig. 3A, lower left panel). Although not shown, similar

trends were observed after recall antigen stimulation for both T-bet and TGF- β gene expression. IFN- γ and IL-17 gene expression was not significantly modified during SLIT (Fig. 3A). A decrease in IL-10 mRNA was detected in both placebo and active groups when comparing samples from V3 and V6 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), but this down-regulation was even stronger in V7 samples only in the active group ($p < 0.001$) (Fig. 3A). Such variations were not seen for recall antigen-induced IL-10 mRNA levels (data not shown). IL-4 mRNA levels significantly decreased from baseline after 2 months ($p < 0.01$) and even further after 4 months of treatment ($p < 0.001$) in the active group only (Fig. 3A).

To confirm and extend these results, cytokines were further quantified in supernatants of PBMCs, following stimulation with a 5-grass pollen extract. Levels of IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, TGF- β and TNF- α secreted by PBMCs were stable in both active and placebo groups during the 4 months of SLIT relative to baseline (Fig. 3B). We observed a sustained decrease of IL-10 secretion during SLIT, reached significantly only in the active group (Fig. 3B).

Monitoring of Phl p 1- and Phl p 5-specific CD4⁺ T cells using pMHCII-tetramers

To further investigate changes in allergen-specific CD4⁺ T cells, analyses with pMHCII-tetramers were conducted in PBMCs from 32 subjects exhibiting either DR1, DR3, DR4 or DR15 haplotypes, following *in vitro* peptide-driven amplification for 14-16 days, as described in Methods. We detected Phl p 1- or Phl p 5-specific CD4⁺ T cells in PBMCs from 29 patients, irrespective of the time-point considered (Fig. 4A). Higher percentages of pMHCII-tetramer positive cells were detected in CD4⁺ PBMCs from patients exhibiting DR4 or DR15 haplotypes, probably due to the higher avidity of corresponding tetramers. No significant variations were observed during SLIT in patients treated with placebo or active tablets, regarding both numbers of circulating pMHCII-tetramer positive CD4⁺ T cells as well as mean fluorescence intensities, the latter reflecting tetramer binding avidities (Fig. 4A, left and right panels, respectively). Phenotypic and functional properties of Phl p 1- and Phl p 5-specific CD4⁺ T cells were further characterized at a single cell level in samples from patients displaying sufficient (i.e. $>0.5\%$) pMHCII-tetramer-reactive cells among CD4⁺ T cells. Surface

phenotypes could be assessed in 6 patients from the active group and functional analyses were conducted using either CSA (n=4 active patients) or intracellular cytokine staining (n=5, including 4 placebo patients and 1 active patient analyzed with 3 different peptides). Besides individual variations, no clear trend discriminating patients from placebo and active groups was observed during SLIT in the polarization of pMHCII-tetramer⁺ CD4⁺ T cells, irrespective of the epitope considered, when comparing markers associated with either Th2 (i.e. CCR4⁺, IL-4⁺ and IL-5⁺), Th1 (i.e. CXCR3⁺ and IFN- γ ⁺), Treg (i.e. CTLA-4⁺, and IL-10⁺) or Th17 (i.e. CCR4⁺/CCR6⁺ and IL-17⁺) subsets (Fig. 4B-D). Proportions of effector and central memory specific CD4⁺ T cells did not fluctuate during treatment. Whereas a stable expression of CD25 by specific CD4⁺ T cells was observed in most patients, a decreased expression after 4 months of treatment was detected in 2 patients, without any relationship with clinical benefit (data not shown). Altogether, pMHCII-tetramer based analyses confirmed that a 4 month SLIT course does not induce any depletion of Th2 cells or significant variation in the polarization of peripheral allergen-specific CD4⁺ T cells.

Correlation between biological changes and clinical efficacy

We further analyzed the potential correlation between the few biological changes detected in PBMCs related to treatment (i.e. observed in active but not in placebo patients) and clinical efficacy of SLIT. Specifically, we focused on those variations suggesting a potential decrease in Th2 responses, which were plotted against improvement in the ARTSS documented for each individual patient. As shown in Fig. 5, no relationship was found between clinical efficacy and the decrease observed in the active group of circulating Th2A cells. Similarly, the down-regulation of IL-4 or IL-10 gene expression as well as IL-10 secretion by allergen-stimulated T cells were also unrelated to clinical benefit (Fig. 5).

DISCUSSION

CD4⁺ T cells play a major role in both allergic inflammation and its resolution, through the production of distinct sets of cytokines (31). Th2 cells contribute directly to allergen-driven pathogenesis, by controlling B cell differentiation and antibody class switching towards IgE production on one hand, and by recruiting and activating proinflammatory eosinophils, basophils and mast cells in target organs on the other hand (31). Multiple studies have proposed that immunotherapy in general and SLIT in particular induce a decrease in Th2 responses, together with the induction of allergen-specific CD4⁺ T cells producing IFN- γ , IL-10 and TGF- β (i.e. Th1/Treg switch) (3, 6, 8, 10-16). Noteworthy, most studies investigating the impact of SLIT on the polarization of peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes were open studies conducted in small cohorts of patients, and as such could not establish any firm link with clinical efficacy at an individual level (8-10, 32). Thus, with the aim to further strengthen the scientific rationale behind SLIT, the follow-up of allergen-specific CD4⁺ T cell responses remains necessary to determine whether they contribute to clinical benefit, and beyond, to identify potential surrogate markers of efficacy.

To this aim, we took advantage of a double blind placebo-controlled SLIT study conducted in 89 grass pollen allergic patients to assess changes induced by treatment in peripheral blood CD4⁺ T cells. Noteworthy, since multiple grass pollen challenges were performed in an allergen exposure chamber before and during SLIT, individual clinical responders were distinguished from non responders. As reported elsewhere, the 5-grass pollen tablet was highly efficacious in reducing symptoms as early as after 1 month of treatment, when compared to the placebo group, with a clinical benefit sustained during the 3 subsequent months of treatment (22). In such a setting, using biological samples coded to the operators, phenotype, proliferation, cytokine production and gene expression were measured in PBMCs from allergic patients, before, as well as after 2 and 4 months of immunotherapy.

Several biological changes observed during SLIT with active tablets were also detected in control groups, and thus are not considered relevant to explain clinical efficacy. For example, we observed a small decrease in Dac g 5-proliferative responses in the placebo group during treatment. Furthermore,

this trend was also seen with recall antigen stimulation. Similarly, the expression of some markers associated with Th1 (CCR5) or Th2 (CRTh2 and CCR4) cell polarization were decreased during SLIT, whereas other potential markers of regulatory T cells were rather up-regulated in both active and placebo groups. The expression of a number of genes encoding transcription factors or cytokines was impacted during treatment in PBMCs from patients receiving placebo tablets. These observations demonstrate the importance of having well-controlled experimental conditions, as well as standardized T cell assays to draw proper conclusions on comparative immunomonitoring data generated during longitudinal studies (19).

Some of our results are in agreement with previous studies. For example, we observed an induction of T cells with a potential Treg phenotype after SLIT, but in our study, similar changes were shown in the placebo group. Interestingly, a study in house dust mite allergic patients reported that Treg cells increased in both active and placebo groups after 6 months of SLIT (10), but this increase was sustained after a year only in the active group, raising the possibility that 4 months of treatment are too short to elicit significant changes in CD4⁺ T cell polarization detectable in peripheral blood. The latter does not preclude local alterations in T cell polarization, i.e. at mucosal surfaces, as was recently detected during SCIT (34) and SLIT protocols (12). Although an increase in the secretion of IL-10 or TGF- β , or both of these regulatory cytokines has been reported previously in PBMCs following sublingual immunotherapy (6, 8-16), we did not observe those alterations, in accordance with others studies (17, 18). We did not detect any significant induction of Th1 (i.e. CXCR3⁺ and IFN- γ ⁺ cells) in agreement with another study evaluating a 1 year birch pollen SLIT protocol (9).

Interestingly, some significant changes were induced in patients receiving the active tablet, but not the placebo. For example, we observed that IL-4 gene expression as well as IL-10 secretion were selectively decreased in the active group. Although such variations suggest a potential down-regulation of allergen-specific Th2 cells following SLIT, no correlation with clinical benefit at an individual patient level was noticed. One potential limitation of those analyses is that they were conducted in PBMCs populations in which allergen-specific CD4⁺ T cells are a minority. Furthermore there is growing evidence that Th2 cells are heterogeneous, suggesting the pertinence of focusing on

pathogenic subsets (26, 33). Thus, we further monitored allergen-specific cells using pMHCII-tetramers, and analyzed activated “Th2A” cells, i.e. a subset of CD45RO⁺ CD27⁻ terminally differentiated Th2 CD4⁺ T cells, recently shown to contain most allergen-specific Th2 cells (26). Our analyses showed a minor, albeit significant decrease in Th2A cells in patients receiving active tablets, however unrelated to clinical improvement. This observation was further corroborated using pMHCII-tetramers specific for Phl p 1- and Phl p 5-reactive-CD4⁺ T cells, with no variations observed in the frequency or polarization of pMHCII-tetramer positive cells, irrespective of the treatment group and the time point considered (Fig. 4A). Collectively, we conclude that a 4 month course of SLIT sufficient to provide clinical benefit does not result in a major depletion of the pool of circulating Th2 cells. Nonetheless, a potential beginning trend in the down-regulation of Th2A cells was detected after 4 months of SLIT, suggesting that a longer treatment period is needed to dampen established Th2 response, as previously shown for long-lived IgE-producing B cells which usually occurs only after one year or more of immunotherapy (4).

In conclusion, changes in the polarization of allergen-specific CD4⁺ T in peripheral blood cannot be used to document the early onset (i.e. within 4 months) of SLIT efficacy. Whether the induction of Th1/Treg cells and the down regulation of Th2 cells constitute markers associated with long term immunotherapy efficacy and/or sustained protection after treatment cessation remains to be investigated.

REFERENCES

1. Radulovic S, Wilson D, Calderon M, Durham S. Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy* 2011;**66**:740-752.
2. Wilson DR, Torres Lima M, Durham SR. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis*. *Allergy* 2005;**60**:4-12.
3. Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A, Lenti L, Canitano N, Lucarelli S, et al. Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatric Allergy and Immunology* 2003;**14**:216-221.
4. Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;**61**:151-165.
5. Scadding G, Durham SR. Mechanisms of Sublingual Immunotherapy. *Immunol Allergy Clin North Am* 2011;**31**:191-209.
6. Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, et al. Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon- γ - and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:261-272.
7. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**127**:18-27.
8. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, et al. IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;**33**:1205-1214.
9. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007;**120**:707-713.
10. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, Hales BJ, Biondo M, Douglass JA, et al. House Dust Mite Sublingual Immunotherapy: The Role for Transforming Growth Factor- β and Functional Regulatory T Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;**180**:936-947.
11. Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, et al. Immunological Effects of Sublingual Immunotherapy: Clinical Efficacy Is Associated with Modulation of Programmed Cell Death Ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol* 2010;**185**:7723-7730.
12. Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, et al. Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:598-606.
13. Fujimura T, Yonekura S, Horiguchi S, Taniguchi Y, Saito A, Yasueda H, et al. Increase of regulatory T cells and the ratio of specific IgE to total IgE are candidates for response monitoring or prognostic biomarkers in 2-year sublingual immunotherapy (SLIT) for Japanese cedar pollinosis. *Clin Immunol* 2011;**139**:65-74.
14. Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* 2006;**61**:1184-1190.
15. Ciprandi G, Cirillo I, Fenoglio D, Marseglia G, Tosca MA. Sublingual immunotherapy induces spirometric improvement associated with IL-10 production: Preliminary reports. *Int Immunopharmacol* 2006;**6**:1370-1373.
16. Fujimura T, Yonekura S, Taniguchi Y, Horiguchi S, Saito A, Yasueda H, et al. The Induced Regulatory T Cell Level, Defined as the Proportion of IL-10+ Foxp3+ Cells among CD25+ CD4+

Leukocytes, Is a Potential Therapeutic Biomarker for Sublingual Immunotherapy: A Preliminary Report. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;**153**:378-387.

17. Dehlink E, Eiwegger T, Gerstmayr M, Kampl E, Bohle B, Chen KW, et al. Absence of systemic immunologic changes during dose build-up phase and early maintenance period in effective specific sublingual immunotherapy in children. *Clin Exp Allergy* 2006;**36**:32-39.

18. Rolinck-Werninghaus C KM, Liebke C, Lange J, Wahn U, Niggemann B. Lack of detectable alterations in immune responses during sublingual immunotherapy in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. *Int Arch Allergy Immunol* 2005;**136**:134-141.

19. Keilholz U, Weber J, Finke JH, Gabrilovich DI, Kast WM, Disis ML, et al. Immunologic Monitoring of Cancer Vaccine Therapy: Results of a Workshop Sponsored by the Society for Biological Therapy. *J Immunother* 2002;**25**:97-138.

20. Vollers SS, Stern LJ. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology* 2008;**123**:305-313.

21. Guillaume P, Dojcinovic D, Luescher IF. Soluble MHC-peptide complexes: tools for the monitoring of T cell responses in clinical trials and basic research. *Cancer Immun* 2009;**9**:7-12.

22. Horak F, Ziegelmayer P, Ziegelmayer R, Lemell P, Devillier P, Montagut A, et al. Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**124**:471-477.e1.

23. Chabre H, Gouyon B, Huet A, Boran-Bodo V, Nony E, Hrabina M, et al. Molecular variability of group 1 and 5 grass pollen allergens between Pooideae species: implications for immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:505-519.

24. Moingeon P, Hrabina M, Bergmann KC, Jaeger S, Frati F, Bordas V, et al. Specific Immunotherapy for Common Grass Pollen Allergies: Pertinence of a Five Grass Pollen Vaccine. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;**146**:338-342.

25. Wambre E, Bonvalet M, Bodo VB, Maillère B, Leclert G, Moussu H, et al. Distinct characteristics of seasonal (Bet v 1) vs. perennial (Der p 1/Der p 2) allergen-specific CD4+ T cell responses. *Clin Exp Allergy* 2011;**41**:192-203.

26. Wambre E, DeLong JH, James EA, LaFond RE, Robinson D, Kwok WW. Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. In Press

27. Sone T, Tsukamoto K, Hirayama K, Nishimura Y, Takenouchi T, Aizawa M, et al. Two distinct class II molecules encoded by the genes within HLA-DR subregion of HLA-Dw2 and Dw12 can act as stimulating and restriction molecules. *J Immunol* 1985;**135**:1288-1298.

28. Kallinteris NL, Lu X, Blackwell CE, von Hofe E, Humphreys RE, Xu M. li-Key/MHC class II epitope hybrids: a strategy that enhances MHC class II epitope loading to create more potent peptide vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2006;**6**:1311-1321.

29. Kwok WW, Gebe JA, Liu A, Agar S, Ptacek N, Hammer J, et al. Rapid epitope identification from complex class-II-restricted T-cell antigens. *Trends Immunol* 2001;**22**:583-588.

30. Wambre E, Van Overtvelt L, Maillère B, Humphreys R, von Hofe E, Ferhat L, et al. Single Cell Assessment of Allergen-Specific T Cell Responses with MHC Class II Peptide Tetramers: Methodological Aspects. *Int Arch Allergy Immunol* 2008;**146**:99-112.

31. Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, Rothenberg ME. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. *J Allergy Clin Immunol* 2011;**127**:689-695.

32. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, et al. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol* 2008;**121**:1120-1125.e2.
33. Upadhyaya B, Yin Y, Hill BJ, Douek DC, Prussin C. Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. *J Immunol*. 2011;**187**:3111-3120.
34. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, et al. Grass Pollen Immunotherapy Induces Mucosal and Peripheral IL-10 Responses and Blocking IgG Activity. *J Immunol* 2004;**172**:3252-3259.

AKNOWLEDGEMENTS

We thank L. Van Overtvelt for her contribution in the processing of biological samples, E. Von Hofe for providing us with Ii-Key peptides as well as M. Pinheiro for excellent secretarial assistance.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1

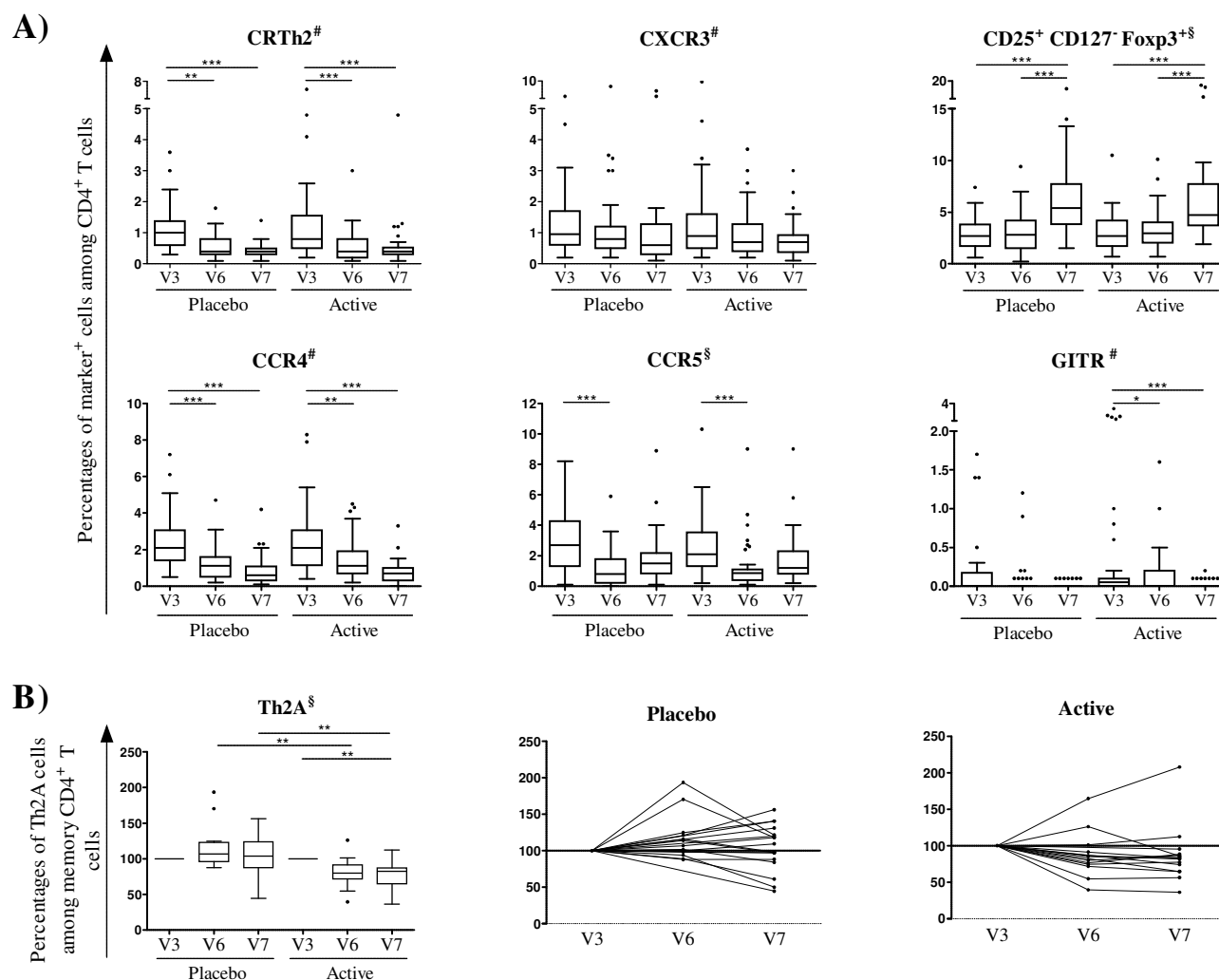


Figure 1: Surface phenotype of peripheral blood CD4⁺ T cells during grass pollen SLIT

Fresh PBMCs collected before (V3), after 2 (V6) and 4 months (V7) of SLIT in grass pollen allergic patients receiving active or placebo tablets were stained with antibodies directed against markers of T cell polarization. A) Percentages of CD3⁺ CD4⁺ T cells expressing each of the markers tested are represented using Tukey box plots. B) Frozen PBMCs were thawed and stained with a combination of 5 antibodies to assess potential activated Th2 cells (Th2A). Results are expressed as percentages of Th2A cells among memory (i.e. CD45RO⁺ CD4⁺) T cells at the cohort (left panel) and individual level (right panels). Percentages of Th2A cells were normalized to 100 for each patient at baseline (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, # one-way ANOVA test, § Kruskal-Wallis test).

Figure 2

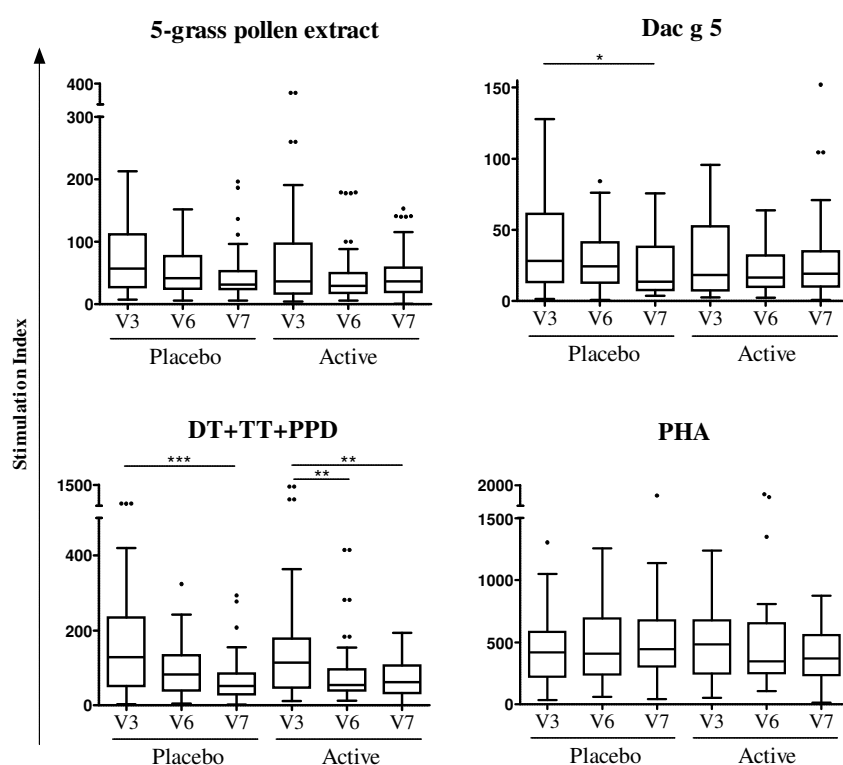


Figure 2: Proliferative responses of allergen-stimulated PBMCs during grass pollen SLIT

At each time point before (V3) and after 2 (V6) and 4 (V7) months of SLIT, PBMCs were stimulated for 6 days with either 1000 IR/mL 5-grass pollen extract, 10 µg/mL Dac g 5 or 10 µg/mL DT+TT+PPD recall antigens, or for 3 days with 1 µg/mL PHA as a positive control. Proliferation was assessed in quadruplicates using [³H]-Thymidine incorporation as described in Methods. Proliferative data are expressed as a stimulation index and represented using Tukey box plots (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal-Wallis test).

Figure 3

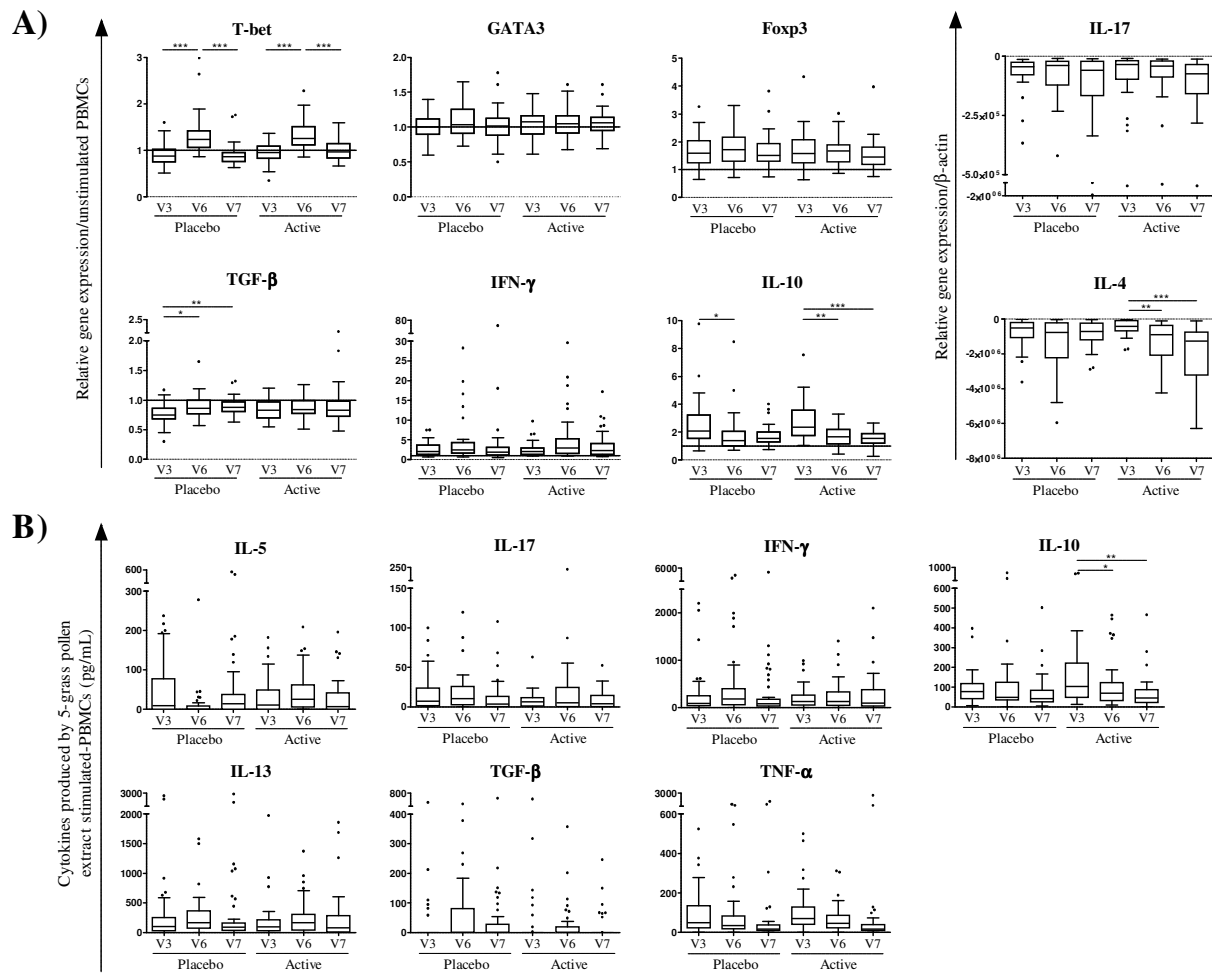


Figure 3: Transcription factor/cytokine gene expression and cytokine production during grass pollen SLIT

Thawed PBMCs were stimulated with 400 IR/mL 5-grass pollen extract for 1 or 5 days. Gene expression and cytokine production were assessed before (V3), after 2 (V6) and 4 months (V7) of SLIT. A) Transcription factor and cytokine gene expression were assessed by quantitative RT-PCR. T-bet, GATA3, Foxp3, IFN- γ , IL-4, IL-10 gene expression was analyzed following 1 day of stimulation, whereas TGF- β and IL-17 gene expression were quantified after 5 days of stimulation. For all genes, mRNA levels were normalized to levels of β -actin mRNA. For T-bet, GATA3, Foxp3, TGF- β , IFN- γ and IL-10, gene expression was expressed as relative amounts of mRNA in stimulated cells *versus* unstimulated cells. Fold-changes are represented using Tukey box plots (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal-Wallis test). B) IL-10 and TNF- α cytokine levels were measured by CBA in cell culture supernatants after 1 day of grass pollen extract stimulation, whereas amounts of secreted IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-17, TGF- β were measured after 5 days. Data are represented using Tukey box plots (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, one-way ANOVA).

Figure 4

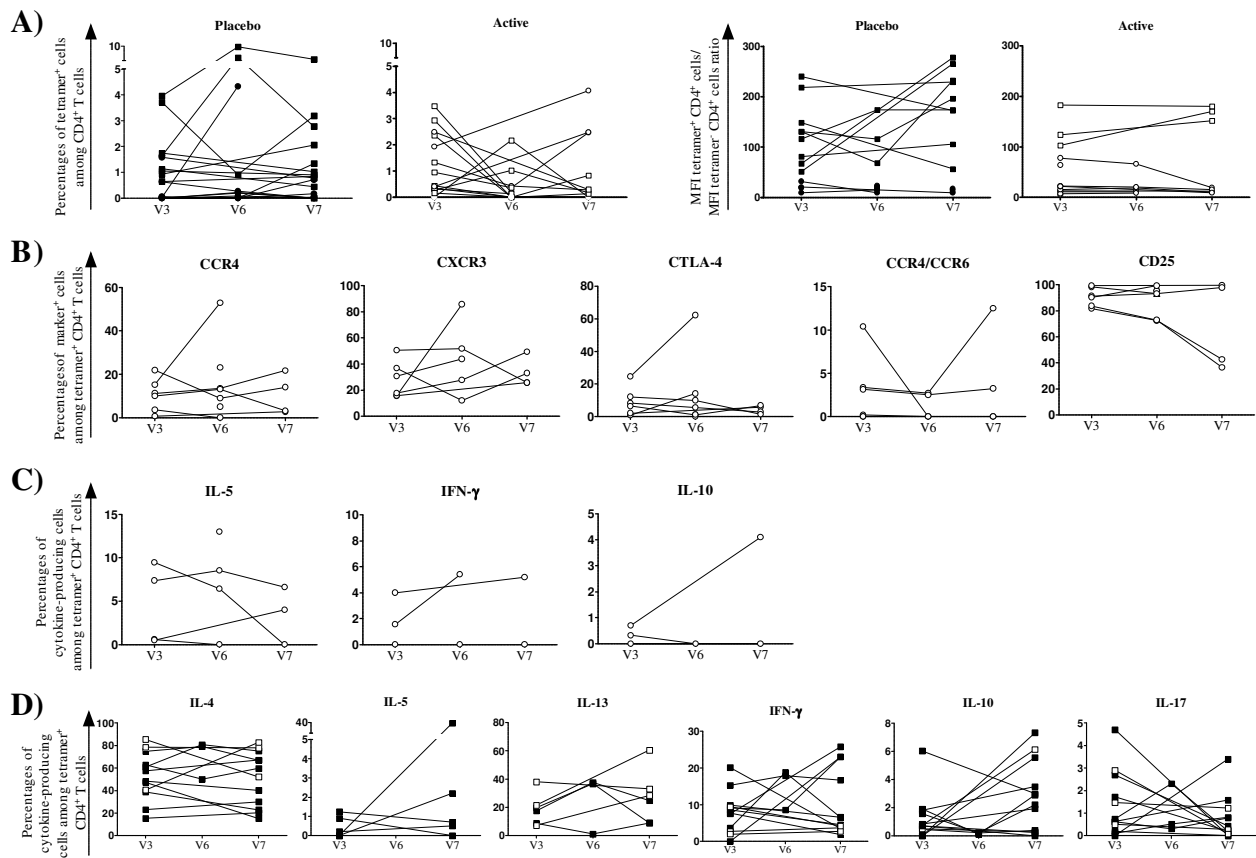


Figure 4: Detection and characterization of peripheral Phl p 1- and Phl p 5-specific CD4⁺ T cells using pMHCII-tetramers during SLIT

Before (V3), after 2 (V6) and 4 (V7) months of SLIT, thawed PBMCs from 32 patients with either a DR1, DR3, DR4 or DR15 HLA background were stimulated *in vitro* for 14-16 days with allergen-derived peptides as described in Methods, and subsequently stained with appropriate pMHCII-tetramers. Cells were further incubated with various antibodies to analyze surface phenotype, or stimulated as described in Methods for cytokine production assessment. A) pMHCII-tetramer⁺ CD4⁺ T cell frequency and avidity. The latter was expressed as a ratio between MFIs from tetramer⁺ and tetramer⁻ CD4⁺ T cells. B) Cytokine production by pMHCII-tetramer⁺ CD4⁺ T cells assessed by CSA following Phl p 1 peptides stimulation. C) Cytokine production by Phl p 5-specific pMHCII-tetramer⁺ CD4⁺ T cells measured by intracellular staining after PMA/Ionomycin stimulation D) ● Phl p 1-specific CD4⁺ T cells (DR1, DR3, DR4, placebo patients); ○ Phl p 1-specific CD4⁺ T cells (DR1, DR3, DR4, active patients); ■ Phl p 5-specific CD4⁺ T cells (DRB5, placebo patients); □ Phl p 5-specific CD4⁺ T cells (DRB5, active patient analyzed with 63 different tetramers).

Figure 5

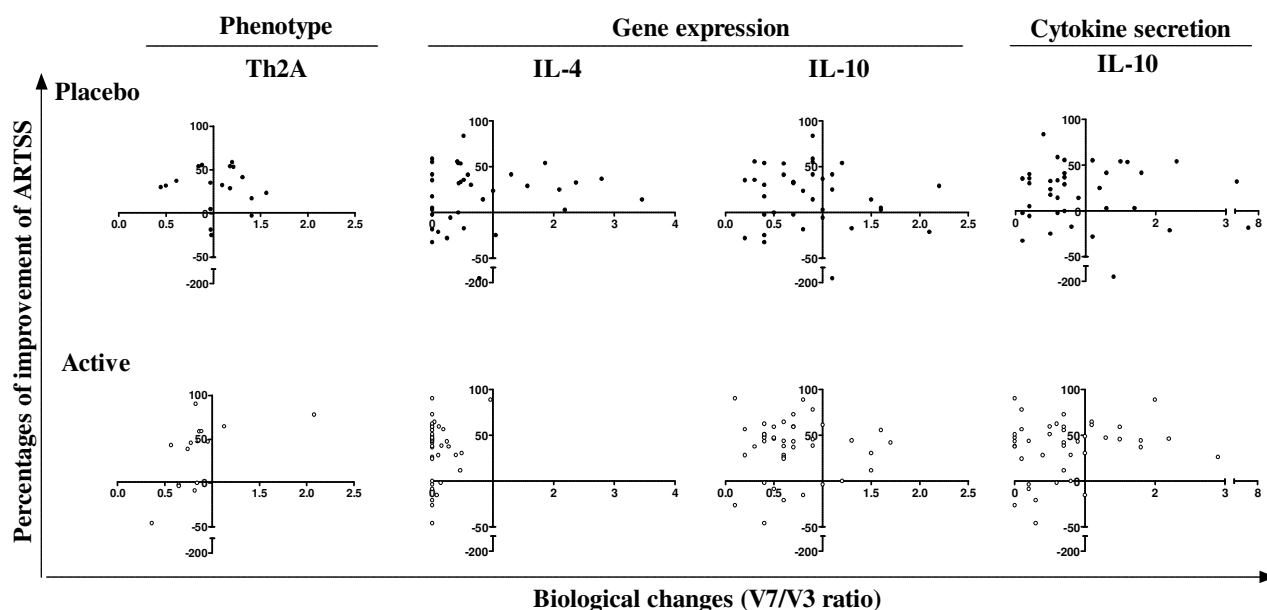


Figure 5: Correlation between clinical efficacy of grass pollen SLIT and changes in Th2 markers.

Changes in Th2A cell percentages, IL-4 and IL-10 gene expression or IL-10 secretion after grass pollen extract stimulation of PBMCs are plotted for each individual patient from the placebo (upper panels) or active (lower panels) groups, as a ratio between results obtained for each parameter at V7 *versus* V3. In ordinate, clinical responses are expressed for each individual patient as a percentage of improvement in the ARTSS score after 4 months of SLIT relative to baseline levels (i.e. before treatment).

4.3 Résultats I : Evaluation des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes suite à une année d'ITA chez des enfants souffrant de rhinite allergique aux acariens

4.3.1 Contexte

L'étude clinique VO57.07 a démontré l'efficacité d'un comprimé sublingual contenant des extraits d'acariens (*D. pteronyssinus* et *D. farinae*) chez l'adulte. Le but de la VO64.08, étude multicentrique de phase III menée en double aveugle avec un groupe contrôle placebo, était de tester l'efficacité clinique de ce traitement chez 423 enfants (5-17 ans) atteints de rhinite allergique aux acariens. Suite à une demande de l'EMA, une sous-étude a été mise en place pour mieux comprendre les mécanismes de l'ITA relatifs aux réponses lymphocytaires T CD4 périphériques (notamment l'induction de lymphocytes Treg). Le sang de 21 patients (11 placebos et 10 actifs) a été prélevé avant (V1) et après un an de traitement (V7). La production de cytokines par les PBMCs et par les lymphocytes T CD4 a respectivement été suivie au niveau extra- et intracellulaire, avant et après traitement. Le phénotype des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1 et Der p 2 des patients présentant un haplotype compatible à l'analyse à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH dont nous disposons (HLA-DRB1*0101 et *1501) a été suivi au cours de l'étude.

4.3.2 Résultats

4.3.2.1 Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la sécrétion de cytokines par les PBMCs après stimulation allergénique *in vitro*

Afin d'évaluer la réponse spécifique des PBMCs aux allergènes, les cellules, prélevées avant (V1) et après un an de traitement (V7), ont été stimulées *in vitro* avec du Der p 1 recombinant (rDer p 1), du Der p 2 recombinant (rDer p 2), un antigène de rappel vaccinal (PPD) ou du milieu seul comme contrôle. Les quantités de cytokines sécrétées ont été mesurées dans les surnageants après 1 (IL-6, IL-10, TNF- α) ou 6 jours (d'IL-5, d'IL-13, d'IFN- γ) de culture. D'une manière générale, rDer p 2 induit une plus forte sécrétion cytokinique que rDer p 1, excepté pour le TNF- α qui était indétectable quelles que soient les conditions de stimulation allergénique (données non montrées). Alors que les concentrations d'IL-6 dépassaient le seuil de saturation suite à une stimulation avec du rDer p 2, elles étaient inférieures au seuil de détection avec rDer p 1, indépendamment du groupe (actif ou placebo) et du temps (V1 ou

V7). En réponse à rDer p 1, de très faibles concentrations d'IL-10 et d'IFN- γ sont observées. Aucune variation significative n'a été détectée quant à la sécrétion d'IL-5, d'IL-10, d'IL-13 et d'IFN- γ au cours du traitement entre les deux groupes, mais des tendances sont observées. Alors que la production d'IL-5 et d'IL-13 en réponse à rDer p 2 semble diminuer sans distinction entre les groupes actif et placebo après un an de traitement, celle d'IFN- γ tend à être augmentée uniquement chez les actifs (Fig. 8).

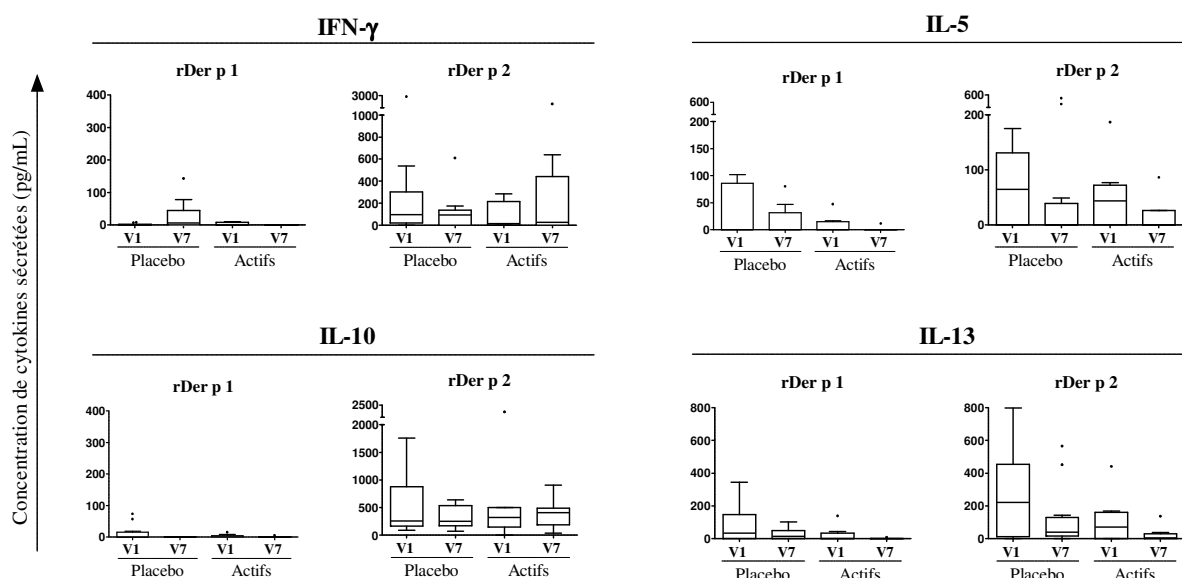


Figure 8 : Effet de l'ITA sublinguale aux acariens sur la sécrétion de cytokines par les PBMCs après stimulation allergénique *in vitro*. Les PBMCs de 21 patients (11 placebos et 10 actifs) ont été isolées avant (V1) puis après traitement (V7), ensemencées à 2.10^6 cellules/mL, et stimulées avec du milieu, du rDer p 1 (50 μ g/mL), du rDer p 2 (50 μ g/mL) ou un antigène de rappel vaccinal (PPD, 10 μ g/mL). L'IL-10 a été dosée par CBA à J1 et l'IFN- γ , l'IL-5 et l'IL-13 à J6. Les boîtes à moustaches de Tukey représentent les concentrations de cytokines produites par les PBMCs stimulées, auxquelles sont soustraites les concentrations obtenues avec les cellules non stimulées. Le test de Wilcoxon est utilisé pour l'analyse statistique (* $p < 0,05$).

4.3.2.2 Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la production cytokinique intracellulaire des lymphocytes T CD4 après stimulation *in vitro*

Après avoir suivi la réponse globale des PBMCs aux allergènes, nous nous sommes intéressés aux réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes. La production d'IL-10, d'IL-13, d'IL-17A, d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T CD4 totaux a été évaluée au niveau intracellulaire après 14 jours de culture avec les mêmes agents stimulants que pour la détection de cytokines extracellulaires (milieu, rDer p 1, rDer p 2 et PPD). Avant l'analyse

par cytométrie de flux, les cellules ont été restimulées pendant 4 heures avec de l'anti-CD3. Les productions d'IL-10 et d'IL-13 fluctuent peu dans les groupes actif et placebo avant et après l'ITA quelle que soit la stimulation (rDer p 1 ou rDer p 2). La production d'IL-17A et de TNF- α par les lymphocytes T CD4 tend à être augmentée après stimulation avec rDer p 2 dans les deux groupes suite au traitement. Toutefois, cette variation est significative uniquement dans le groupe placebo (Placebo : $p < 0,05$; Actifs : $p = 0,0625$ (IL-17A) ; $p = 0,0754$ (TNF- α)). En revanche, la production d'IFN- γ est significativement augmentée à la V7, seulement dans le groupe actif (médiane $\pm$ écartype, V1 : $0,1 \pm 3,2$; V7 : $6,4 \pm 6,4$), rejoignant les observations faites lors des analyses de cytokines dans les surnageants (Fig. 9). Cette augmentation est donc reliée au traitement. Cependant, le pourcentage de lymphocytes T CD4 sécrétant de l'IFN- γ ne corrèle pas avec l'amélioration individuelle des symptômes (données non montrées).

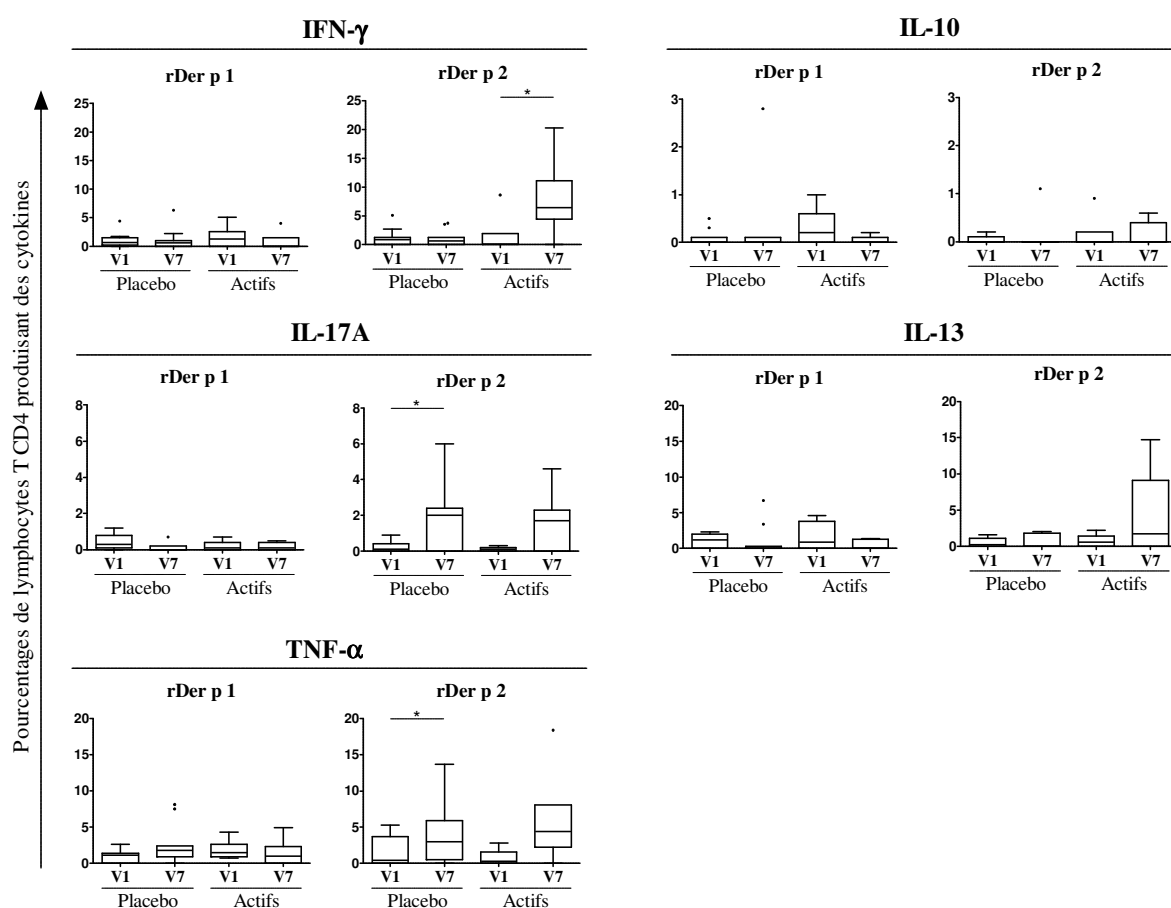


Figure 9 : Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la production cytokinique intracellulaire des lymphocytes T CD4. Les PBMCs de 18 patients (11 placebos et 7 actifs) ont été isolées avant (V1) puis après traitement (V7), ensemencées à $5 \cdot 10^6$ cellules/mL, et stimulées avec du milieu (contrôle), du rDer p 1 (50 μ g/mL) ou du rDer p 2 (50 μ g/mL). De

l'IL-2 (20 UI/mL) est ajoutée à J5, J8 et J11. A J14, les cellules sont restimulées pendant 4h avec de l'anti-CD3 (1 µg/mL), puis les productions d'IFN-γ, d'IL-10, d'IL-13, d'IL-17A et de TNF-α sont évaluées par marquage intracellulaire. Les boîtes à moustaches de Tukey représentent le pourcentage de lymphocytes T CD4 produisant des cytokines après stimulation *in vitro* auquel est soustrait le pourcentage de lymphocytes T CD4 non stimulés (milieu) produisant des cytokines. Le test de Wilcoxon est utilisé pour l'analyse statistique. (* p<0,05).

4.3.2.3 Effets de l'ITA sur sublinguale aux acariens sur les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1

Alors que nous disposions de tétramères de molécules de classe II du CMH spécifiques de Der p 1 et de Der p 2 compatibles avec les haplotypes HLA-DRB1*0101 (Der p 1₁₆₋₃₀ et Der p 2₂₆₋₄₀) et *1501 (Der p 1₁₆₋₃₀, Der p 1₁₇₁₋₁₈₅ et Der p 2₂₆₋₄₀), seuls 3 patients (1 placebo, 2 actifs) se sont avérés présenter un typage HLA-DRB1*1501. L'analyse de leurs lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes a été réalisée suite à une amplification *in vitro* avec les peptides Der p 1₁₆₋₃₀, Der p 1₁₇₁₋₁₈₅ et Der p 2₂₆₋₄₀. Nous avons détecté des cellules tétramères⁺ spécifiques de Der p 1₁₇₁₋₁₈₅ chez les 3 patients, aux 2 temps testés. Alors que le pourcentage de ces cellules parmi les lymphocytes T CD4 est stable au cours de l'ITA chez le patient du groupe placebo, il est augmenté chez les deux patients actifs après le traitement (Fig. 10A). Nous avons également analysé l'expression des marqueurs CCR4, CXCR3 et CTLA-4 par les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1₁₇₁₋₁₈₅, afin d'étudier respectivement la polarisation Th2, Th1 et Treg de ces cellules. L'expression des molécules CD25, CCR7 et CD62L a été évaluée pour déterminer l'état d'activation et le type de « mémoire centrale » ou « effectrice » de ces lymphocytes. Alors qu'aucune tendance de variation quant à l'expression de CCR4, CXCR3 et CD25 n'a été observée entre les 2 patients actifs et le patient placebo au cours du traitement, l'expression de CTLA-4 est diminuée chez tous les patients après un an de traitement. L'expression de CCR7 semble diminuer après un an d'ITA chez les 2 patients actifs. Cependant cette variation n'est pas corrélée à l'expression de CD62L (Fig. 10B).

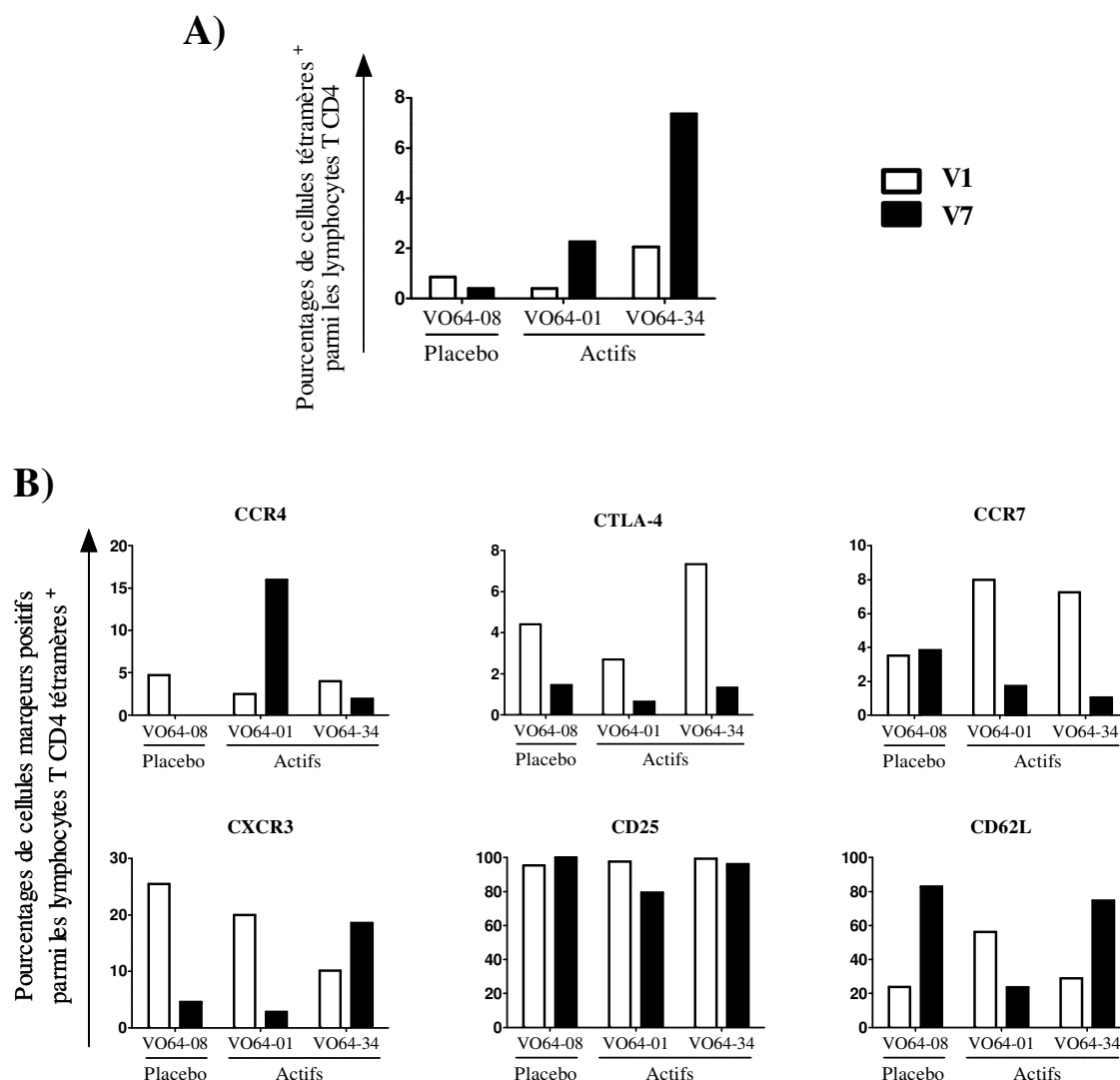


Figure 10 : Effets de l'ITA sublinguale aux acariens sur la fréquence et le phénotype des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1. Les PBMCs issues de 3 patients présentant un type HLA-DRB1*1501 ont été isolées, ensemencées à $5 \cdot 10^6$ cellules/mL, puis stimulées avec le peptide Der p 1₁₇₁₋₁₈₅ (10 µg/mL). De l'IL-2 (20 UI/mL) est ajoutée à J5, J8 et J11. A J14, les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1₁₇₁₋₁₈₅ sont marqués pendant 1h à température ambiante avec les tétramères de molécules de classe II du CMH correspondants, puis pendant 20 minutes à 4°C avec des anticorps spécifiques de CCR4, CXCR3, CTLA-4, CD25, CCR7 et CD62L. A) Les pourcentages de cellules tétramères⁺ sont exprimés par rapport aux lymphocytes T CD4 totaux. B) représente le pourcentage de cellules tétramères⁺ exprimant les marqueurs CCR4, CXCR3, CTLA-4, CD25, CCR7 ou CD62L.

4.3.3 Synthèse des résultats

Cette étude de phase III menée chez des enfants allergiques aux acariens, nous a permis de suivre les modifications des réponses cellulaires périphériques spécifiques d'allergènes pour 21 patients.

Alors qu'aucune variation significative n'a été observée au niveau de la réponse des PBMCs à une stimulation *in vitro* avec rDer p 1 et rDer p 2 après un an d'ITA sublinguale aux acariens, le suivi des lymphocytes T CD4 totaux révèle une augmentation significative de la production d'IFN- γ dans le groupe actif suite à stimulation avec rDer p 2. Bien que cette modification soit induite par le traitement, elle s'avère ne pas corrélér avec l'efficacité clinique de l'ITA. L'étude des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec les tétramères de molécules de classe II du CMH, du fait du faible nombre de patients analysés, ne nous permet pas de conclure quant aux modifications de fréquence et de fonctionnalité de ces cellules. Toutefois, la détection de lymphocytes T CD4 marqués avec tétramères de molécules de classe II du CMH indique que l'ITA sublinguale n'induit pas de délétion clonale de ces cellules.

Les résultats de cette étude seront plus amplement discutés dans la partie « Discussion »

4.4 Article III : Comparaison entre les marquages à l'aide de tétramères de molécules de classe II du CMH et l'analyse de l'expression de marqueurs membranaires d'activation pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes

Le rôle majeur des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes dans les réponses d'hypersensibilité de type I soulève l'intérêt de suivre ces cellules au niveau unicellulaire pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'inflammation allergique ainsi que les réponses protectrices observées chez les individus sains. Cela est également nécessaire pour mettre en évidence les mécanismes d'action de l'ITA et les paramètres immunologiques corrélant avec son efficacité clinique, pouvant ainsi servir de biomarqueur. Bien que des techniques comme l'évaluation de la prolifération, le marquage de cytokines intracellulaires, le CSA ou l'ELISpot soient disponibles pour suivre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes, les tétramères de molécules de classe II du CMH restent actuellement le moyen le plus spécifique de les détecter. Toutefois, leur utilisation est limitée par l'identification des épitopes immuno-dominants et la restriction HLA. Afin de s'affranchir de ces contraintes, nous avons recherché la combinaison optimale de marqueurs d'activation membranaires (CD25, CD30, CD39, CD69, CD154, GITR, HLA-DR and ICOS) dont nous pouvions suivre l'expression et pouvant remplacer au mieux les tétramères de molécules de classe II du CMH pour la détection des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes après amplification *in vitro*. Notre démarche a consisté à corréler l'expression de ces marqueurs à un marquage « tétramères de classe II ». Alors qu'il a été décrit que CD154 permettait d'identifier les lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes après courte stimulation *ex vivo*, après amplification spécifique *in vitro*, le pourcentage de lymphocytes T CD4 marqués par les tétramères de molécules de classe II du CMH parmi les lymphocytes T CD4 CD154⁺ se situait entre 5% et 87%, selon les individus. Cette variabilité inter-patient est observée quel que soit le marqueur considéré. Des lymphocytes T CD4 réagissant exclusivement avec les tétramères de molécules de classe II du CMH (0.4-10.4% des lymphocytes T CD4) ou exprimant uniquement le marqueur d'activation considéré (2.2-32.7% des lymphocytes T CD4) sont détectés. Cela révèle la présence de lymphocytes T CD4 spécifiques anergiques ou activés non spécifiquement, respectivement. Nous avons ensuite caractérisé fonctionnellement les 3 sous-populations de lymphocytes T CD4 tétramère⁺/marqueur⁺, tétramère⁺/marqueur⁻ et tétramère⁻/marqueur⁺ mises en évidence. Les cellules tétramère⁺/marqueur⁺ s'avèrent exprimer les plus forts taux de cytokines au niveau transcriptionnel en réponse à l'allergène. Toutefois, au niveau traductionnel, elles secrètent des quantités de cytokines équivalentes à

celles des lymphocytes T CD4 tétramère⁻/marqueur⁺. Les lymphocytes T CD4 tétramère⁺/marqueur⁻, quant à eux, produisent les plus faibles taux de cytokines.

Dans nos conditions d'analyses, il n'existe pas de corrélation entre le marquage « tétramère de classe II » et l'expression des marqueurs d'activation que nous avons testés. Toutefois, ces co-marquages nous ont permis de discriminer 3 sous-populations : les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes activés (tétramère⁺/marqueur⁺), les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes anergiques (tétramère⁺/marqueur⁻) et les lymphocytes T CD4 activés non spécifiquement (tétramère⁻/marqueur⁺). Combiner le marquage « tétramère de classe II » et la détection de marqueurs d'activation membranaires peut servir à mieux comprendre l'hétérogénéité inter-patient relative aux réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes.

ORIGINAL ARTICLE Clinical Mechanisms in Allergic Disease

Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4⁺ T cells

M. Bonvalet¹, E. Wambre^{1,2}, H. Moussu¹, S. Horiot¹, W. W. Kwok², A. Louise³, D. Ebo⁴, C. Hoarau⁵, L. Van Overtvelt¹, V. Baron-Bodo¹ and P. Moingeon¹

¹Stallergenes SA, Antony, France, ²Benaroya Research Institute, Seattle, WA, USA, ³Plateforme de cytométrie de flux, Institut Pasteur, Paris, France, ⁴Department of Immunology, Allergy and Rheumatology, Antwerp University, Antwerp, Belgium and ⁵Unité transversale d'allergologie et Immunologie clinique, CHRU Tours, France

Clinical & Experimental Allergy

Summary

Background Major histocompatibility complex (MHC) class II tetramers (tetramers) allow to detect allergen-specific CD4⁺ T cells at a single-cell level. Limits to this technology include HLA restriction and the need to identify immunodominant T cell epitopes.

Objective Assessing the expression of various activation markers following allergen stimulation to replace tetramer staining.

Methods Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 25 birch pollen, grass pollen or house dust mite allergic individuals were stimulated with peptide mixes encompassing immunodominant epitopes from corresponding major allergens. After 2 weeks of *in vitro* amplification, cells were stained with both the appropriate tetramer and antibodies directed to CD25, CD30, CD39, CD69, CD137, CD154, GITR, HLA-DR and ICOS, before FACS analysis.

Results Following allergen stimulation, percentages of tetramer⁺ cells among CD4⁺ CD154⁺ cells range from 5% to 87%, depending upon donors. As for CD154, a large inter-individual variability is observed in terms of surface expression for all activation markers tested in allergen-stimulated PBMCs. T cells reactive with either tetramers (0.4–10.4% CD4⁺ T cells) or anti-marker antibodies (2.2–32.7% CD4⁺ T cells), but not both, are observed, reflecting the presence of anergic as well as non-specifically activated cells. Tetramer⁺/marker⁺, tetramer⁺/marker[−] and tetramer[−]/marker⁺ cells were compared for their capacity to express cytokines, demonstrating that only the former represent *bona fide* allergen-specific activated CD4⁺ T cells, based upon a higher expression of cytokines or corresponding genes in presence of the allergen.

Conclusion and Clinical Relevance No strict correlation exists between tetramer staining and the expression of multiple activation markers in stimulated CD4⁺ T cells. Dual staining allows to discriminate functional tetramer⁺/marker⁺ vs. anergic (tetramer⁺/marker[−]) allergen-specific T cells or non-specifically activated (tetramer[−]/marker⁺) T cells. Combining tetramer staining with the detection of activation markers helps understanding patient heterogeneity regarding specific CD4⁺ T cell responses. This approach has immediate relevance for monitoring immune changes induced during specific immunotherapy.

Keywords activation markers, CD154, MHC class II tetramers

Submitted 2 November 2010; revised 23 December 2010; accepted 11 January 2011

Correspondence:

Philippe Moingeon, Research and Development, Stallergenes SA, 6 rue Alexis de Tocqueville, 92183 Antony Cedex, France; E-mail: pmoingeon@stallergenes.fr

Cite this as: M. Bonvalet, E. Wambre, H. Moussu, S. Horiot, W. W. Kwok, A. Louise, D. Ebo, C. Hoarau, L. Van Overtvelt, V. Baron-Bodo and P. Moingeon, *Clinical & Experimental Allergy* 2011 41: 821–829.

Introduction

Monitoring allergen-specific CD4⁺ T cells at a single-cell level allows a better understanding of the physiopathology of allergic immune inflammation, as well as the nature of protective responses observed in healthy individuals [1–3].

It is also needed in the course of immunotherapy studies, with the aim to establish immunological correlates of clinical efficacy. Various functional assays conducted following allergen stimulation are available to analyse specific CD4⁺ T cells, such as proliferation assessment, intracellular cytokine staining, cytokine secretion assay (CSA) and

ELISPOT [4, 5]. However, immunodetection using major histocompatibility complex (MHC) class II/peptide tetramers (tetramers) is currently considered as the most specific approach in order to identify allergen-reactive CD4⁺ T cells [6–8]. As of today, several tetramers have been successfully developed to detect T cells directed against allergens such as Art v 1, Bet v 1, Bos d 2, Der p 1, Der p 2, Fel d 1, Lol p 1 and Ves v 5 [3, 9–14]. Nonetheless, tetramer-based detection remains a cumbersome technique which can only be applied to the follow-up of responses against selected T cell epitopes in individuals bearing appropriate HLA haplotypes.

Thus, the purpose of our study was to find an alternative method for detecting allergen-specific CD4⁺ T cells within peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after specific *in vitro* amplification. CD154 (CD40L) was recently described as an activation marker selectively expressed by specific CD4⁺ T cells after antigen stimulation [15–17]. Herein, we assessed whether surface detection of CD154 as well as other various activation markers, could be used as a substitute to tetramer staining. These markers include CD25 (IL-2RA receptor) [18], CD30, CD137 and GITR (members of the TNF-receptor superfamily) [19–22], CD154 (a member of the TNF-ligand superfamily) [15–17], CD39 (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase) [23], CD69 (a member of the calcium-dependent lectin superfamily) [18], as well as ICOS [24] and HLA-DR [18].

In this study conducted in PBMCs obtained from both healthy donors and patients suffering from allergic rhinitis to birch pollen (BP), grass pollen (GP) or house dust mite (HDM), we report a partial correlation between tetramer staining of CD4⁺ T cells and their expression of activation markers following allergen stimulation, thus pointing out to the presence of fully reactive as well as anergic cells among allergen-specific CD4⁺ T lymphocytes, together with non-specifically activated T cells.

Materials and methods

Patients and HLA-DR typing

Citrated peripheral blood was obtained after informed consent from BP-, GP- or HDM-allergic individuals recruited at Antwerp University Hospital (Belgium) and CHRU Tours (France). The study protocol was approved by an ethical committee (CPP idf7). Allergic individuals suffering from rhinitis, but without asthma or atopic dermatitis, were selected based on clinical symptoms, positive skin prick test, specific IgE levels as well as a positive *in vitro* basophil activation test performed in the presence of either BP, GP or HDM extracts (Stallergenes, Antony, France). Genomic DNA was extracted from blood using an Easy-DNA Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). HLA-DR typing was performed by PCR HISTO TYPE DR mini kits (Bag, Lich, Germany) and further with either Allset⁺ Gold SSP HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*04 or HLA-DRB1*15/16 High Res Kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) [25].

In vitro expansion of allergen-specific CD4⁺ T cell

PBMCs were isolated from peripheral blood by centrifugation over Ficoll-Paque plus (Abcys, Paris, France). For *in vitro* expansion, freshly isolated PBMCs from HLA-DRB1*15:01 and HLA-DRB1*01:01 individuals allergic to BP or HDM and from HLA-DRB1*04:01 individuals allergic to GP were seeded in 12-well plates in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% heat-inactivated AB serum (PAA, Les Mureaux, France), 20 µg/mL gentamicin, 100 U/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin, 50 µM 2-mercaptoethanol and 1% non-essential amino acids (all from Invitrogen) at 37 °C, 5% CO₂. Cells were then stimulated for 14–16 days with either Bet v 1_{141–155}, Der p 1_{16–30}, Der p 1_{171–185} or Phl p 1_{194–208} peptides in the form of li-key conjugate peptide mixes (used at 10–20 µg/mL) as described elsewhere [3, 26, 27]. These conjugate peptide mixes comprise complete or truncated versions of Bet v 1_{141–155}, Der p 1_{16–30}, Der p 1_{171–185} or Phl p 1_{194–208} peptides conjugated with a polymethylene linker to the li-Key moiety of the MHC class II-associated invariant chain, thereby facilitating peptide exchange and binding [27, 28]. At day 5, and every 3 days thereafter, 20 UI/mL recombinant IL-2 (Roche, Meylan, France) was added to cell cultures. A resting period of three days was always respected between the last IL-2 addition and cytometry analysis.

Major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface detection of activation markers

After epitope-specific CD4⁺ T cell amplification for 14–16 days, cells were stained with 1 µg/mL tetramers specific for either Bet v 1_{141–155}, Der p 1_{16–30} and Der p 1_{171–185} or Phl p 1_{194–208} in the context of HLA-DRB1*01:01, *04:01 and *15:01 molecules for 1 h at room temperature, and subsequently stained with antibodies directed against activation markers, for 20 min at 4 °C. Tetramers used in this study were made by Beckman Coulter (Villepinte, France) for Bet v 1_{141–155}, Der p 1_{16–30}, Der p 1_{171–185} [29] and by the Benaroya Research Institute for Phl p 1_{194–208} [30]. Empty or CLIP peptide tetramers were used as controls. All tetramers we used were coupled to phycoerythrin. Surface markers were detected using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled anti-CD30, allophycocyanin (APC)-labelled anti-CD39, FITC-labelled anti-CD69, FITC- or APC-labelled anti-CD154 (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), FITC- or APC-labelled anti-CD25 (Beckman Coulter), FITC- or Alexa Fluor 647-labelled anti-ICOS (Biolegend, Saint Quentin Yvelines, France), APC-labelled anti-GITR (R&D Systems, Lille, France), FITC-labelled anti-CD137 and PC7-labelled anti-HLA-DR (eBiosciences, San Diego, CA, USA) antibodies. Cells were simultaneously stained with an APC- or PC7-labelled anti-CD4, ECD-labelled anti-CD14 and -CD19 antibodies (all from Beckman Coulter) and subsequently with Via-Probe (BD Biosciences) for 10 min at 4 °C to exclude

monocytes, B cells and dead cells, respectively [26]. The expression of all activation markers was assessed without allergen restimulation, except for CD137 and CD154 for which cells were restimulated with the initial Ii-key conjugate peptide mix at 37 °C for 24 and 5 h, respectively [16, 17, 21, 31]. For CD154 staining, allergen restimulation was performed in the presence of an anti-CD40-specific antibody (Beckman Coulter) at 1 µg/mL to stabilize its expression [15, 16]. When assessing ICOS expression among CD4⁺ T cells, only ICOS^{high} cells were considered as activated cells. Cells were analysed using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter), with at least 30 000 events acquired.

Functional characterization of CD4⁺ T cells subsets

Cytokine production by either tetramer⁺/marker⁺, tetramer⁺/marker⁻ or tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells was assessed at a single-cell level by flow cytometry using CSA or quantitative RT-PCR on sorted cells (99% purity) using a MoFlo apparatus (Dako, Glostrup, Denmark), as

described elsewhere [3, 26]. Briefly, for CSA, before stimulation for 4–5 h at 37 °C with appropriate Ii-key conjugate peptide mixes, cells were stained with 1 µg/mL corresponding tetramers for 1 h at room temperature. Cells were then harvested, washed with cold phosphate-buffered saline containing 0.5% BSA plus 5 mM EDTA (washing buffer) and stained with 50 µg/mL anti-IL-5/CD45 or anti-IL-10/CD45 Ab-Ab conjugates (Miltenyi Biotec, Bergish, Germany) for 10 min at 4 °C. Cytokine secretion was allowed by incubating cells in medium at 37 °C for 45 min. After washing and resuspension in washing buffer, cells were stained with either APC-labelled anti-IL-5 or IL-10 and either FITC-labelled anti-CD25, -CD30, -CD154 or -ICOS and PC7-labelled anti-CD4, ECD-labelled anti-CD14 and anti-CD19 for 25 min on ice. Cells were washed and incubated with Via-Probe for 5 min on ice before FACS analysis of at least 50 000 events.

For quantitative RT-PCR analysis, cultured cells were stained with tetramer for 1 h at room temperature, stimulated with Ii-key conjugate peptide mixes for 1 h at 37 °C

Table 1. Detection of MHC class II-peptide tetramer⁺ CD4⁺ T cells in allergic and non-allergic individuals

Status of donors	Donor identification	HLA-DRB1	Percentages of tetramer ⁺ cells among CD4 ⁺ T cells				Month of blood collection
			Control	Bet v 1	Der p 1	Phl p 1	
BP allergic	BP3	01:01	0.1	4.5	ND	ND	June
	BP6	15:01	0.1	1.2	ND	ND	June
	BP8	15:01	0	1.4	ND	ND	September
	BP9	15:01	0.1	10	ND	ND	May
	BP10	15:01	0.1	39	ND	ND	April
HDM allergic	HDM15	15:01	0	ND	0.7*	ND	June
	HDM17	15:01	0	ND	0.6*	ND	November
	HDM19	15:01	0.1	2.6	ND	ND	June
BP and GP allergic	BG1	15:01	0	1.8	ND	ND	February
	BG2	01:01	0	2.1	ND	ND	February
	BG3	15:01	0	3.4	ND	ND	December
GP and HDM allergic	GH1	04:01	0.1	ND	ND	7.3	December
	GH2	04:01	0.2	ND	ND	4.4	February
BP, GP and HDM allergic	BGH1	15:01	0	6.3	ND	ND	November
	BGH2	15:01	0	4	ND	ND	June
	BGH3	15:01	0	55.5	ND	ND	February
	BGH4	15:01	0	0.5	ND	ND	March
	BGH5	15:01	0	2.5	ND	ND	March
	BGH6	15:01	0	0.2	ND	ND	March
	BGH7	15:01	0	7.1	ND	ND	April
	BGH8	15:01	0	0.4	ND	ND	September
	HB11	15:01	0	12	6.9*	ND	January
	HB12	15:01	0.1	15.1	ND	ND	July
	NA7	01:01	0	ND	0.5†	ND	October
	NA8	15:01	0	ND	1.2*	ND	December

BP, birch pollen; GP, grass pollen; HDM, house dust mite; ND, not done.

PBMCs were stimulated *in vitro* with Ii-key conjugate peptides before tetramer staining as described in 'Materials and methods'. Percentages of Bet v 1_{141–155}, Der p 1_{16–30}, Der p 1_{171–185} or Phl p 1_{194–208}-specific CD4⁺ T cells detected with corresponding MHC class II peptide tetramers in allergic and non-allergic individuals are indicated. The control tetramer is always made with the CLIP epitope, except for DRB1*04:01 patients for which an empty tetramer is used. Tetramers used were directed to:

*Epitope Der p 1_{171–185} for DRB1*15:01 patients;

†Epitope Der p 1_{16–30} for DRB1*01:01 patients.

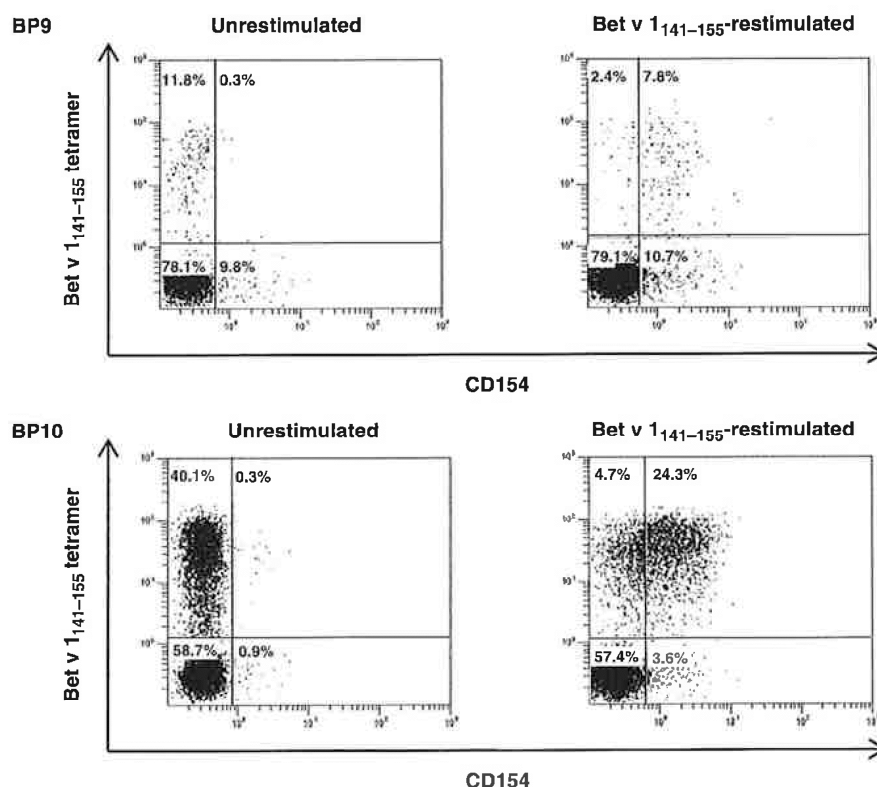


Fig. 1. Correlation between major histocompatibility complex (MHC) class II tetramer staining and CD154 surface expression. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from two representative HLA-DRB1*15:01 birch pollen allergic individuals out of eight tested were stimulated for 14–16 days with Bet v 1₄₁–155 li-key conjugate peptide mixes (10 µg/mL). Before extracellular CD154 staining, cells were first stained with the appropriate tetramer and stimulated for 5 h with Bet v 1₄₁–155 conjugated with li-key conjugate peptide mixes in the presence of CD40-specific blocking antibody. CLIP tetramer was used as a negative control and always stained <0.1% CD4⁺ T cells.

and stained with anti-marker antibodies, before cell sorting. RNA from sorted cell populations was harvested in RNeasy lysis buffer (Qiagen, Crawley, UK). Total RNA was extracted from each cell population with an RNeasy kit (Qiagen) and reverse transcribed as cDNAs using the TaqMan Reverse Transcription Reagent kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Messenger RNAs corresponding to IL-10, IL-13, IL-17A and IFN-γ were assessed by quantitative PCR using pre-designed Taqman Gene Expression reagents (Applied Biosystems) on a 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) [3]. Data were expressed as relative amounts of cytokine mRNA in sorted tetramer⁺/marker⁺ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells in comparison with sorted tetramer⁻/marker⁻ CD4⁺ T cells from the same individual. Data were normalized based on relative amounts of β-actin mRNA.

Statistical analysis

Data were analysed for statistical significance using a Kruskal–Wallis test. A *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Correlation between tetramer staining and surface expression of activation markers

Tetramer staining of allergen-specific CD4⁺ T cells was successfully carried out after 14–16 days of amplification in various healthy individuals as well as patients allergic to either BP, GP or HDM (Table 1). Such tetramer⁺ cells were subsequently co-stained as described in 'Materials and methods' with antibodies directed to various activation markers (i.e. CD25, CD30, CD39, CD69, CD137, CD154, GITR, HLA-DR, ICOS) before FACS analysis.

In a first set of experiments, we focused on CD154, described by others as a reliable marker allowing to detect antigen-specific CD4⁺ T cells after antigen stimulation [15–17]. Out of eight individuals tested, we found a significant correlation between tetramer and CD154 staining in PBMCs from only one individual, with tetramer⁺ cells representing 87% CD154⁺ CD4⁺ T cells (patient BP10, Fig. 1, lower panel). In other individuals, percentages of tetramer⁺ cells among CD4⁺ CD154⁺ cells ranged from

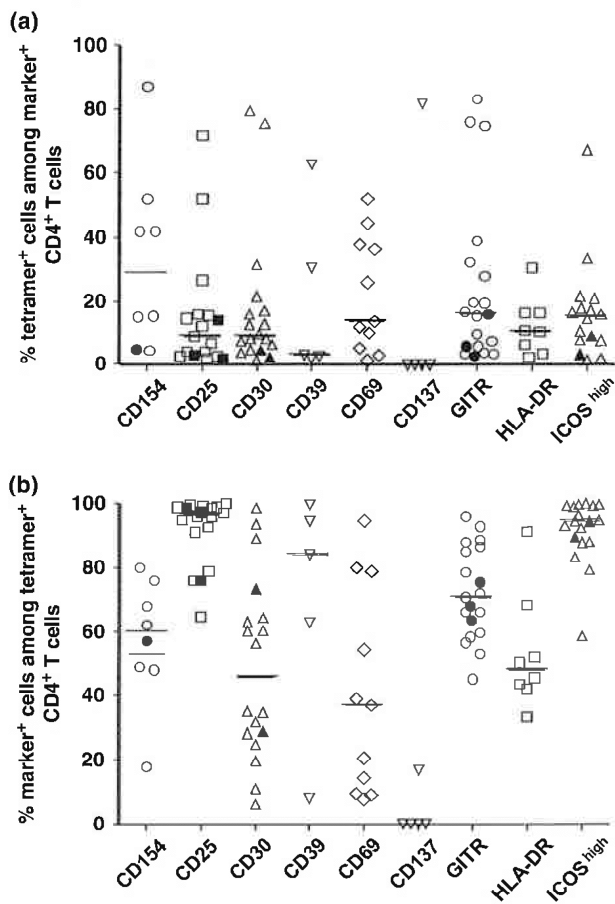


Fig. 2. Correlation between major histocompatibility complex (MHC) class II tetramer staining and surface expression of activation markers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 20 patients allergic to either birch pollen (BP), grass pollen (GP) or house dust mite (HDM) (open symbols) or three non Bet v 1-allergic donors (including two non atopic individuals as well as a patient allergic to HDM tested for Bet v 1 reactivity, black symbols) were stimulated for 14–16 days with appropriate li-key conjugate peptide mixes. Cells were co-stained with the appropriate tetramer and antibodies directed against two activation markers. The expression of markers was assessed without re-stimulation except for CD137, where cells were re-stimulated for 24 h after amplification. (a) Percentages of marker⁺ CD4⁺ T cells reactive with tetramers ($n=5-20$) and (b) percentages of tetramer⁺ CD4⁺ T cells expressing given activation markers ($n=5-20$).

5% to 52% (mean $\pm$ SEM: $25\pm7\%$, $n=7$), with one representative patient (i.e. BP9), shown in Fig. 1 upper panel.

We subsequently extended these experiments to other activation markers, after determining in preliminary experiments the appropriate time-point for the optimal detection of each of these markers (data not shown). In those experiments conducted in samples from five to 20 individuals, the average percentage of marker⁺ CD4⁺ T cells reacting with specific tetramers ranged from 12% to 24%, depending upon the marker considered, with in addition a large inter-individual variability (Fig. 2a).

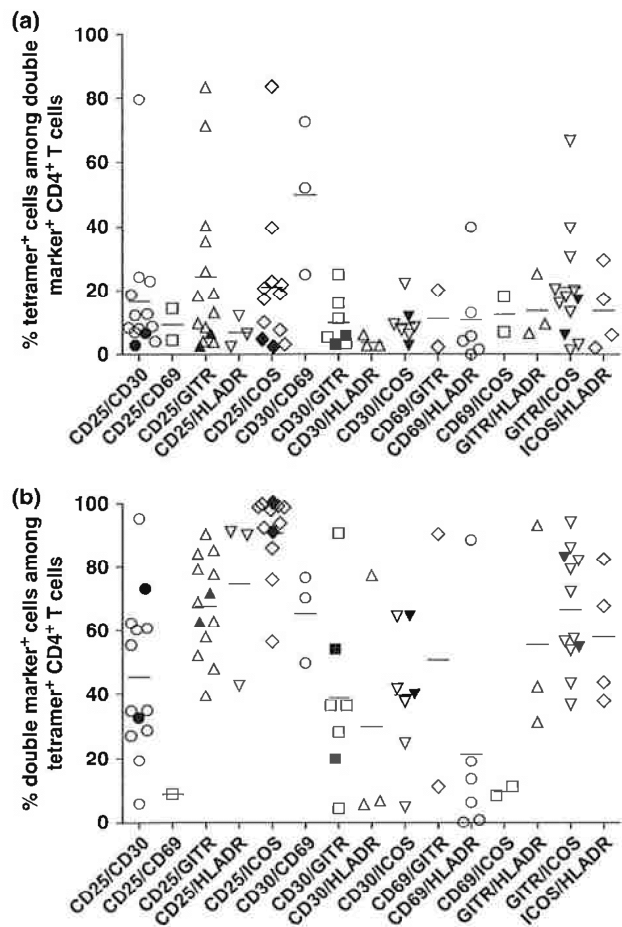


Fig. 3. Correlation between major histocompatibility complex (MHC) class II tetramer staining and surface expression of activation markers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from 13 patients allergic to either birch pollen (BP), grass pollen (GP) or house dust mite (HDM) (open symbols) or two non Bet v 1-allergic donors (black symbols) were stimulated for 14–16 days with appropriate li-key conjugate peptide mixes. Cells were co-stained with the appropriate tetramer and two antibodies directed against various activation markers. (a) Percentages of double marker⁺ CD4⁺ T cells reactive with tetramers ($n=1-13$) and (b) percentages of tetramer⁺ CD4⁺ T cells co-expressing given combinations of activation markers ($n=1-13$).

Although, only a small number of samples from non-atopic individuals were included in the present study, no evidence was observed for differences between allergic (open symbols) and non-Bet v 1-allergic (filled symbols) donors. Importantly, based upon preserved staining with an anti-TCR $\alpha\beta$ antibody, we excluded tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells that were not reacting with tetramers as a consequence of T cell receptor (TCR) down-regulation following antigen stimulation (data not shown). Thus, we conclude that such tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ cells represent activated cells, which are not allergen-specific. Conversely, we observed that an average of 67% (i.e. 3–92%) tetramer⁺ CD4⁺ T cells expressed surface activation

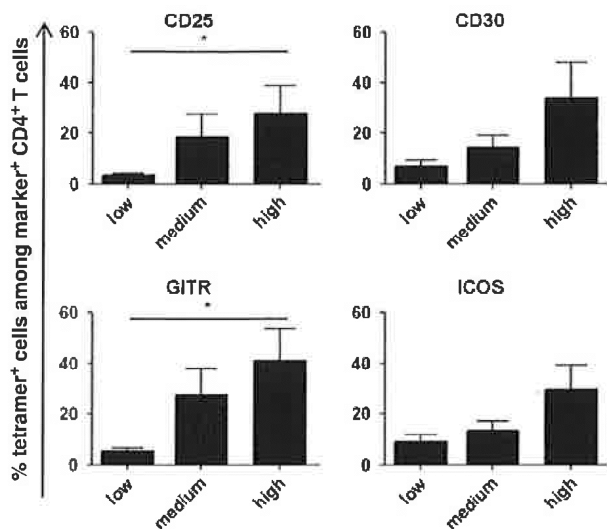


Fig. 4. Relationship between tetramer staining and allergen-specific expression of activation markers. After 14–16 days of amplification, cells were co-stained with the appropriate tetramer and antibodies directed against either CD25, CD30, GITR or ICOS, before FACS analysis. Samples were stratified in three equal groups, with respect to percentages of tetramer⁺ cells among CD4⁺ T cells as follows: low ($\leq 1.2\%$), medium (1.2–4.5%) and high ($> 4.5\%$). Percentages of cells positive for a given activation marker among tetramer⁺ CD4⁺ T cells are represented in samples with low, medium or high percentages of tetramer⁺ CD4⁺ T cells. A *P*-value < 0.05 was considered as statistically significant.

markers, suggesting that not all tetramer⁺ cells were activated in the presence of the allergen (Fig. 2b). CD25 and ICOS were the only activation markers expressed by most tetramer⁺ CD4⁺ T cells. Furthermore, combining two activation markers did not improve such correlations (Fig. 3), with the best combination CD25/ICOS being expressed by 96% (SEM: 3.7, $n = 12$) tetramer⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 3b), whereas only 22% (SEM: 6.5, $n = 12$) CD25⁺/ICOS^{high} cells reacted with tetramers (Fig. 3a). Although not shown, we failed to detect allergen-specific CD4⁺ T cells based upon CD25/OX40 (CD134) expression as proposed by others [32].

Noteworthy, when samples were subdivided into three groups based upon percentages of tetramer⁺ cells in the culture (i.e. low, medium and high), correlations between tetramer staining and marker expression were consistently superior in cell cultures containing high percentages of tetramer⁺ cells among CD4⁺ T cells, irrespective of the marker considered (Fig. 4).

Functional characterization of allergen-specific CD4⁺ T cell subsets

In this context, we further characterized functionally three subsets of CD4⁺ T cells (i.e. tetramer⁺/marker⁺, tetramer⁺/marker⁻ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells) obtained from seven distinct allergic patients. To this aim, cells were

tested after *in vitro* amplification for both tetramer staining and surface expression of either CD25, CD30, GITR or ICOS activation markers. In all these cultures, IL-5 and IL-10 production was monitored in each of the three cell subsets using CSAs after 4–5 h of allergen stimulation. Beyond variations depending upon donors, the three cell subsets exhibited a distinct cytokine secretion profile, with tetramer⁺/marker⁺ (e.g. CD25⁺, CD30⁺, GITR⁺ or ICOS^{high}) cells producing in most cases higher amounts of cytokines when compared with other subsets (Fig. 5). Tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells often produced significant levels of cytokines, thus confirming that these cells also represent truly activated CD4⁺ T cells. In contrast, tetramer⁺/marker⁻ cells consistently produced marginal levels of cytokines following allergen stimulation.

To confirm and extend these results, IL-10, IL-13, IL-17A and IFN- γ gene expression was assessed by quantitative PCR in sorted tetramer⁺/marker⁺ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells purified (with more than 99% purity) out of PBMCs from three donors after 1 h of allergen stimulation. In these experiments, we failed to sort sufficient numbers of tetramer⁺/marker⁻ CD4⁺ T cells to conduct the analysis. Independently of the donor and the activation marker considered, tetramer⁺/marker⁺ CD4⁺ T cells always expressed cytokine genes at superior levels when compared with tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells (Fig. 6).

Discussion

The analysis of allergen-specific CD4⁺ T cells is critical to better understand the physiology of immune responses in allergic and healthy individuals. Currently, tetramers are the most relevant tools to detect specific CD4⁺ T cells, but their use is restricted to the analysis of responses against immunodominant epitopes in individuals with appropriate HLA-DR haplotypes [33]. The induction of the activation marker CD154 following antigen stimulation was described as a promising alternative approach to tetramer staining in order to identify antigen-specific CD4⁺ T cells [15–17, 34]. More recently, the detection of CD154 expression was used to assess changes in CD4⁺ T cell polarization in ragweed allergic patients after immunotherapy using an Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate [35].

In this context, the aim of our study was to determine whether tetramer technology could be replaced or complemented by the detection of activation markers including not only CD154, but also CD25, CD30, CD39, CD69, CD137, GITR, HLA-DR and ICOS. We first attempted to detect CD154⁺ allergen-specific CD4⁺ T cells after 18 h of GP extract or rBet v 1 stimulation using intracellular or extracellular CD154 staining [16, 17, 31, 33]. Because the low frequency of allergen-specific progenitors in peripheral blood does not allow their detection without

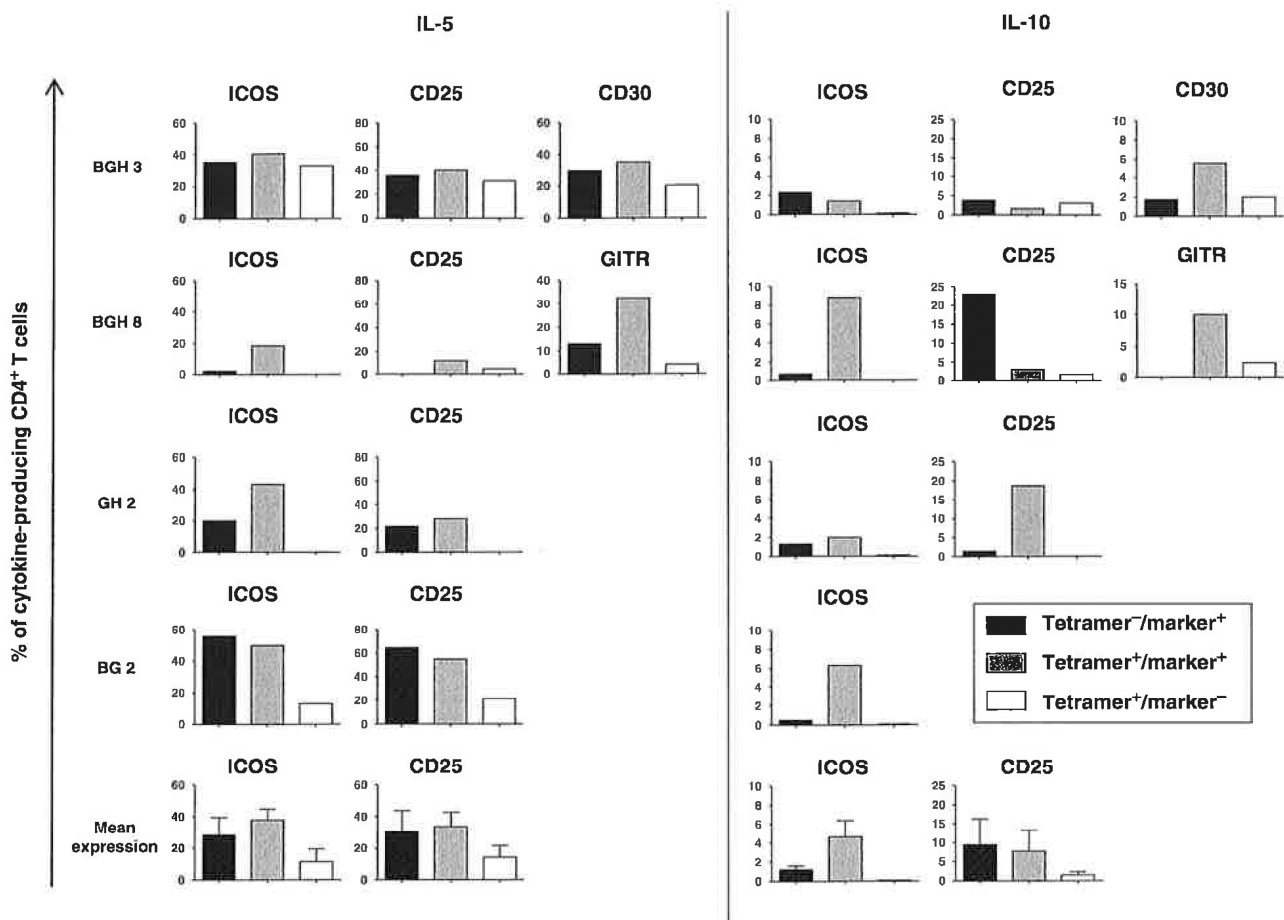


Fig. 5. Cytokine secretion by tetramer⁺/marker⁺, tetramer⁺/marker⁻ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cell subsets. Following 14–16 days of expansion, allergen-specific CD4⁺ T cells were stained with the appropriate tetramer before being specifically stimulated for 4–5 h with 10 µg/mL li-key conjugate peptide mixes. Cells were then analysed for IL-5 and IL-10 secretion at a single-cell level using a cytokine secretion assay and stained with various anti-activation marker antibodies. Data of mean expression ($n = 3-4$) ± SEM are represented in lower panels.

expansion, we recovered these cells from whole PBMCs after 14–16 days of *in vitro* allergen stimulation. In order to amplify epitope-specific CD4⁺ T cells only detected by our tetramers, we stimulated them with the li-key peptide conjugates. The latter were used preferentially to the whole protein because they provide a stronger expansion of well-defined epitope-specific T cells, whereas the rather whole allergen stimulates cells reactive with broader epitope repertoire [26, 27]. Importantly, in our experience, stimulation by li-key peptide conjugates does not skew the polarization of expanded CD4⁺ T cells [3].

We observed that 12–24% (average 18.5%) activation marker⁺ CD4⁺ T cells reacted with specific tetramers. Conversely, 3–92% (average 67%) tetramer⁺ cells were marker⁺ CD4⁺ T cells. These results highlighted three distinct populations of CD4⁺ T cells including (i) tetramer⁺/marker⁺, (ii) tetramer⁺/marker⁻ and (iii) tetramer⁻/marker⁺ cells.

Functional characterization of those populations confirmed that tetramer⁺/marker⁺ cells produce high levels

of cytokines and strongly express corresponding genes (e.g. IL-5, IL-10, IL-13 and IL-17A in allergic individuals), and thus represent 'functional' T cells specifically activated by the allergen. Tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells represent also activated T cells based upon the significant cytokine production observed in the presence of the allergen. Having excluded a down-regulation of the TCR in tetramer⁻/marker⁺ cells, we conclude that this subpopulation correspond to cells that are not specifically activated by the allergen, but may originate from a bystander activation due to cytokines secreted during allergen-specific activation [36–38]. This latter phenomenon complicates the functional analysis of allergen-specific CD4⁺ T cell responses *in vitro*, and raises as well the possibility that such non-specific T cell responses could nevertheless contribute to the amplification of allergic inflammation *in vivo*. Lastly, tetramer⁺/marker⁻ represent either anergic or 'exhausted' allergen-specific CD4⁺ T cells, unable to produce cytokines following

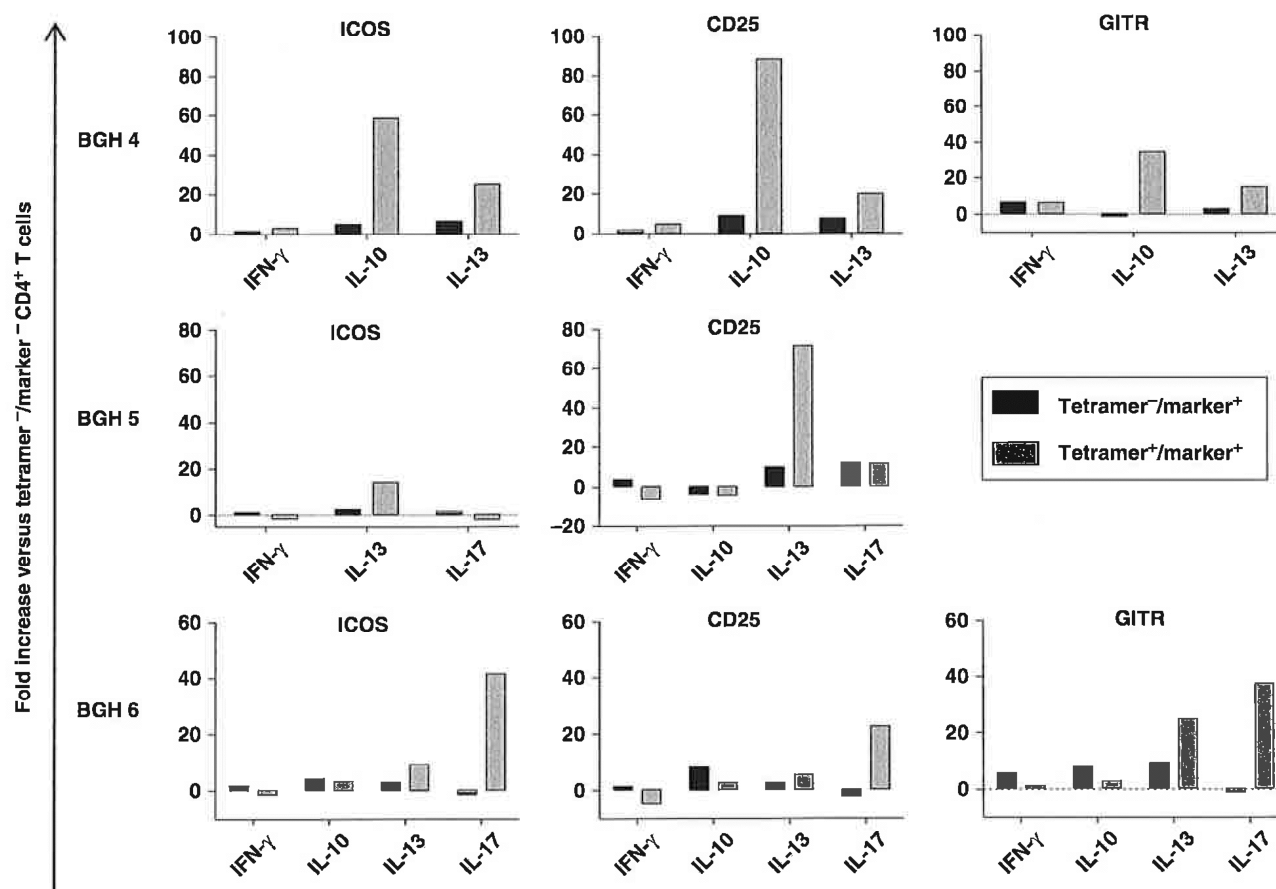


Fig. 6. Cytokine expression levels in tetramer⁺/marker⁺ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cell subsets. Following 14–16 days of expansion, allergen-specific CD4⁺ T cells were stained with the appropriate tetramer, stimulated for 1 h, labelled with anti-marker antibodies before being sorted using a MoFlo apparatus. Gene expression was analysed by quantitative RT-PCR as described in 'Materials and methods' and normalized to levels of β -actin mRNA. Data are expressed as relative amounts of IL-10, IL-13, IL-17A and IFN- γ mRNA in sorted tetramer⁺/marker⁺ and tetramer⁻/marker⁺ CD4⁺ T cells in comparison with sorted tetramer⁻/marker⁻ CD4⁺ T cells from the same individual.

allergen re-exposure [39, 40]. The induction of such a phenotype in T lymphocytes could be critical as a mechanism for tolerance induction [41], but is clearly overlooked by conventional functional analyses of CD4⁺ T cell responses.

Altogether, the detection of surface-expressed activation markers following allergen-derived peptide stimulation does not allow to detect specific CD4⁺ T cells in a reliable way, at least under our present culture conditions, and tetramer staining remains the gold standard to establish the specificity of allergen recognition. Combin-

ing the two approaches allows to investigate potentially important functional differences among CD4⁺ T cell subsets.

Acknowledgements

Conflict of interest: Some authors (M. B., H. M., S. T., L. V. O., V. B., P. M.) are employees at Stallergenes SA.

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Akdis M, Verhagen J, Taylor A *et al*. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a Fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567–75.
- Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M *et al*. Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120:707–13.
- Van Overtvelt L, Wambre E, Maillere B *et al*. Assessment of Bet v 1-specific CD4⁺ T cell responses in allergic and nonallergic individuals using MHC class

- II peptide tetramers. *J Immunol* 2008; 180:4514–22.
- 4 Bercovici N, Duffour M-T, Agrawal S *et al.* New methods for assessing T-cell responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:859–64.
- 5 Gratama JW, Kern F, Manca F *et al.* Measuring antigen-specific immune responses, 2008 update. *Cytometry A* 2008; 73A:971–4.
- 6 James EA, Kwok W, LaFond R *et al.* Visualizing antigen specific CD4⁺ T cells using MHC class II tetramers. *J Vis Exp* 2009; 323:11726–9.
- 7 Vollers SS, Stern LJ. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology* 2008; 123:305–13.
- 8 Mallone R, Nepom GT. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clinical Immunol* 2004; 110:232–42.
- 9 Baleman EAL, Ardern-Jones MR, Ogg GS. Persistent central memory phenotype of circulating Fel d 1 peptide/DRB1*0101 tetramer-binding CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1350–6.
- 10 Kinnunen T, Jutila K, Kwok WW *et al.* Potential of an altered peptide ligand of lipocalin allergen Bos d 2 for peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:965–72.
- 11 Kwok WW, Roti M, DeLong JH *et al.* Direct ex vivo analysis of allergen-specific CD4⁺ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:1407–9.
- 12 Macaubas C, Wahlstrom J, Galvao da Silva AP *et al.* Allergen-specific MHC class II tetramer+ cells are detectable in allergic, but not in nonallergic, individuals. *J Immunol* 2006; 176:5069–77.
- 13 Gadermaier G, Jahn-Schmid B, Vogel L *et al.* Targeting the cysteine-stabilized fold of Art v 1 for immunotherapy of *Artemisia* pollen allergy. *Mol Immunol* 2010; 47:1292–8.
- 14 Aslam A, Chan H, Warrell DA *et al.* Tracking antigen-specific T-cells during clinical tolerance induction in humans. *PLoS One* 2010; 5:e11028.
- 15 Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 2005; 11:1113–7.
- 16 Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D *et al.* Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005; 11:1118–24.
- 17 Cohen GB, Kaur A, Johnson RP. Isolation of viable antigen-specific CD4 T cells by CD40L surface trapping. *J Immunol Methods* 2005; 302:103–15.
- 18 Ferenczi K, Burack L, Pope M *et al.* CD69, HLA-DR and the IL-2R identify persistently activated T cells in psoriasis vulgaris lesional skin: blood and skin comparisons by flow cytometry. *J Autoimmun* 2000; 14:63–78.
- 19 Bengtsson A, Johansson C, Linder M *et al.* Not only Th2 cells but also Th1 and Th0 cells express CD30 after activation. *J Leukoc Biol* 1995; 58:583–9.
- 20 Romagnani S, Del Prete G, Maggi E *et al.* CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 1995; 57:726–30.
- 21 Wehler TC, Karg M, Distler E *et al.* Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *J Immunol Methods* 2008; 339:23–37.
- 22 Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S *et al.* GITR/GITRL: more than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 2007; 37:1165–9.
- 23 Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT *et al.* Secretion of IL-2 and IFN- γ by CD4⁺ T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170:2962–70.
- 24 Beler K, Hutloff A, Dittrich A *et al.* Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000; 30:3707–17.
- 25 Zetterquist H, Olerup O. Identification of the HLA-DRB1*04, -DRB1*07, and -DRB1*09 alleles by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Hum Immunol* 1992; 34:64–74.
- 26 Wambre E, Van Overtvelt L, Maillere B *et al.* Single cell assessment of allergen-specific T cell responses with MHC class II peptide tetramers: methodological aspects. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146:99–112.
- 27 Kallinteris NJ, Lu X, Blackwell CE *et al.* li-key/MHC class II epitope hybrids: a strategy that enhances MHC class II epitope loading to create more potent peptide vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6:1311–21.
- 28 Bakker AH, Schumacher TNM. MHC multimer technology: current status and future prospects. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:428–33.
- 29 Fourneau J-M, Cohen H, vanEndert PM. A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells. *J Immunol Methods* 2004; 285:253–64.
- 30 Novak EJ, Masewicz SA, Liu AW *et al.* Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4^{high}, proliferating subset. *Int Immunol* 2001; 13:799–806.
- 31 Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. Live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T-cell responses by CD154 expression. *Nat Protocols* 2006; 1:1–6.
- 32 Zaunders JJ, Munier ML, Seddiki N *et al.* High levels of human antigen-specific CD4⁺ T cells in peripheral blood revealed by stimulated coexpression of CD25 and CD134 (OX40). *J Immunol* 2009; 183:2827–36.
- 33 Rosa D, Ribeiro S, Cunha-Neto E. CD4⁺ T cell epitope discovery and rational vaccine design. *Arch Immunol Ther Exp* 2010; 58:121–30.
- 34 Meier S, Stark R, Frentsch M *et al.* The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4⁺ T cells. *Cytometry A* 2008; 73A:1035–42.
- 35 Campbell JD, Buchmann P, Kesting S *et al.* Allergen-specific T cell responses to immunotherapy monitored by CD154 and intracellular cytokine expression. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:1025–35.
- 36 Genova GD, Savelyeva N, Suchacki A *et al.* Bystander stimulation of activated CD4⁺ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 2010; 40:976–85.
- 37 Boyman O. Bystander activation of CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 2010; 40:936–9.
- 38 Botturi K, Vervloet D, Magnan A. T cells and allergens relationships: are they that specific? *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1121–3.
- 39 Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:305–34.
- 40 Yi JS, Cox MA, Zajac AJ. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010; 129:474–81.
- 41 Jutel M, Akdis M, Blaser K *et al.* Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. *Allergy* 2006; 61:796–807.

DISCUSSION PERSPECTIVES

DISCUSSION/PERSPECTIVES

L'allergie est une pathologie de prévalence croissante et l'ITA est la seule thérapie capable d'agir sur son étiologie. La compréhension des mécanismes d'action de ce traitement et la mise en évidence de biomarqueurs d'efficacité favoriseraient l'optimisation de ses schémas thérapeutiques. Les lymphocytes T CD4 étant des acteurs centraux de la réaction allergique, il est donc nécessaire de disposer d'outils permettant d'étudier précisément les réponses spécifiques de l'allergène de ces cellules, dans des conditions physiologiques, pathologiques ou en cours de thérapie.

Les outils pour suivre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes

L'étude exhaustive des lymphocytes T CD4 spécifiques d'un antigène se décompose en 3 points : (i) leur fréquence, (ii) leur diversité incluant le nombre d'épitopes différents reconnus par leurs TCR, le nombre et l'avidité des clones spécifiques d'un épitope, et (iii) leur fonctionnalité (phénotype, profil de sécrétion cytokinique et chimiokinique) [314].

Diverses techniques comme la mesure de la prolifération, l'ELISpot, l'ICS ou le CSA permettent d'évaluer la réponse fonctionnelle spécifique d'antigènes des lymphocytes T CD4. Toutefois, les tétramères de molécules de classe II du CMH sont actuellement l'outil le plus spécifique pour détecter les lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes. Leur principe de fonctionnement repose sur une reconnaissance spécifique par le TCR. Ils s'affranchissent ainsi de la fonctionnalité des lymphocytes (activés ou anergiques) et ne détectent pas les cellules activées par effet collatéral. Les tétramères de molécules de classe II du CMH permettent de déterminer *ex vivo* la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes. Certaines équipes y sont parvenues chez des patients atteints d'infections [297, 299, 300], de maladies auto-immunes [320], d'allergie [120, 121, 123, 125] ou de cancer [292, 293]. Dans ces études, la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène se situe entre $1/10^6$ et $1/200$ parmi les lymphocytes T CD4. Il est donc souvent nécessaire de les enrichir ou de les amplifier *in vitro* [321, 322]. Cette étape d'expansion complique la détermination de la fréquence initiale de ces cellules, peut générer des changements phénotypiques ou fonctionnels et induire la perte des clones ne s'activant pas et ne proliférant pas en réponse à une stimulation spécifique.

Un tétramère de molécules de classe II du CMH se limite à l'analyse des lymphocytes T CD4 spécifiques d'un épitope affin pour une molécule HLA donnée, restreignant les études aux épitopes identifiés pour les molécules HLA les plus répandues chez l'Homme (HLA-DRB1 principalement, tableau VIII) [303, 323]. Dans notre étude, alors que l'épitope immuno-dominant de Bet v 1 (Bet v 1₁₄₁₋₁₅₅) présente une forte affinité pour de multiples molécules de classe II du CMH, les réponses dirigées contre Der p 1/Der p 2 [324, 325] et Phl p 1/Phl p 5 [312] présentent plusieurs épitopes immunogènes qui diffèrent selon l'haplotype HLA considéré. L'étude exhaustive de la réponse spécifique d'un antigène pourrait être possible si l'on disposait de tétramères de molécules de classe II du CMH spécifiques de tous les épitopes d'une protéine et correspondant à une large gamme de molécules HLA.

Tableau VIII : Pourcentages des différents allèles DRB1 dans des populations caucasiennes, africaines et asiatiques (d'après [326]).

Allèles	Populations caucasiennes								Autres	
	France	Danemark	Allemagne	Italie	Roumanie	Espagne	Etats-Unis	Canada	Sénégal	Japon
DRB1*0101	9,3	13,0	6,7	6,5	7,6	6,6	7,3	5,6	0,6	4,9
DRB1*0301	10,9	10,2	9,4	10,5	11,4	6,7	9,5	12,3	10,2	0,4
DRB1*0401	5,6	17,6	8,1	2,3	4,2	5,6	6,7	9,5	-	1,8
DRB1*0701	14,0	14,8	12,3	12,5	8,3	18,9	14,4	9,4	7,8	0,6
DRB1*1101	9,2	0,9	9,2	12,4	7,3	1,0	4,4	2,6	9,3	2,0
DRB1*1301	6,0	8,3	4,5	4,8	4,4	4,5	5,1	4,7	4,7	0,7
DRB1*1501	8,0	17,6	7,8	5,6	6,2	9,4	10,3	10,4	-	6,8
Total	63,0	82	58	55	49	53	58	55	33	17

L'analyse de la fonctionnalité de la réponse spécifique d'antigène repose sur l'évaluation de la polarisation et de la capacité de prolifération des lymphocytes T CD4. Alors que le marquage « tétramère de classe II » se couple aisément à l'analyse du phénotype et de la prolifération, il est plus délicat de l'associer à un test fonctionnel. En effet, il faut associer le marquage « tétramère de classe II » avec l'étape d'activation nécessaire à la stimulation de la production des cytokines, entraînant une internalisation rapide du TCR et une perte possible du marquage. Toutefois, il est possible de conserver un marquage « tétramère de classe II » après activation des lymphocytes, lorsque celui-ci est réalisé avant la stimulation de la cellule dans un temps plus court, afin de garder libre certains TCR pour l'activation [327]. Une autre approche possible consiste à utiliser des doses peptidiques suffisantes pour stimuler la production de cytokines sans causer l'internalisation du TCR [328].

L'avidité des clones de lymphocytes T CD4 spécifiques d'un antigène, comme précédemment démontré, peut être évaluée grâce à l'intensité de fluorescence du marquage « tétramère de classe II » *ex vivo* [329]. Pour une analyse après amplification *in vitro*, les stimulations

inhérentes aux protocoles d'expansion peuvent provoquer l'internalisation du TCR et ainsi biaiser l'appréciation de l'avidité des clones. Une solution est de ne pas stimuler les cellules en culture pendant une période donnée (3 jours minimum), afin que le TCR soit ré-exprimé. Le meilleur moyen d'évaluer l'avidité d'une réponse lymphocytaire spécifique d'antigène est de déterminer l'EC₅₀ (concentration d'antigène nécessaire pour induire 50% de la réponse maximale (prolifération, sécrétion de cytokines)) par des courbes de dose-réponse [119, 329]. L'étude de la diversité des clones (ou étude du répertoire T CD4) consiste à évaluer les segments variables et fonctionnels, mais aussi la taille de la région CDR3 du TCR. Après isolement des cellules marquées à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH, l'analyse du répertoire des TCR des lymphocytes T CD4 spécifiques d'un épitope peut être réalisée par spectratype/Immunoscope [330, 331]. Un autre moyen consiste à co-marquer les cellules avec les tétramères de molécules de classe II du CMH et des anticorps anti-V β [332, 333].

Ainsi, les tétramères de molécules de classe II du CMH permettent de déterminer la fréquence (*ex vivo*) et la diversité épitopique (*ex vivo*) de la réponse lymphocytaire T CD4, et servent d'outil de détection pour l'étude de la fonctionnalité, de l'avidité et de la clonalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes.

Cependant, la conception des tétramères de molécules de classe II du CMH est fastidieuse car elle comprend l'identification des épitopes et implique l'évaluation de l'affinité de tous les peptides d'une protéine pour une molécule de classe II du CMH. De plus, les tétramères de molécules de classe II du CMH ne sont pas disponibles pour l'ensemble des haplotypes HLA. La détermination d'une méthode de détection s'affranchissant de l'épitope et de la restriction HLA permettrait d'étudier la réponse lymphocytaire T CD4 spécifique d'allergènes dans son ensemble et chez tous les individus.

Un moyen de procéder est de comparer l'expression de marqueurs d'activation membranaires à un marquage « tétramères de classe II ». Ces marqueurs peuvent soit être exprimés transitoirement après une stimulation spécifique du TCR (pour ne détecter ni les cellules activées avant l'analyse, ni les cellules activées par effet collatéral) ou (ii) exprimés constitutivement par les cellules spécifiques d'allergènes.

Plusieurs marqueurs d'activation comme CD154, CD137 ou CD25/OX40 ont été décrits comme permettant la détection de lymphocytes T CD4 spécifiques d'antigènes après

stimulation *ex vivo* ou courte stimulation *in vitro* (< 7 jours). Toutefois, ces marqueurs se sont avérés inadaptés dans notre modèle qui nécessite une période d'amplification des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes d'au moins 2 semaines pour avoir une fréquence suffisante et ainsi faire des analyses fonctionnelles pertinentes. L'analyse de l'expression de marqueurs d'activation comme CD25, CD30, CD39, CD69, GITR, HLA-DR ou ICOS a révélé une variabilité inter-patients élevée et une corrélation insuffisante avec le marquage « tétramère de classe II ». Cependant, nous avons mis en évidence trois sous-populations : les lymphocytes tétramère⁺/marqueur⁺, tétramères⁺/marqueur⁻ et tétramère⁻/marqueur⁺. Afin de définir les caractéristiques propres à ces sous-populations, nous les avons analysées fonctionnellement en réponse à une stimulation allergénique. Les cellules tétramère⁺/marqueur⁺ ou cellules spécifiques activées, sont capables de produire des cytokines, contrairement aux lymphocytes T CD4 tétramères⁺/marqueur⁻. L'existence de ces lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes anergiques suggère un possible mécanisme d'induction de tolérance. Enfin, les lymphocytes T CD4 tétramère⁻/marqueur⁺ sécrétant de forts taux de cytokines sont la preuve d'une réelle activation par effet collatéral, confirmant la difficulté d'étudier les réponses spécifiques d'allergènes après amplification *in vitro* sans utiliser de tétramères de molécules de classe II du CMH. Cette observation soulève également le rôle possible de ces cellules dans l'exacerbation de l'inflammation allergique *in vivo*. En effet, il a été démontré *in vivo* chez la souris, qu'une stimulation antigénique spécifique pouvait entraîner par effet collatéral la prolifération de lymphocytes T CD4 non spécifiques de cet antigène [334].

Par ailleurs, une équipe avec laquelle nous collaborons a mis en évidence 5 molécules membranaires (confidentiel car dépôt de brevet en cours) permettant d'identifier *ex vivo* les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes pathogéniques (Th2A). Présents chez les patients allergiques, les lymphocytes Th2A sont quasiment indétectables chez les individus sains. On entend par pathogénique, des lymphocytes T CD4, qui suite à une stimulation allergénique spécifique, génèrent de fortes réponses de type Th2 [143]. Le fait que les lymphocytes Th2A incluent la quasi-totalité des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes, leur détection ne permet pas de déterminer quelle est la spécificité allergénique de ces cellules en cas de polysensibilisation. Un moyen de définir cette spécificité allergénique est de trier cette sous-population de lymphocytes Th2A, puis de les stimuler avec l'allergène d'intérêt afin de détecter les cellules qui s'activent. Toutefois, cela ne permet pas de s'affranchir de l'activation par effet collatéral.

Actuellement, les tétramères de molécules de classe II du CMH restent l'outil le plus adapté à la détection des lymphocytes T CD4 spécifiques d'un allergène.

Les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de Bet v 1 et de Der p 1/Der p 2 chez les individus sains et allergiques

Après avoir développé les tétramères de molécules de classe II du CMH spécifiques de Bet v 1, Der p 1 et Der p 2, nous avons détecté puis caractérisé phénotypiquement et fonctionnellement les lymphocytes T CD4 spécifiques de ces allergènes chez les individus sains et allergiques. Les individus sains présentent un profil Th1 (CXCR3⁺, IFN- γ ⁺)/Treg (CTLA-4⁺/IL-10⁺) « mémoire centrale » (CCR7⁺/CD62L⁺), quel que soit l'allergène considéré. Chez les sujets allergiques, les lymphocytes T CD4 spécifiques de Bet v 1 développent un profil Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) « mémoire effectrice » (CCR7⁻/CD62L⁻) et les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1/Der p 2 présentent des profils de polarisation plus hétérogènes (Th2, Th1/Th2, Th1/Th17) « mémoire centrale ».

Chez les sujets sains, le stade de différenciation « mémoire centrale » des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes favoriserait leur intervention permanente dans le maintien de tolérance par une plus grande capacité de ces lymphocytes à migrer via l'expression de CCR7 et CD62L [328]. De plus, leur profil de sécrétion cytokinique Th1/Treg est identique à celui observé chez certains patients après ITA. Cependant, nous n'avons pas détecté de cellules co-sécrétrices d'IFN- γ /IL-10 comme observé dans une étude d'ITA [229].

Chez les patients allergiques au pollen de bouleau, allergène saisonnier, les lymphocytes T CD4 spécifiques de Bet v 1, sont de type « mémoire effectrice », comme généralement observé pour les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes [121, 122, 143]. Au contraire, les individus allergiques aux acariens, allergènes perannuels auxquels les patients sont exposés chroniquement, semblent présenter des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1/Der p 2 ayant un phénotype « mémoire centrale ». L'étude des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de virus (LCMV chez la souris) indiquent que la chronicité d'exposition peut induire une déplétion des lymphocytes T « mémoire effectrice » et n'affecte pas les lymphocytes T « mémoire centrale », pouvant ainsi expliquer cette observation [336, 337]. Une autre hypothèse serait que les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes de type « mémoire centrale » sont circulants, alors que ceux de type « mémoire effectrice » sont

localisés au niveau des organes cibles, comme suggéré dans une étude portant sur les lymphocytes T CD4 spécifiques de Fel d 1, allergène majeur de la salive de chat [120].

Il ne faut pas exclure que le type de réponses lymphocytaires induite peut être liée aux propriétés intrinsèques à l'allergène. Alors que Bet v 1 et Der p 2 ne sont pas des enzymes, Der p 1 est une cystéine protéase capable d'accroître la perméabilité de l'épithélium bronchique [338, 339]. La structure de l'allergène peut également influencer la réponse immunitaire comme observé lors de mutagenèse dirigée de Bet v 1 [340] ou de recombinants de Der p 1 dont la conformation n'est pas identique à la protéine naturelle [341, 342, 343]. Chez les individus allergiques le caractère respectivement homogène et hétérogène des réponses spécifiques de Bet v 1 et de Der p 1/Der p 2 ne permet pas de conclure quant à l'importance des paramètres biochimiques (activité enzymatique) des allergènes sur la nature de la réponse lymphocytaire engendrée. Chez les individus sains, Bet v 1 et Der p 2 entraînent une réponse Th1 plus marquée que Der p 1 qui engendre également une faible sécrétion de cytokines Th2. Toutefois, le faible nombre de patients analysés ne nous permet pas d'affirmer fermement que l'activité enzymatique de Der p 1 est liée à la réponse observée.

La diversité des réponses fonctionnelles lymphocytaires T CD4 spécifiques de Der p 1/Der p 2 que nous avons observée pourrait être liée au fait que les épitopes de Der p 1/Der p 2 nous servant à étudier les réponses spécifiques d'allergènes sont sous-dominants/cryptiques, c'est-à-dire qu'*in vivo*, ils ne sont pas ou peu générés. En effet, avec notre approche d'identification des épitopes immuno-dominant consistant à évaluer l'ensemble des épitopes d'une protéine et leur affinité avec les molécules HLA, nous ne tenons pas compte du paramètre « dégradation endolysosmale par les APCs ». Cette étape du processus de la présentation des antigènes par les APCs n'aboutit pas à la génération de l'ensemble des peptides d'une protéine [311, 344]. Alors que Bet v 1₁₄₁₋₁₅₅ est un épitope immuno-dominant généré et présenté *in vivo* par les APCs [311], cela n'a pas été démontré pour les épitopes de Der p 1 et de Der p 2. Il est donc possible que les réponses lymphocytaires que nous observons *in vitro* suite à une stimulation avec ces peptides ne se produiraient pas *in vivo*. Un moyen de remédier à ce biais serait de stimuler les cellules avec la protéine entière, d'analyser les lymphocytes T CD4 spécifiques d'épitopes directement *ex vivo* ou d'utiliser une approche récemment décrite consistant à identifier *in vitro*, les peptides issus de la dégradation des protéines par les CPAs [311, 344]. L'hétérogénéité des réponses spécifiques de Der p 1/Der p 2 pourrait également être à l'origine d'une co-exposition de Der p 1/Der p 2 avec des endotoxines présentes dans la

poussière (adjuvants Th1) [345, 346], ou à l'exposition constante à de fortes doses pouvant générer des réponses Th1 [265, 347].

Ainsi, les différences relatives aux réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes observées entre individus sains et allergiques, ainsi qu'entre allergènes perannuels et saisonniers peuvent être liés à plusieurs paramètres, incluant notamment, les propriétés inhérentes à l'allergène, l'immuno-dominance des épitopes, la fréquence d'exposition et l'atopie.

La standardisation des essais cellulaires lors des études longitudinales

Deux études cliniques menées en double aveugle avec un contrôle placebo, pour évaluer l'efficacité clinique de comprimés sublinguaux de désensibilisation nous ont permis de suivre les réponses cellulaires périphériques spécifiques d'allergènes au cours d'ITA sublinguale. L'étude de phase I, VO56.07A, a été réalisée chez 89 patients allergiques aux pollens de graminées traités pendant 4 mois hors saison pollinique. Cette étude était ponctuée de stimulations allergéniques en chambre à pollens pour standardiser l'exposition aux allergènes. Au cours de cette étude, nous avons suivi les réponses de PBMCs *ex vivo* ou après stimulation allergénique *in vitro*, ainsi que les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques de Phl p 1 et Phl p 5 à l'aide de tétramères de molécules de classe II du CMH. La seconde étude clinique (VO64.08) a été effectuée chez 423 enfants allergiques aux acariens traités pendant une année au cours de laquelle nous avons évalué chez 21 patients, les réponses spécifiques d'allergènes des PBMCs, des lymphocytes T CD4, ainsi que les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1 à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH.

Dans l'étude VO56.07A, nous avons pu observer que des paramètres immunologiques variaient significativement dans les deux groupes. C'est le cas de l'expression *ex vivo* de marqueurs Th2 (CRTh2, CCR4), Th1 (CCR5) et Treg (CD25/CD127/Foxp3), ainsi que de l'expression génique de T-bet après stimulation *in vitro*. Dans l'étude VO64.08, l'augmentation de la production d'IL-17A et de TNF- α détectée au niveau intracellulaire après le traitement, bien que visible dans les groupes actif et placebo, n'était significative que dans le groupe placebo, probablement à cause d'un petit nombre de patients (n=18). Ces éléments soulèvent l'importance d'avoir des contrôles comme un groupe placebo et des conditions de stimulation avec des antigènes de rappel vaccinaux. En effet, la réponse induite par ces antigènes n'est pas sensée être modifiée par le traitement, permettant ainsi de s'assurer

de la reproductibilité des expérimentations lors d'études longitudinales, surtout lorsque les analyses sont effectuées séquentiellement et qu'elles comprennent des analyses fonctionnelles, plus susceptibles aux variations. Les modifications que nous avons détectées suite à une stimulation allergénique sont similaires à celle observées suite à une stimulation avec les antigènes de rappel vaccinaux, indiquant que ces réponses ne sont pas spécifiques de l'allergène. Dans la VO64.08, cela peut s'expliquer par la réalisation séquentielle des expérimentations mais aussi par l'utilisation de lots différents de certains réactifs (monensine, brefeldine et anticorps de marquage).

Dans la VO56.07A, certains paramètres immunologiques sont modifiés uniquement dans le groupe placebo comme la prolifération induite par Dac g 5 et l'expression de TGF- β après stimulation (qPCR). Ce type de variation, lorsqu'il s'agit de paramètres pro-inflammatoires comme l'IL-17 et le TNF- α par exemple, pourrait s'expliquer par une détérioration de l'état du patient. Toutefois, ce n'est pas le cas ici, où l'augmentation mineure de l'expression du TGF- β , cytokine régulatrice, est également observée avec les antigènes de rappel vaccinaux. Il en est de même pour la prolifération induite par Dac g 5.

D'un point de vue logistique, afin de réduire les variabilités et de mettre au point des essais standardisés, il est préférable de congeler les cellules dès le prélèvement, puis de réaliser les expérimentations simultanément. Il existe également des dispositifs (seringue TruCulture par exemple) permettant d'incuber dès le prélèvement, le sang total avec un agent stimulant d'intérêt pour une durée bien déterminée. Une fois la réaction arrêtée, le surnageant est récupéré et les cellules mise en présence d'un stabilisateur d'ARN pour l'analyse respective des molécules sécrétées et des transcrits. Des tubes de prélèvement contenant des stabilisateurs d'ARN (tubes PAXgene) sont également disponibles. Dans ces deux systèmes, les échantillons peuvent être congelés pour une analyse ultérieure. L'avantage de ces dispositifs repose sur la réduction des variations liées à la récupération et à la manipulation des échantillons.

Le suivi des réponses cellulaires périphériques à court terme et à plus long terme lors d'ITA sublinguales

Dans la VO56.07A, nous avons suivi les modifications des réponses cellulaires périphériques à court terme. Une diminution significative de l'expression d'IL-4, d'IL-10 et de la sécrétion d'IL-10 par les PBMCs en réponse à l'allergène est observée suite à 4 mois de traitement

actif. L'analyse des lymphocytes Th2A *ex vivo* indique une diminution significative de ces derniers après 4 mois de traitement. L'analyse des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH ne révèle ni délétion, ni modification de leur polarisation.

Alors que la baisse significative de l'expression d'IL-4 et d'IL-10 en réponse à l'allergène ne semble pas biologiquement pertinente du fait d'une faible variation, la diminution de la sécrétion d'IL-10 est réelle. Cette baisse pourrait traduire l'induction d'anergie des lymphocytes T CD4 comme précédemment décrit [246, 247]. Toutefois, cette production ne peut être formellement attribuée aux lymphocytes T CD4 car le dosage a été réalisé sur l'ensemble des PBMCs. De plus, comme le démontre une étude récente, suite à une ITA, l'IL-10 est majoritairement produite par les monocytes après une courte stimulation spécifique des PBMCs *in vitro* [232].

La baisse de la proportion de lymphocytes Th2A *ex vivo* suggère plutôt une délétion de certains lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes, également évoquée comme mécanisme d'action de l'ITA [225, 250-252]. L'absence de variation significative du pourcentage des lymphocytes T CD4 spécifiques de Phl p 1 et de Phl p 5 chez les patients actifs, malgré une analyse après amplification *in vitro*, indique qu'ils ne sont pas éliminés après 4 mois de traitement. Pour des raisons de quantités de matériel biologique, l'étude des lymphocytes Th2A a été réalisée uniquement chez les patients ne présentant pas un haplotype compatible avec l'analyse des lymphocytes T CD4 spécifiques de Phl p 1 et Phl p 5 à l'aide des tétramères de molécules de classe II du CMH. La comparaison des résultats obtenus avec ces deux approches n'est donc pas fiable. Toutefois, par extrapolation, nous pouvons émettre l'hypothèse que la baisse des lymphocytes Th2A marque le début d'une délétion des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes induite par le traitement, comme récemment suggéré [143]. Ceci peut expliquer pourquoi nous détectons encore des lymphocytes T CD4 spécifiques de Phl p 1 et de Phl p 5, qui ne représentent qu'une partie des lymphocytes T CD4 spécifiques des graminées [312]. Toutefois, il ne faut pas exclure que les épitopes dont nous étudions la réponse (Phl p 1 et Phl p 5) sont peut-être des épitopes sous-dominants/cryptiques, peu ou pas présentés *in vivo*.

L'ensemble des paramètres immunologiques significativement modifiés dans le groupe actif sont, de ce fait, induits par l'ITA. Toutefois, ces variations ne corrélaient pas avec l'efficacité clinique, indiquant qu'il s'agit de modifications accessoires qui ne participent pas à

l'efficacité du traitement. Toutefois, le petit nombre de patients analysés pour l'étude des lymphocytes Th2A (n=33) pourrait justifier l'absence de corrélation significative avec l'efficacité clinique. Par ailleurs, 4 mois de traitement semblent précoces pour qu'une rééducation de la réponse lymphocytaire T CD4 se produise. Les variations que nous avons observées peuvent suggérer que les modifications de la réponse immunitaire induite par l'ITA sont initiées.

Dans la VO64, ce sont les modifications des réponses cellulaires périphériques à plus long terme que nous avons évaluées. La détection de lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes avec les tétramères de molécules de classe II du CMH après le traitement, nous permet de conclure à une absence de délétion de ces derniers. Encore une fois, il ne faut pas exclure l'hypothèse que les épitopes utilisés sont peut-être sous-dominants/cryptiques. La baisse de l'expression de CTLA-4 par les lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1 observée suite à l'ITA chez les 3 patients analysés (1 patient placebo, 2 patients actifs), est probablement due au changement de clones d'anticorps entre les analyses avant et après traitement. L'expression de CCR7 est également diminuée mais seulement chez les actifs, toutefois l'expression de CD62L ne suit pas ces tendances. Cela pourrait être lié à des cinétiques d'expression différentes entre ces deux molécules *in vitro* ou correspondre à la présence d'une population de lymphocytes T CD4 « mémoire effectrice » CCR7/CD62L⁺ issus du pool de lymphocytes T CD4 « mémoire centrale » et capables de s'auto-renouveler rapidement [348]. Cependant, le faible nombre de patients analysés ne nous permet pas de conclure quant à la polarisation des lymphocytes T CD4 spécifiques de Der p 1.

Dans notre étude, rDer p 2 induit une plus forte production de l'ensemble des cytokines que rDer p 1, excepté pour le TGF- β , qui était indétectable quelles que soient les conditions de stimulations. Une explication possible est une sensibilisation des patients à Der p 1 significativement inférieure à Der p 2 ($p < 0,001$). Nous avons également émis l'hypothèse que les hôtes d'expression de rDer p 2 et rDer p 1 pouvaient influencer ces tendances. Alors que rDer p 1 est produit dans des plants de tabac, rDer p 2 est produit dans *E. coli*, le rendant plus susceptible aux contaminations endotoxiques. Or, après purification, aucune de ces protéines ne contenait d'endotoxines. De plus, la stimulation avec rDer p 2 de PBMCs issues de patients présentant des taux négatifs d'IgE spécifiques de Der p 2 sécrètent de plus faibles taux de cytokines que les PBMCs de patients sensibilisés à Der p 2. L'ensemble de ces éléments suggère que la production de cytokines observée suite à une stimulation avec rDer p 2 est liée à la protéine proprement-dite.

Alors que les résultats relatifs à la production de cytokines Th2 ne révèlent pas de modification quelle que soit la méthode utilisée, une augmentation significative de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4 totaux suite à une stimulation avec rDer p 2 est détectée après un an de traitement, uniquement dans le groupe actif. Cette observation suggère une immuno-déviations Th2 vers Th1, comme démontré dans des études d'ITA sublinguale [222, 224]. L'augmentation de la production d'IFN- γ ne corrèle pas avec l'efficacité clinique du traitement. Cependant, dans cette étude, les symptômes étaient insuffisants pour mettre en évidence une différence significative entre les patients ayant reçus le traitement actif ou le placebo. Ces éléments suggèrent que l'augmentation de la production d'IFN- γ est un épiphénomène. Toutefois, l'appréciation des symptômes est plus délicate chez les enfants, pouvant introduire des biais d'analyses liés au conditionnement (prise en charge) et à la suggestion (un médicament reste un médicament, qu'il contienne un principe actif ou un placebo), remettant en question l'augmentation d'IFN- γ comme épiphénomène [349, 350].

Enfin, que ce soit dans l'étude VO56.07A ou VO64.08, nous n'avons détecté ni augmentation de la proportion de lymphocytes Treg, ni augmentation des cytokines régulatrices (IL-10 et TGF- β), comme observé dans diverses études d'ITA [139, 222, 224]. De plus, nos résultats sont en contradiction avec l'hypothèse que l'efficacité de l'ITA repose, tout du moins après une période de traitement inférieure à 1 an, sur l'acquisition d'un statut immunitaire d'individu « sain », correspondant, comme nous l'avons démontré, à des réponses lymphocytaires spécifiques d'allergènes de type Th1/Treg.

Ainsi, dans ces deux études cliniques, comme souvent observé pour les augmentations d'IgG4 [351], les variations périphériques des paramètres immunologiques que nous avons détectées sont liées au traitement, mais pas à l'efficacité clinique, tout du moins pour l'ensemble des patients. Cela pourrait être lié à des mécanismes antagonistes qui inhibent transitoirement chez une partie des patients les paramètres mesurés. L'absence de détection de modifications reliées à l'efficacité de l'ITA peut également être due au fait que le sang est un organe de transit dans lequel les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes sont « de passage » et donc peu fréquents. L'étude des réponses lymphocytaires spécifiques d'allergènes sur des biopsies nasales pourrait permettre d'accroître la détection de lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes, et ainsi de déterminer s'ils agissent au niveau local et de quelle manière ils interviennent. Cette absence de corrélation peut également s'expliquer par des mécanismes d'efficacité de l'ITA différents selon les patients.

Par ailleurs, compte tenu de la diversité des résultats obtenus lors de ces deux études, il est préférable d'effectuer, lors d'études cliniques, des analyses à différents stades du traitement pour ne pas manquer des variations transitoires pouvant être cruciales pour la compréhension des mécanismes. Il faudrait également étudier ces réponses sur un laps de temps plus long afin de déterminer quand et comment la rééducation du système immunitaire s'opère. Ce dernier point est essentiel pour la mise en évidence de biomarqueurs d'efficacité à long terme. En effet, l'identification de biomarqueurs d'efficacité à court terme au niveau des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques s'est avérée infructueuse, les changements ayant peut-être lieu plus tardivement.

Malgré tout, nous pourrions émettre l'hypothèse que dans un premier temps, l'ITA sublinguale, via l'administration de doses croissantes et répétées d'allergènes, induit une déléation du pool de lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes Th2A. Dans un second temps suite aux expositions allergéniques ultérieures au traitement, le renouvellement du pool de lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes aboutit à la génération de cellules présentant un profil de polarisation Th1.

Il est cependant possible, d'envisager de nouvelles perspectives pour mieux comprendre les mécanismes responsables de l'efficacité clinique de l'ITA et mettre en évidence des biomarqueurs associés à cette efficacité.

L'étude des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes après purification *ex vivo* basée sur des approches globales de transcriptomique ou de protéomique pourrait permettre la mise en évidence de paramètres immunologiques exprimés de manière différentielle chez les patients allergiques ayant reçu ou non une ITA efficace. Ce type d'approche rend possible l'identification de marqueurs n'ayant *a priori* pas de lien direct avec les mécanismes supposés et pourrait apporter de nouvelles pistes quant aux mécanismes et à la découverte de biomarqueurs d'efficacité de l'ITA. Toutefois, l'étude du protéome s'avère plus difficile à mettre en œuvre que celle du transcriptome, du fait de la complexité d'analyse des protéines comparé aux ARNm.

Ainsi, la réalisation d'analyses au niveau local et/ou périphérique avec des approches plus ou moins globale, pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes de l'ITA et de mettre en évidence des biomarqueurs d'efficacité directement reliés aux réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes. Cependant, la standardisation d'essais cellulaires en laboratoire d'analyses est délicate. A moins d'identifier des marqueurs dont l'expression est d'une part

exclusivement restreinte aux lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes permettant ainsi une détection sur l'ensemble des PBMCs avec des méthodes standardisées et d'autre part liée à l'efficacité de l'ITA, l'étude des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes doit plutôt être envisagée comme une étape préliminaire à l'identification de biomarqueurs d'efficacité à utiliser en routine. En effet, comme nous l'avons démontré au cours de ces travaux, les lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes sont délicats à analyser. Bien que l'étude de ces cellules puisse permettre de comprendre quel est le mode d'action de l'ITA, comme biomarqueurs d'efficacité, on préférera par exemple, une ou des protéines à doser dans le sérum ou des gènes dont l'expression est mesurable sur l'ensemble des PBMCs. Enfin, il ne faut pas exclure que les mécanismes d'action de l'ITA fassent intervenir d'autres type cellulaires que les lymphocytes T CD4, élargissant ainsi les champs de recherche.

CONCLUSION

CONCLUSION

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence les différences entre les réponses spécifiques d'allergènes saisonnier (Bet v 1) et perannuels (Der p 1/Der p 2) chez les individus sains et allergiques. De plus, nous avons montré les difficultés rencontrées pour établir une corrélation directe entre l'efficacité clinique de l'ITA et la détection des modifications des réponses lymphocytaires T CD4 périphériques spécifiques d'allergènes induites par le traitement. Enfin, nous avons confirmé que les tétramères de molécules de classe II du CMH sont à l'heure actuelle, l'outil le plus spécifique pour détecter, puis suivre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes dans des conditions physiologiques, pathologiques ou en cours de traitement. Toutefois, la faible fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques d'allergènes au niveau périphérique reste le principal obstacle de l'étude de ces cellules. La détection et le suivi des lymphocytes Th2A, bien que moins spécifique, est peut-être la solution alternative aux tétramères de molécules de classe II du CMH dans le domaine de l'allergie.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pichler WJ, Immune mechanism of drug hypersensitivity. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004;24: 373-97.
2. Thomas WR, Cunningham PT, Hypersensitivity: Immunological *LS*: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
3. Bousquet J, Khaltayev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, Zuberbier T, Baena-Cagnani CE, Canonica GW, Van Weel C, Agache I, Aït-Khaled N, Bachert C, Blaiss MS, Bonini S, Boulet LP, Bousquet PJ, Camargos P, Carlsen KH, Chen Y, Custovic A, Dahl R, Demoly P, Douagui H, Durham SR, Van Wijk RG, Kalayci O, Kaliner MA, Kim YY, Kowalski ML, Kuna P, Le LTT, Lemièrè C, Li J, Lockey RF, Mavale-Manuel S, Meltzer EO, Mohammad Y, Mullol J, Naclerio R, O'Hehir RE, Ohta K, Ouedraogo S, Palkonen S, Papadopoulos N, Passalacqua G, Pawankar R, Popov TA, Rabe KF, Rosado-Pinto J, Scadding GK, Simons FER, Toskala E, Valovirta E, Van Cauwenberge P, Wang DY, Wickman M, Yawn BP, Yorgancioglu A, Yusuf OM, Zar H, Annesi-Maesano I, Bateman ED, Kheder AB, Boakye DA, Bouchard J, Burney P, Busse WW, Chan-Yeung M, Chavannes NH, Chuchalin A, Dolen WK, Emuzyte R, Grouse L, Humbert M, Jackson C, Johnston SL, Keith PK, Kemp JP, Klossek JM, Larenas-Linnemann D, Lipworth B, Malo JL, Marshall GD, Naspitz C, Nekam K, Niggemann B, Nizankowska-Mogilnicka E, Okamoto Y, Orru MP, Potter P, Price D, Stoloff SW, Vandenplas O, Viegi G, Williams D, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008*. *Allergy* 2008;63: 8-160.
4. Barnes KC, Marsh DG, The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunol Today* 1998;19: 325-32.
5. Kurz T, Altmueller J, Strauch K, Rüschendorf F, Heinzmann A, Moffatt MF, Cookson WOCM, Inacio F, Nürnberg P, Stassen HH, Deichmann KA, A genome-wide screen on the genetics of atopy in a multiethnic European population reveals a major atopy locus on chromosome 3q21.3. *Allergy* 2005;60: 192-99.
6. Espinosa E CP, *Immunologie: Ellipses*, 2006.
7. Vervloet D MA, *Traité d'allergologie*: Flammarion, 2003.
8. Rancé F N-RR, Dutau G, *Les allergies polliniques: Expansion, formation et edition* 2007.
9. www.asthma76.com.
10. M HR, *Immunologie moléculaire des allergènes de pollens de graminées. Expressions* 2007;26: 8-12.
11. www.stallergenes.fr.
12. Ciprandi G, Cirillo I, Vizzaccaro A, Tosca M, Passalacqua G, Pallesstrini E, Canonica GW, Seasonal and perennial allergic rhinitis: is this classification adherent to real life? *Allergy* 2005;60: 882-87.
13. Camarda LE, Grayson MH, Can Specific IgE Discriminate between Intrinsic and Atopic Asthma? *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184: 152-53.
14. T R, Is intrinsic or non-atopic asthma a particular disease? *Revue médicale suisse* 2005;1: 2640-43.

15. G D, Allergologie. 2e Edn: Masson, 2006.
16. Bateman ED, Hurd SS, Barnes PJ, Bousquet J, Drazen JM, FitzGerald M, Gibson P, Ohta K, O'Byrne P, Pedersen SE, Pizzichini E, Sullivan SD, Wenzel SE, Zar HJ, Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. *Eur Respir J* 2008;31: 143-78.
17. Bousquet J, Annesi-Maesano I, Carat F, Léger D, Rugina M, Pribil C, El Hasnaoui A, Chanal I, Characteristics of intermittent and persistent allergic rhinitis: DREAMS study group. *Clin Exp Allergy* 2005;35: 728-32.
18. Kindt T GR, Osborne B., Immunologie, Le cours de Janis Kuby. 6e Edn: Dunod, 2008.
19. Milgrom E UR, Tan R, Spector S, Allergie en pratique: Elsevier, 2004.
20. Kopp M, Omalizumab: Anti-IgE Therapy in Allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11: 101-06.
21. Bousquet J, Bieber T, Fokkens W, Kowalski ML, Humbert M, Niggemann B, Simon HU, Rhinitis and asthma represent hot topics for Allergy. *Allergy* 2009;64: 1-4.
22. Noon L, Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* 1911;177: 1572-73.
23. Brozek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, van Wijk RG, Ohta K, Zuberbier T, Schünemann HJ, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126: 466-76.
24. Terracciano L CE, Avitabile S, Galli E, Age and indications to SLIT. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009;22: 5-8.
25. Reich K, Gessner C, Kroker A, Schwab JA, Pohl W, Villesen H, Wüstenberg E, Emminger W, Immunologic Effects and Tolerability Profile of In-Season Initiation of a Standardized-Quality Grass Allergy Immunotherapy Tablet: A Phase III, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Adults with Grass Pollen-Induced Rhinoconjunctivitis. *Clin Ther* 2011;33: 828-40.
26. Dutau G SP, Immunothérapie spécifique: John Libbey EUROTEXT, 2004.
27. Wilson DR, Torres Lima M, Durham SR, Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis*. *Allergy* 2005;60: 4-12.
28. Compalati E, Passalacqua G, Bonini M, Canonica GW, The efficacy of sublingual immunotherapy for house dust mites respiratory allergy: results of a GA²LEN meta-analysis. *Allergy* 2009;64: 1570-79.
29. Di Bona D, Plaia A, Scafidi V, Leto-Barone MS, Di Lorenzo G, Efficacy of sublingual immunotherapy with grass allergens for seasonal allergic rhinitis: A systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126: 558-66.
30. Penagos M, Compalati E, Tarantini F, Baena-Cagnani R, Huerta J, Passalacqua G, Canonica GW, Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2006;97: 141-48.
31. Radulovic S, Wilson D, Calderon M, Durham S, Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy* 2011;66: 740-52.

32. Calamita Z, Saconato H, Pelá AB, Atallah ÁN, Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. *Allergy* 2006;61: 1162-72.
33. Penagos M, Passalacqua G, Compalati E, Baena-Cagnani CE, Orozco S, Pedroza A, Canonica GW, Metaanalysis of the Efficacy of Sublingual Immunotherapy in the Treatment of Allergic Asthma in Pediatric Patients, 3 to 18 Years of Age*. *Chest* 2008;133: 599-609.
34. Cadario G, Galluccio AG, Pezza M, Appino A, Milani M, Pecora S, Mastrandrea F, Sublingual immunotherapy efficacy in patients with atopic dermatitis and house dust mites sensitivity: a prospective pilot study. *Current Medical Research and Opinion* 2007;23: 2503-06.
35. Pajno GB, Caminiti L, Vita D, Barberio G, Salzano G, Lombardo F, Canonica GW, Passalacqua G, Sublingual immunotherapy in mite-sensitized children with atopic dermatitis: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120: 164-70.
36. Larenas- Linneman D, Subcutaneous and sublingual immunotherapy in children: complete update on controversies, dosing, and efficacy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2008;8: 465-74.
37. Ciprandi G MG, Safety of sublingual immunotherapy. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011;25: 1-6.
38. www.industrie.gouv.fr, Reflexion prospective autour des biomarqueurs, 2009.
39. Tkaczyk C, Viguier M, Boutin Y, Frandji P, David B, Hébert J, Mécheri S, Specific antigen targeting to surface IgE and IgG on mouse bone marrow-derived mast cells enhances efficiency of antigen presentation. *Immunology* 1998;94: 318-24.
40. Tkaczyk, Villa, Peronet, David, Mécheri, FcεRI-mediated antigen endocytosis turns interferon-γ-treated mouse mast cells from inefficient into potent antigen-presenting cells. *Immunology* 1999;97: 333-40.
41. Graham HT LO, Wahl N, Priebe MK. Mast cells as sources of tissue histamine. *J Exp Med* 1955;102:307-18.
42. Orange RP SD, Austen KF. Immunochemical and biologic properties of rat IgE. II. Capacity to mediate the immunologic release of histamine and slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A). *J Immunol* 1970;105:1087-95.
43. Frandji P, Mourad W, Tkaczyk C, Singer M, David B, Colle J-H, Mécheri S, IL-4 mRNA transcription is induced in mouse bone marrow-derived mast cells through an MHC class II-dependent signaling pathway. *Eur J Immunol* 1998;28: 844-54.
44. Tkaczyk C, Villa I, Peronet R, David B, Chouaib S, Mécheri S, In vitro and in vivo immunostimulatory potential of bone marrow-derived mast cells on B- and T-lymphocyte activation. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105: 134-42.
45. Schroeder JT MDJ, Lichtenstein LM, Human basophils: mediator release and cytokine production. *Adv in Immunol* 2001;77: 93-122.
46. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R, A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 2008;9: 310-18.

47. Seder RA, Paul WE, Dvorak AM, Sharkis SJ, Kagey-Sobotka A, Niv Y, Finkelman FD, Barbieri SA, Galli SJ, Plaut M, Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88: 2835-39.
48. Piccinni MP, Macchia D, Parronchi P, Giudizi MG, Bani D, Alterini R, Grossi A, Ricci M, Maggi E, Romagnani S, Human bone marrow non-B, non-T cells produce interleukin 4 in response to cross-linkage of Fc epsilon and Fc gamma receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88: 8656-60.
49. Perrigoue JG, Saenz SA, Siracusa MC, Allenspach EJ, Taylor BC, Giacomini PR, Nair MG, Du Y, Zaph C, van Rooijen N, Comeau MR, Pearce EJ, Laufer TM, Artis D, MHC class II-dependent basophil-CD4⁺ T cell interactions promote TH2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* 2009;10: 697-705.
50. Yoshimoto T, Yasuda K, Tanaka H, Nakahira M, Imai Y, Fujimori Y, Nakanishi K, Basophils contribute to TH2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2009;10: 706-12.
51. Sokol CL, Chu N-Q, Yu S, Nish SA, Laufer TM, Medzhitov R, Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 2009;10: 713-20.
52. Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MAM, Kool M, Muskens F, Lambrecht BN, Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 2010;207: 2097-111.
53. van Rijt LS, Jung S, KleinJan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN, In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 2005;201: 981-91.
54. Karasuyama H, Obata K, Wada T, Tsujimura Y, Mukai K, Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy* 2011;66: 1133-41.
55. Mansmann JA. The study of the eosinophile in allergic states. *Am J Med Techn* 1946; 12:25-30.
56. Steinman RM CZ. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-62.
57. Allam J-P, Würtzen PA, Reinartz M, Winter J, Vrtala S, Chen K-W, Valenta R, Wenghoefer M, Appel T, Gros E, Niederhagen B, Bieber T, Lund K, Novak N, Phl p 5 resorption in human oral mucosa leads to dose-dependent and time-dependent allergen binding by oral mucosal Langerhans cells, attenuates their maturation, and enhances their migratory and TGF-β1 and IL-10-producing properties. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126: 638-45.e1.
58. Johansson SG BH, Wide L. A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology* 1968;14:265-272.
59. Gould HJ, Sutton BJ, IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 2008;8: 205-17.
60. Alarcón B, Mestre D, Martínez-Martín N, The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* 2011;133: 420-25.

61. Zygmunt B, Veldhoen M, Chapter 5 - T Helper Cell Differentiation: More than Just Cytokines. In: Frederick WA ed. *Advances in Immunology*: Academic Press, 2011:159-96.
62. M. M-P, Costimulatory pathways as a basic mechanisms of activating a tolerance signal in T cells. *Annals of Transplantation* 2004;9: 13-18.
63. Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M, Live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T-cell responses by CD154 expression. *Nat Protocols* 2006;1: 1-6.
64. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A, Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11: 1118-24.
65. Ferenczi K, Burack L, Pope M, Krueger JG, Austin LM, CD69, HLA-DR and the IL-2R Identify Persistently Activated T Cells in Psoriasis Vulgaris Lesional Skin: Blood and Skin Comparisons by Flow Cytometry. *J Autoimmun* 2000;14: 63-78.
66. Biselli R, Matricardi PM, Amelio RD, Fattorossi A, Multiparametric Flow Cytometric Analysis of the Kinetics of Surface Molecule Expression after Polyclonal Activation of Human Peripheral Blood T Lymphocytes. *Scand J Immunol* 1992;35: 439-47.
67. Romagnani S, Del Prete G, Maggi E, Chilosi M, Caligaris-Cappio F, Pizzolo G, CD30 and type 2 T helper (Th2) responses. *J Leukoc Biol* 1995;57: 726-30.
68. Wehler TC, Karg M, Distler E, Konur A, Nonn M, Meyer RG, Huber C, Hartwig UF, Herr W, Rapid identification and sorting of viable virus-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on antigen-triggered CD137 expression. *Journal of Immunological Methods* 2008;339: 23-37.
69. Nocentini G, Ronchetti S, Cuzzocrea S, Riccardi C, GITR/GITRL: More than an effector T cell co-stimulatory system. *Eur J Immunol* 2007;37: 1165-69.
70. Redmond WL RC, Weinberg AD, The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Critical Rev Immunol* 2009;29: 187-201.
71. Zaunders JJ, Munier ML, Seddiki N, Pett S, Ip S, Bailey M, Xu Y, Brown K, Dyer WB, Kim M, de Rose R, Kent SJ, Jiang L, Breit SN, Emery S, Cunningham AL, Cooper DA, Kelleher AD, High Levels of Human Antigen-Specific CD4⁺ T Cells in Peripheral Blood Revealed by Stimulated Coexpression of CD25 and CD134 (OX40). *J Immunol* 2009;183: 2827-36.
72. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Höpner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Röttschke O, Falk K, Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007;110: 1225-32.
73. Dwyer KM DS, Gao W, Friedman D, Strom TB, Robson SC., CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signaling* 2007;3: 171-80.
74. Testi R, Phillips J, Lanier L, T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 1989;143: 1123-28.
75. Beier K, Hutloff A, Dittrich A, Heuck C, Rauch A, Büchner K, Ludewig B, Ochs H, Mages H, Kroczeck R, Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol* 2000;30: 3707-17.
76. Pardoll DM, Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002;2: 227-38.

77. Lombardi V, Singh AK, Akbari O, The Role of Costimulatory Molecules in Allergic Disease and Asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151: 179-89.
78. Mosmann T, Cherwinski H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-57.
79. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.
80. Oboki K OT, Saito H, Nakae S, Th17 and allergy. *Allergology International* 2008;75: 121-34.
81. Noelle RJ, Nowak EC, Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol* 2010;10: 683-87.
82. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, Ramon M, Bergman R, Krueger JG, Guttman-Yassky E, IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123: 1244-52.e2.
83. Xing J, Wu Y, Ni B, Th9: A New Player in Asthma Pathogenesis? *J Asthma* 2011;48: 115-25.
84. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC, IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Current Opinion in Immunology* 2010;22: 821-26.
85. Jutel M, Akdis C, T-cell Subset Regulation in Atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011;11: 139-45.
86. Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA, TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120: 247-54.
87. Ciprandi G, Filaci G, Battaglia F, Fenoglio D, Peripheral Th-17 cells in allergic rhinitis: New evidence. *Int Immunopharmacol* 2010;10: 226-29.
88. Ciprandi G CA, Fenoglio D, Battaglia F, Marseglia G., Peripheral TH-17 cells in children with allergic rhinitis: preliminary report. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010 23: 379-82.
89. Zhu J, Paul WE, Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* 2009;20: 4-12.
90. Roncarolo Grazia GM, Battaglia Silvia, Bacchetta Manuela, Fleischhauer Rosa, Levings Katharina, Megan K., Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212: 28-50.
91. Noelle RJ, Nowak EC, Cellular sources and immune functions of interleukin-9. *Nat Rev Immunol* 2010;10: 683-87.
92. Sallusto F, Lanzavecchia A, Heterogeneity of CD4+ memory T cells: Functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 2009;39: 2076-82.
93. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, Durham SR, Schmidt-Weber CB, Cavani A, Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *The J Clin Invest* 2009;119: 3573-85.

94. Crotty S, Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Ann Rev Immunol* 2011;29: 621-63.
95. Annunziato F, Romagnani S, Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Research & Therapy* 2009;11: 257.
96. Murphy KM, Stockinger B, Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010;11: 674-80.
97. Weiner HL, Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001;182: 207-14.
98. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H, Oral tolerance. *Immunol Rev* 2011;241: 241-59.
90. Zhu J, Paul WE, CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112: 1557-69.
100. Zhu J, Paul WE, Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev* 2010;238: 247-62.
101. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA, FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10: 490-500.
102. Pepper M, Jenkins MK, Origins of CD4+ effector and central memory T cells. *Nat Immunol* 2011;12: 467-71.
103. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A, Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401: 708-12.
104. Appay V, van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M, Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cyt Part A* 2008;73A: 975-83.
105. Crack LR, Chan HW, McPherson T, Ogg GS, Phenotypic analysis of perennial airborne allergen-specific CD4+ T cells in atopic and non-atopic individuals. *Clin Exp Allergy* 2011: no-no.
106. Pearlman DS, Pathophysiology of the inflammatory response. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: s132-s37.
107. Venge P, Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* 2004;59: 26-32.
108. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA, Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010;40: 1232-40.
109. Barnes PJ, Pathophysiology of allergic inflammation. *Immunol Rev* 2011;242: 31-50.
110. Scott-Taylor TH, Hourihane JB, Harper J, Strobel S, Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy* 2005;35: 1473-80.
111. Tsuge I, Kondo Y, Tokuda R, Kakami M, Kawamura M, Nakajima Y, Komatsubara R, Yamada K, Urisu A, Allergen-specific helper T cell response in patients with cow's milk allergy: simultaneous analysis of proliferation and cytokine production by carboxyfluorescein succinimidyl ester dilution assay. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 1538-45.

112. Lindstedt M, Schiödt Å, Bengtsson A, Larsson K, Korsgren M, Greiff L, Borrebaeck CAK, Genomic and functional delineation of dendritic cells and memory T cells derived from grass pollen-allergic patients and healthy individuals. *Int Immunol* 2005;17: 401-09.
113. Hammad H, Charbonnier A-S, Duez C, Jacquet A, Stewart GA, Tonnel A-B, Pestel J, Th2 polarization by Der p 1–pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 2001;98: 1135-41.
114. Campbell JD, Stinson MJ, Simons FER, HayGlass KT, Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus non-allergic humans. *Int Immunol* 2002;14: 1255-62.
115. Chaudhary N, Staab JF, Marr KA, Healthy Human T-Cell Responses to *Aspergillus fumigatus* Antigens. *PLoS ONE* 2010;5: e9036.
116. Banwell ME, Robinson DS, Lloyd CM, Adenoid-derived TH2 cells reactive to allergen and recall antigen express CC chemokine receptor 4. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 1155-61.
117. Turcanu V, Maleki SJ, Lack G, Characterization of lymphocyte responses to peanuts in normal children, peanut-allergic children, and allergic children who acquired tolerance to peanuts. *The J Clin Invest* 2003;111: 1065-72.
118. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, Karamloo F, Karagiannidis C, Cramer R, Thunberg S, Deniz G, Valenta R, Fiebig H, Kegel C, Disch R, Schmidt-Weber CB, Blaser K, Akdis CA, Immune Responses in Healthy and Allergic Individuals Are Characterized by a Fine Balance between Allergen-specific T Regulatory 1 and T Helper 2 Cells. *J Exp Med* 2004;199: 1567-75.
119. Parviainen S, Taivainen A, Liukko A, Nieminen A, Rytönen-Nissinen M, Kinnunen T, Virtanen T, Comparison of the allergic and nonallergic CD4+ T-cell responses to the major dog allergen Can f 1. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126: 406-08.e4.
120. Bateman EAL, Ardern-Jones MR, Ogg GS, Persistent central memory phenotype of circulating Fel d 1 peptide/DRB1*0101 tetramer-binding CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118: 1350-56.
121. DeLong JH, Simpson KH, Wambre E, James EA, Robinson D, Kwok WW, Ara h 1-reactive T cells in individuals with peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 1211-18.e3.
122. Kinnunen T, Nieminen A, Kwok WW, Närvänen A, Rytönen-Nissinen M, Saarelainen S, Taivainen A, Virtanen T, Allergen-specific naïve and memory CD4+ T cells exhibit functional and phenotypic differences between individuals with or without allergy. *Eur J Immunol* 2010;40: 2460-69.
123. Kwok WW, Roti M, DeLong JH, Tan V, Wambre E, James EA, Robinson D, Direct ex vivo analysis of allergen-specific CD4+ T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125: 1407-09.e1.
124. Macaubas C, Wahlstrom J, Galvao da Silva AP, Forsthuber TG, Sonderstrup G, Kwok WW, DeKruyff RH, Umetsu DT, Allergen-Specific MHC Class II Tetramer+ Cells Are Detectable in Allergic, but Not in Nonallergic, Individuals. *J Immunol* 2006;176: 5069-77.
125. Van Overtvelt L, Wambre E, Maillere B, von Hofe E, Louise A, Balazuc AM, Bohle B, Ebo D, Leboulaire C, Garcia G, Moingeon P, Assessment of Bet v 1-Specific CD4+ T Cell Responses in Allergic and Nonallergic Individuals Using MHC Class II Peptide Tetramers. *J Immunol* 2008;180: 4514-22.

126. Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G, Tosca M, Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 2009;64: 1375-78.
127. Ciprandi G, Fenoglio D, De Amici M, Quaglini S, Negrini S, Filaci G, Serum IL-17 levels in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122: 650-51.e2.
128. Cosmi L, Maggi E, Santarlasci V, Capone M, Cardilicchia E, Frosali F, Querci V, Angeli R, Matucci A, Fambrini M, Liotta F, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F, Identification of a novel subset of human circulating memory CD4⁺ T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125: 222-30.e4.
129. Assing K, Nielsen CH, Poulsen LK, Immunological characteristics of subjects with asymptomatic skin sensitization to birch and grass pollen. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 283-92.
130. Garfias Y, Ortiz B, Hernández J, Magaña D, Becerril-Angeles M, Zenteno E, Lascurain R, CD4⁺CD30⁺ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronyssinus allergic patients. *Allergy* 2006;61: 27-34.
131. Chang Y, de Nadai P, Azzaoui I, Morales O, Delhem N, Vorng H, Tomavo S, Ait Yahia S, Zhang G, Wallaert B, Chenivresse C, Tscopoulos A, The chemokine CCL18 generates adaptive regulatory T cells from memory CD4⁺ T cells of healthy but not allergic subjects. *The FASEB Journal* 2010;24: 5063-72.
132. Mittag D, Scholzen A, Varese N, Baxter L, Paukovics G, Harrison LC, Rolland JM, O'Hehir RE, The Effector T Cell Response to Ryegrass Pollen Is Counterregulated by Simultaneous Induction of Regulatory T Cells. *J Immunol* 2010;184: 4708-16.
133. Bellinghausen I, König B, Böttcher I, Knop J, Saloga J, Regulatory activity of human CD4⁺ CD25⁺ T cells depends on allergen concentration, type of allergen and atopy status of the donor. *Immunology* 2005;116: 103-11.
134. Lin YL, Shieh CC, Wang JY, The functional insufficiency of human CD4⁺CD25^{high} T-regulatory cells in allergic asthma is subjected to TNF- α modulation. *Allergy* 2008;63: 67-74.
135. Thunberg S, Akdis M, Akdis CA, Grönneberg R, Malmström V, Trollmo C, Van Hage M, Gafvelin G, Immune regulation by CD4⁺CD25⁺ T cells and interleukin-10 in birch pollen-allergic patients and non-allergic controls. *Clin Exp Allergy* 2007;37: 1127-36.
136. Thunberg S, Gafvelin G, Nord M, Grönneberg R, Grunewald J, Eklund A, Van Hage M, Allergen provocation increases TH2-cytokines and FOXP3 expression in the asthmatic lung. *Allergy* 2010;65: 311-18.
137. Domdey A, Liu A, Millner A, Lund K, Jacobi H, Malling HJ, Søndergaard I, Würtzen PA, The T Cell Response to Major Grass Allergens Is Regulated and Includes IL-10 Production in Atopic but Not in Non-Atopic Subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;152: 243-54.
138. Han D, Wang C, Lou W, Gu Y, Wang Y, Zhang L, Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis. *Clin Immunol* 2010;136: 292-301.
139. Jutel M, Akdis M, Budak F, Aebischer-Casaulta C, Wrzyszc M, Blaser K, Akdis CA, IL-10 and TGF- β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J Immunol* 2003;33: 1205-14.

140. Xu YQ GY, Yang J, Guo W., A defect of CD4+CD25+ regulatory T cells in inducing interleukin-10 production from CD4+ T cells under CD46 costimulation in asthma patients. *J Asthma* 2010 47: 367-73.
141. Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Frosali F, Angeli R, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F, Demonstration of circulating allergen-specific CD4+CD25highFoxp3+ T-regulatory cells in both nonatopic and atopic individuals. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120: 429-36.
142. Skrindo I, Farkas L, Kvale EO, Johansen FE, Jahnsen FL, Depletion of CD4+CD25+CD127lo regulatory T cells does not increase allergen-driven T cell activation. *Clin Exp Allergy* 2008;38: 1752-59.
143. Wambre E, DeLong JH, James EA, LaFond RE, Robinson D, Kwok WW, Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T-cell outcomes during specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*.
144. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K, Pircher H, Ohashi CT, Odermatt B, Malissen B, Zinkernagel RM, Hengartner H, Ablation of tolerance and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 1991;65: 305-17.
145. Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H, Break of T Cell Ignorance to a Viral Antigen in the Liver Induces Hepatitis. *J Immunol* 2000;165: 2415-22.
146. Huber V, Benkhoucha M, Huard B, Evidence for a Repertoire of Functional Untolerized CD4+ T Cells Specific for Melanoma-Associated Antigens. *Scand J Immunol* 2011;74: 80-86.
147. Schwartz RH, T CELL ANERGY*. *Ann Rev Immunol* 2003;21: 305-34.
148. Fathman CG, Lineberry NB, Molecular mechanisms of CD4+ T-cell anergy. *Nat Rev Immunol* 2007;7: 599-609.
149. Falb D, Briner TJ, Sunshine GH, Bourque CR, Luqman M, Geftter ML, Kamradt T, Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: Evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996;26: 130-35.
150. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA, Indoleamine 2,3-Dioxygenase Production by Human Dendritic Cells Results in the Inhibition of T Cell Proliferation. *J Immunol* 2000;164: 3596-99.
151. Ahlers JD, Belyakov IM, Molecular pathways regulating CD4+ T cell differentiation, anergy and memory with implications for vaccines. *Trends in Molecular Medicine* 2010;16: 478-91.
152. Yi JS, Cox MA, Zajac AJ, T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology* 2010;129: 474-81.
153. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM, Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 1993;362: 758-61.
154. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S, Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105: 10113-18.
155. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ, How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008;8: 523-32.

156. Scheffold A, Murphy KM, Hofer T, Competition for cytokines: Treg cells take all. *Nat Immunol* 2007;8: 1285-87.
157. Thornton AM, Shevach EM, CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med* 1998;188: 287-96.
158. Bynoe MS, Viret C, Foxp3+CD4+ T cell-mediated immunosuppression involves extracellular nucleotide catabolism. *Trends Immunol* 2008;29: 99-102.
159. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, Omedé P, Scatolini M, Jaksic O, Chiorino G, Efremov D, Malavasi F, CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007;110: 4012-21.
160. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR, T Regulatory and Primed Uncommitted CD4 T Cells Express CD73, Which Suppresses Effector CD4 T Cells by Converting 5'-Adenosine Monophosphate to Adenosine. *J Immunol* 2006;177: 6780-86.
161. M O, Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2007;66: iii87-iii90.
162. Zarek PE, Huang C-T, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, Drake CG, Powell JD, A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008;111: 251-59.
163. Antúnez C, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Torres MJ, Two year follow-up of immunological response in mite-allergic children treated with sublingual immunotherapy. Comparison with subcutaneous administration. *Pediatric Allergy and Immunology* 2008;19: 210-18.
164. Shamji MH, Durham SR, Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin Exp Allergy* 2011: in Press.
165. Eberlein-König B, Ullmann S, Thomas P, Przybilla B, Tryptase and histamine release due to a sting challenge in bee venom allergic patients treated successfully or unsuccessfully with hyposensitization *. *Clin Exp Allergy* 1995;25: 704-12.
166. Jutel M, Müller UR, Erlicker M, Rihs S, Pichler WJ, Dahinden C, Influence of bee venom immunotherapy on degranulation and leukotriene generation in human blood basophils. *Clin Exp Allergy* 1996;26: 1112-18.
167. Plewako H, Wosińska K, Arvidsson M, Björkander J, Skov PS, Håkansson L, Rak S, Basophil Interleukin 4 and Interleukin 13 Production Is Suppressed during the Early Phase of Rush Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;141: 346-53.
168. Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y, Inhibition of mast cells by interleukin-10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats. *Eur J Immunol* 2004;34: 3508-15.
169. Akdis CA, Akdis M, Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 18-27.
170. Gri G, Piconese S, Frossi B, Manfroi V, Merluzzi S, Tripodo C, Viola A, Odom S, Rivera J, Colombo MP, Pucillo CE, CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Mast Cell Degranulation and Allergic Responses through OX40-OX40L Interaction. *Immunity* 2008;29: 771-81.

171. Håkansson L, Heinrich C, Rak S, Venge P, Priming of eosinophil adhesion in patients with birch pollen allergy during pollen season: Effect of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99: 551-62.
172. Jutel M, Akdis CA, Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Allergy* 2011;66: 725-32.
173. Rak S HL, Venge P, Immunotherapy abrogates the generation of eosinophil and neutrophil chemotactic activity during pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86: 706-13.
174. Moingeon P, Batard T, Fadel R, Frati F, Sieber J, Van Overtvelt L, Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 2006;61: 151-65.
175. Scadding G, Durham S, Mechanisms of Sublingual Immunotherapy. *J Asthma* 2009;46: 322-34.
176. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, Canonica GW, Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998;351: 629-32.
177. Passalacqua G, Albano M, Riccio A, Fregonese L, Puccinelli P, Parmiani S, Canonica GW, Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to *Parietaria* species: A double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104: 964-68.
178. Van Overtvelt L B-BV, Horiot S, Moussu H, Ricarte C, Horak F, Ziegelmayer P, Ziegelmayer R, Montagut A, Galvain S, de Beaumont O, Le Gall M, Moingeon P, Changes in basophil activation during grass pollen sublingual immunotherapy do not correlate with clinical efficacy. *Allergy* 2011; in Press.
179. Tversky JR, Bieneman AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT, Subcutaneous allergen immunotherapy restores human dendritic cell innate immune function. *Clin Exp Allergy* 2010;40: 94-102.
180. Dreschler K, Bratke K, Petermann S, Bier A, Thamm P, Kuepper M, Virchow JC, Lommatzsch M, Impact of immunotherapy on blood dendritic cells in patients with Hymenoptera venom allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 487-94.e3.
181. Angelini F, Pacciani V, Corrente S, Silenzi R, Di Pede A, Polito A, Riccardi C, Di Cesare S, Yammine M, Rossi P, Moschese V, Chini L, Dendritic cells modification during sublingual immunotherapy in children with allergic symptoms to house dust mites. *World J Pediatr* 2011;7: 24-30.
182. Allam JP, Niederhagen B, Bücheler M, Appel T, Betten H, Bieber T, Bergé S, Novak N, Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 2006;61: 166-72.
183. Allam J-P, Novak N, Fuchs C, Asen S, Bergé S, Appel T, Geiger E, Kochan JP, Bieber T, Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: A new Langerhans' cell type with high constitutive FcεRI expression. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 141-48.
184. Novak EJ, Masewicz SA, Liu AW, Lernmark A, Kwok WW, Nepom GT, Activated human epitope-specific T cells identified by class II tetramers reside within a CD4^{high}, proliferating subset. *Int Immunol* 2001;13: 799-806.
185. Von Bubnoff D, Fimmers R, Bogdanow M, Matz H, Koch S, Bieber T, Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin Exp Allergy* 2004;34: 1056-63.

186. Tabar AI, Echechipía S, García BE, Olaguibel JM, Lizaso MT, Gómez B, Aldunate MT, Martin S, Marcotegui F, Double-blind comparative study of cluster and conventional immunotherapy schedules with *Dermatophagoides pteronyssinus*. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 109-18.
187. Bousquet J, Lockey R, Malling H-J, Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102: 558-62.
188. Lichtenstein LM IK, Norman PS, Sobotka AK, Hill BM, IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy. *J Clin Invest* 1973;52: 472-82.
189. Van Ree R, Van Leeuwen WA, Dieges PH, Van Wuk RG, De Jong N, Brewczynski PZ, Kroon AM, Schilte PPM, Tan KY, Simon-Licht IF, Roberts AM, Stapel SO, Aalberse RC, Measurement of IgE antibodies against purified grass pollen allergens (Lol p 1, 2, 3 and 5) during immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1997;27: 68-74.
190. Francis JN, James LK, Paraskevopoulos G, Wong C, Calderon MA, Durham SR, Till SJ, Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121: 1120-25.e2.
191. Aberer W HT, Reider N, Schuster C, Sturm G, Kränke B., Immunoglobulin E and G Antibody Profiles to Grass Pollen Allergens During a Short Course of Sublingual Immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2007;17: 131-36.
192. Bufe A, Eberle P, Franke-Beckmann E, Funck J, Kimmig M, Klimek L, Knecht R, Stephan V, Tholstrup B, Weißhaar C, Kaiser F, Safety and efficacy in children of an SQ-standardized grass allergen tablet for sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123: 167-73.e7.
193. Ciprandi G, Sormani MP, Filaci G, Fenoglio D, Carry-over effect on IFN-gamma production induced by allergen-specific immunotherapy. *Int Immunopharmacol* 2008;8: 1622-25.
194. Fernández-Rivas M, Garrido Fernández S, Nadal JA, Alonso Díaz de Durana MD, García BE, González-Mancebo E, Martín S, Barber D, Rico P, Tabar AI, Randomized double-blind, placebo-controlled trial of sublingual immunotherapy with a Pru p 3 quantified peach extract. *Allergy* 2009;64: 876-83.
195. Horak F, Zieglmayer P, Zieglmayer R, Lemell P, Devillier P, Montagut A, Mélaç M, Galvain S, Jean-Alphonse S, Van Overtvelt L, Moingeon P, Le Gall M, Early onset of action of a 5-grass-pollen 300-IR sublingual immunotherapy tablet evaluated in an allergen challenge chamber. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124: 471-77.e1.
196. Panizo C CM, González-Mancebo E, Vega A, Senent C, Martín S., In vivo and in vitro immunological changes induced by a short course of grass allergy immunotherapy tablets. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2010;20: 454-62.
197. Panzner P, Petráš M, Sýkora T, Lesná I, Double-blind, placebo-controlled evaluation of grass pollen specific immunotherapy with oral drops administered sublingually or supralingually. *Respiratory medicine* 2008;102: 1296-304.
198. Troise C VS, Canessa A, Pecora S, Negrini AC., Sublingual immunotherapy in *Parietaria* pollen-induced rhinitis: a double-blind study. *J Invest Allergol Clin Immunol* 1995;5: 25-30.
199. Calderon MA, Birk AO, Andersen JS, Durham SR, Prolonged preseasonal treatment phase with Grazax sublingual immunotherapy increases clinical efficacy. *Allergy* 2007;62: 958-61.

200. Durham SR, Riis B, Grass allergen tablet immunotherapy relieves individual seasonal eye and nasal symptoms, including nasal blockage. *Allergy* 2007;62: 954-57.
201. Frew AJ, Powell RJ, Corrigan CJ, Durham SR, Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117: 319-25.
202. Cantani A MM, Significant decrease of IgE antibodies after a three-year controlled study of specific immunotherapy to pollen allergens in children with allergic asthma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2005;9: 103-11.
203. Lent AM, Harbeck R, Strand M, Sills M, Schmidt K, Efaw B, Lebo T, Nelson HS, Immunologic response to administration of standardized dog allergen extract at differing doses. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118: 1249-56.
304. Lizaso MT MA, Asturias JA, Algorta J, Madariaga B, Labarta N, Tabar AI, Biological standardization and maximum tolerated dose estimation of an *Alternaria alternata* allergenic extract. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2006;16: 94-103.
205. Möbs C, Slotosch C, Löffler H, Jakob T, Hertl M, Pfützner W, Birch Pollen Immunotherapy Leads to Differential Induction of Regulatory T Cells and Delayed Helper T Cell Immune Deviation. *J Immunol* 2010;184: 2194-203.
206. Pauli G, Larsen TH, Rak S, Horak F, Pastorello E, Valenta R, Purohit A, Arvidsson M, Kavina A, Schroeder JW, Mothes N, Spitzauer S, Montagut A, Galvain S, Melac M, André C, Poulsen LK, Malling H-J, Efficacy of recombinant birch pollen vaccine for the treatment of birch-allergic rhinoconjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122: 951-60.
207. Srivastava D, Singh BP, Sudha VT, Arora N, Gaur SN, Immunotherapy with mosquito (*Culex quinquefasciatus*) extract: a double-blind, placebo-controlled study. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2007;99: 273-80.
208. Varga EM, Francis JN, Zach MS, Klunker S, Aberer W, Durham SR, Time course of serum inhibitory activity for facilitated allergen-IgE binding during bee venom immunotherapy in children. *Clin Exp Allergy* 2009;39: 1353-57.
209. Gehlhar, Schlaak, Becker, Bufe, Monitoring allergen immunotherapy of pollen-allergic patients: the ratio of allergen-specific IgG4 to IgG1 correlates with clinical outcome. *Clin Exp Allergy* 1999;29: 497-506.
210. Movérare R, Elfman L, Vesterinen E, Metso T, Haahtela T, Development of new IgE specificities to allergenic components in birch pollen extract during specific immunotherapy studied with immunoblotting and Pharmacia CAP System™. *Allergy* 2002;57: 423-30.
211. Movérare R, Vesterinen E, Metso T, Sorva R, Elfman L, Haahtela T, Pollen-specific rush immunotherapy: clinical efficacy and effects on antibody concentrations. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2001;86: 337-42.
212. Agresti A, Vercelli D, Analysis of $\gamma 4$ Germline Transcription in Human B Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;118: 279-81.
213. Meiler F, Klunker S, Zimmermann M, Akdis CA, Akdis M, Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008;63: 1455-63.

214. Würtzen PA, Lund G, Lund K, Arvidsson M, Rak S, Ipsen H, A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin Exp Allergy* 2008;38: 1290-301.
215. Mothes N, Heinzkill M, Drachenberg KJ, Sperr WR, Krauth MT, Majlesi Y, Semper H, Valent P, Niederberger V, Kraft D, Valenta R, Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies. *Clin Exp Allergy* 2003;33: 1198-208.
216. Ejrnaes AM, Svenson M, Lund G, Larsen JN, Jacobi H, Inhibition of rBet v 1-induced basophil histamine release with specific immunotherapy -induced serum immunoglobulin G: no evidence that FcγRIIB signalling is important. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 273-82.
217. James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Kimber I, Till SJ, Durham SR, Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 509-16.e5.
218. Wachholz PA, Kristensen Soni N, Till SJ, Durham SR, Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112: 915-22.
219. van Neerven RJJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen Å, Arned J, Ipsen H, Blocking Antibodies Induced by Specific Allergy Vaccination Prevent the Activation of CD4+ T Cells by Inhibiting Serum-IgE-Facilitated Allergen Presentation. *J Immunol* 1999;163: 2944-52.
220. Scadding GW, Shamji MH, Jacobson MR, Lee DI, Wilson D, Lima MT, Pitkin L, Pilette C, Nouri-Aria K, Durham SR, Sublingual grass pollen immunotherapy is associated with increases in sublingual Foxp3-expressing cells and elevated allergen-specific immunoglobulin G4, immunoglobulin A and serum inhibitory activity for immunoglobulin E-facilitated allergen binding to B cells. *Clin Exp Allergy* 2010;40: 598-606.
221. Pilette C, Nouri-Aria KT, Jacobson MR, Wilcock LK, Detry B, Walker SM, Francis JN, Durham SR, Grass Pollen Immunotherapy Induces an Allergen-Specific IgA2 Antibody Response Associated with Mucosal TGF-β Expression. *J Immunol* 2007;178: 4658-66.
222. Bohle B, Kinaciyan T, Gerstmayr M, Radakovics A, Jahn-Schmid B, Ebner C, Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120: 707-13.
223. Savolainen J, Jacobsen L, Valovirta E, Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy* 2006;61: 1184-90.
224. O'Hehir RE, Gardner LM, de Leon MP, Hales BJ, Biondo M, Douglass JA, Rolland JM, Sandrini A, House Dust Mite Sublingual Immunotherapy: The Role for Transforming Growth Factor-β and Functional Regulatory T Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180: 936-47.
225. Francis JN, Till SJ, Durham SR, Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: 1255-61.
226. Aslam A, Chan H, Warrell DA, Misbah S, Ogg GS, Tracking Antigen-Specific T-Cells during Clinical Tolerance Induction in Humans. *PLoS ONE* 2010;5: e11028.

227. Kim H-B, Jin H-S, Lee S-Y, Kim J-H, Kim B-S, Park SJ, Hong S-J, The Effect of Rush Immunotherapy with House Dust Mite in the Production of IL-5 and IFN- γ from the Peripheral Blood T Cells of Asthmatic Children. *J Korean Med Sci* 2009;24: 392-97.
228. Gardner LM, Thien FC, Douglass JA, Rolland JM, O'Hehir RE, Induction of T 'regulatory' cells by standardized house dust mite immunotherapy: an increase in CD4+CD25+ interleukin-10+ T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. *Clin Exp Allergy* 2004;34: 1209-19.
229. Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R, Liotta F, Maggi L, Frosali F, Rossi O, Falagiani P, Riva G, Romagnani S, Annunziato F, Maggi E, Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon- γ - and interleukin-10-production. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 261-72.
230. Fujimura T, Yonekura S, Taniguchi Y, Horiguchi S, Saito A, Yasueda H, Nakayama T, Takemori T, Taniguchi M, Sakaguchi M, Okamoto Y, The Induced Regulatory T Cell Level, Defined as the Proportion of IL-10+ Foxp3+ Cells among CD25+ CD4+ Leukocytes, Is a Potential Therapeutic Biomarker for Sublingual Immunotherapy: A Preliminary Report. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;153: 378-87.
231. Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, Frati F, Iemoli E, Clerici M, Immunological Effects of Sublingual Immunotherapy: Clinical Efficacy Is Associated with Modulation of Programmed Cell Death Ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol* 2010;185: 7723-30.
232. Yamanaka K YA, Kakeda M, Kitagawa H, Ogihara H, Gabazza EC, Okubo K, Kurokawa I, Takeuchi K, Mizutani H, SLIT improves cedar pollinosis by restoring IL-10 production from Tr1 and Monocytes-IL-10 productivity is critical for becoming allergic-. *Allergology International* 2011;60: 45-61.
233. Fanta C BB, Hirt W, Siemann U, Horak F, Kraft D, Ebner H, Ebner C, Systemic Immunological Changes Induced by Administration of Grass Pollen Allergens via the Oral Mucosa during Sublingual Immunotherapy. *international Archives of Allergy and Immunology* 1999;120: 218-24.
234. Jutel M, Pichler W, Skrbic D, Urwyler A, Dahinden C, Muller U, Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures. *J Immunol* 1995;154: 4187-94.
235. Ajduk J, Marinic I, Aberle N, Rabatic S, Gagro A, Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor β 1-producing T cells in asthmatic children. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 2008;100: 314-22.
236. Dehlink E, Eiwegger T, Gerstmayr M, Kampl E, Bohle B, Chen KW, Vrtala S, Urbanek R, Szépfalusi Z, Absence of systemic immunologic changes during dose build-up phase and early maintenance period in effective specific sublingual immunotherapy in children. *Clin Exp Allergy* 2006;36: 32-39.
237. Ippoliti F, De Santis W, Volterrani A, Lenti L, Canitano N, Lucarelli S, Frediani T, Immunomodulation during sublingual therapy in allergic children. *Pediatric Allergy and Immunology* 2003;14: 216-21.
238. Nieminen K, Laaksonen K, Savolainen J, Three-Year Follow-Up Study of Allergen-Induced in vitro Cytokine and Signalling Lymphocytic Activation Molecule mRNA Responses in

- Peripheral Blood Mononuclear Cells of Allergic Rhinitis Patients Undergoing Specific Immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;150: 370-76.
239. Rolinck-Werninghaus C KM, Liebke C, Lange J, Wahn U, Niggemann B, Lack of detectable alterations in immune responses during sublingual immunotherapy in children with seasonal allergic rhinoconjunctivitis to grass pollen. *International Archives of Allergy and Immunology* 2005;136(2):134-41: 134-41.
 240. Smith TRF, Alexander C, Kay AB, Larché M, Robinson DS, Cat allergen peptide immunotherapy reduces CD4+ T cell responses to cat allergen but does not alter suppression by CD4+ CD25+ T cells: a double-blind placebo-controlled study. *Allergy* 2004;59: 1097-101.
 241. Nieminen K, Valovirta E, Savolainen J, Clinical outcome and IL-17, IL-23, IL-27 and FOXP3 expression in peripheral blood mononuclear cells of pollen-allergic children during sublingual immunotherapy. *Pediatric Allergy and Immunology* 2010;21: e174-e84.
 242. Wachholz PA, Nouri-Aria KT, Wilson DR, Walker SM, Verhoef A, Till SJ, Durham SR, Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology* 2002;105: 56-62.
 243. Kosnik M WB, Shift from Th2 to Th1 response in immunotherapy with venoms. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2000;440: R70-71.
 244. Movérare R, Elfman L, Björnsson E, Stålenheim G, Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy. *Immunology Letters* 2000;73: 51-56.
 245. Till S, Walker S, Dickason R, Huston D, O'Brien F, Lamb J, Kay AB, Corrigan C, Durham S, IL-5 production by allergen-stimulated T cells following grass pollen immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Immunology* 1997;110: 114-21.
 246. Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K, Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *The J Clin Invest* 1998;102: 98-106.
 247. Müller U, Akdis CA, Fricker M, Akdis M, Blesken T, Bettens F, Blaser K, Successful immunotherapy with T-cell epitope peptides of bee venom phospholipase A2 induces specific T-cell anergy in patients allergic to bee venom. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101: 747-54.
 248. Gardner LM, Spyroglou L, O'Hehir RE, Rolland JM, Increased allergen concentration enhances IFN- γ production by allergic donor T cells expressing a peripheral tissue trafficking phenotype. *Allergy* 2004;59: 1308-17.
 249. Klimek, Dormann, Jarman, Cromwell, Riechelmann, Reske K, Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses, in patients with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 1999;29: 1326-35.
 250. Guerra F, Carracedo J, Solana-Lara R, Sánchez-Guijo P, Ramírez R, TH2 lymphocytes from atopic patients treated with immunotherapy undergo rapid apoptosis after culture with specific allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 647-53.
 251. Tsai Y-G, Chien J-W, Chen W-L, Shieh J-J, Lin C-Y, Induced apoptosis of TH2 lymphocytes in asthmatic children treated with Dermatophagoides pteronyssinus immunotherapy. *Pediatric Allergy and Immunology* 2005;16: 602-08.

252. Wambre E DJ, James E, LaFond, R, Robinson D, Kwok WW Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4+ T cell outcomes during specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;in press.
253. Kerstan A, Albert C, Klein D, Bröcker E-B, Trautmann A, Wasp venom immunotherapy induces activation and homing of CD4+CD25+ forkhead box protein 3–positive regulatory T cells controlling TH1 responses. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127: 495-501.e6.
254. Ajduk J, Marinic I, Aberle N, Rabatic S, Gagro A, Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor β 1-producing T cells in asthmatic children. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2008;100: 314-22.
255. Wang W XL, Liu YG, Wang YH, Shen KL., Effect of house dust mite immunotherapy on interleukin-10-secreting regulatory T cells in asthmatic children. *Chinese Medical Journal*;123: 2099-104.
256. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi M, Biagiotti R, Romagnani S, Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150: 353-60.
257. McKinstry KK, Strutt TM, Buck A, Curtis JD, Dibble JP, Huston G, Tighe M, Hamada H, Sell S, Dutton RW, Swain SL, IL-10 Deficiency Unleashes an Influenza-Specific Th17 Response and Enhances Survival against High-Dose Challenge. *J Immunol* 2009;182: 7353-63.
258. Meiler F, Zumkehr J, Klunker S, Rückert B, Akdis CA, Akdis M, In vivo switch to IL-10–secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *J Exp Med* 2008;205: 2887-98.
259. Ciprandi G FD, Cirillo I, Vizzaccaro A, Ferrera A, Tosca MA, Puppo F. Ciprandi G, Fenoglio D, Cirillo I, Vizzaccaro A, Ferrera A, Tosca MA, Puppo F., Induction of interleukin 10 by sublingual immunotherapy for house dust mites: a preliminary report. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 2005;95: 38-44.
260. Verhoef A, Alexander C, Kay AB, Larché M, T Cell Epitope Immunotherapy Induces a CD4+ T Cell Population with Regulatory Activity. *PLoS Med* 2005;2: e78.
261. Incorvaia C FF, Puccinelli P, Marcucci F, Di Cara G, Sensi L, Scurati S, Yacoub MR, Moingeon P., Effects of sublingual immunotherapy on allergic inflammation. *inflammation and allergy drug targets* 2008;7: 167-72.
262. Durham SR, Ying S, Varney VA, Jacobson MR, Sudderick RM, Mackay IS, Kay AB, Hamid QA, Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon- γ . *J Allergy Clin Immunol* 1996;97: 1356-65.
263. Wilson DR, Nouri-Aria KT, Walker SM, Pajno GB, O'Brien F, Jacobson MR, Mackay IS, Durham SR, Grass pollen immunotherapy: Symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107: 971-76.
264. Nouri-Aria KT, Pilette C, Jacobson MR, Watanabe H, Durham SR, IL-9 and c-Kit+ mast cells in allergic rhinitis during seasonal allergen exposure: Effect of immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116: 73-79.

265. Gardner LM, O'Hehir RE, Rolland JM, High Dose Allergen Stimulation of T Cells from House Dust Mite-Allergic Subjects Induces Expansion of IFN- γ + T Cells, Apoptosis of CD4+IL-4+ T Cells and T Cell Anergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2004;133: 1-13.
266. Nasser SMS, Ying S, Meng Q, Kay AB, Ewan PW, Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy. *Eur J Immunol* 2001;31: 3704-13.
267. Radulovic S, Jacobson MR, Durham SR, Nouri-Aria KT, Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+CD25+ cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 2008;121: 1467-72.e1.
268. Fulwyler MJ, Status quo in flow-through cytometry. *J Histochem Cytochem* 1974;22: 605-06.
269. Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir E-aD, Krutzik PO, Finck R, Bruggner RV, Melamed R, Trejo A, Ornatsky OI, Balderas RS, Plevritis SK, Sachs K, Pe'er D, Tanner SD, Nolan GP, Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. *Science* 2011;332: 687-96.
270. Bandura DR, Baranov VI, Ornatsky OI, Antonov A, Kinach R, Lou X, Pavlov S, Vorobiev S, Dick JE, Tanner SD, Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2009;81: 6813-22.
271. Janes Matthew R RC, Next-generation flow cytometry. *Nature Biotechnology* 2011;29: 602–04.
272. Jung R, Soondrum K, Neumaier M, Quantitative PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2000;38: 833-36.
273. Ståhlberg A, Bengtsson M, Single-cell gene expression profiling using reverse transcription quantitative real-time PCR. *Methods* 2010;50: 282-88.
274. Barbier M, Laurier J-F, Seigneurin D, Ronot X, Boutonnat J, Modelling of cell proliferation: nuclear versus membrane labelling. *Comptes Rendus Biologies* 2002;325: 393-400.
275. Lyons AB, Divided we stand: Tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunology and Cell Biology* 1999;77: 509-15.
276. Wallace PK, Tario JD, Fisher JL, Wallace SS, Ernstoff MS, Muirhead KA, Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: Monitoring proliferation by dye dilution. *Cyt Part A* 2008;73A: 1019-34.
277. Engvall E PP, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8: 871-74.
278. Czerkinsky CC, Svennerholm AM, Ganglioside GM1 enzyme-linked immunospot assay for simple identification of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1983;17: 965-69.
279. Nomura L, Maino VC, Maecker HT, Standardization and optimization of multiparameter intracellular cytokine staining. *Cyt Part A* 2008;73A: 984-91.
280. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C, Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 1993;159: 197-207.

281. Desombere I, Meuleman P, Rigole H, Willems A, Irsch J, Leroux-Roels G, The interferon gamma secretion assay: a reliable tool to study interferon gamma production at the single cell level. *Journal of Immunological Methods* 2004;286: 167-85.
282. Jin A, Ozawa T, Tajiri K, Obata T, Kondo S, Kinoshita K, Kadowaki S, Takahashi K, Sugiyama T, Kishi H, Muraguchi A, A rapid and efficient single-cell manipulation method for screening antigen-specific antibody-secreting cells from human peripheral blood. *Natural Medicines* 2009;15: 1088-92.
283. Fan R, Vermesh O, Srivastava A, Yen BKH, Qin L, Ahmad H, Kwong GA, Liu C-C, Gould J, Hood L, Heath JR, Integrated barcode chips for rapid, multiplexed analysis of proteins in microliter quantities of blood. *Nat Biotech* 2008;26: 1373-78.
284. Moalic V, Mercier B, Ferec C, Technologie Luminex™: principe, applications, et perspectives. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2004;19: 181-87.
285. Valitutti S, Muller S, Cella M, Padovan E, Lanzavecchia A, Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide–MHC complexes. *Nature* 1995;375: 148-51.
286. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM, Phenotypic Analysis of Antigen-Specific T Lymphocytes. *Science* 1996;274: 94-96.
287. Crawford F, Kozono H, White J, Marrack P, Kappler J, Detection of Antigen-Specific T Cells with Multivalent Soluble Class II MHC Covalent Peptide Complexes. *Immunity* 1998;8: 675-82.
288. Mallone R, Nepom GT, MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol* 2004;110: 232-42.
289. Meyer Abbie L. TC, Crawford Frances , Marrack Philippa , Steere Allen C. , Huber Brigitte T. , Kappler John , Hafler David A. , Direct enumeration of Borrelia-reactive CD4 T cells ex vivo by using MHC class II tetramers *Proc Natl Acad Sci U S A. of the United States of America* 2000;97: 11433-38.
290. Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW, MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4+ T cells proliferating in response to influenza A antigen. *The J Clin Invest* 1999;104: R63-R67.
291. Ayyoub M, Dojcinovic D, Pignon P, Raimbaud I, Schmidt J, Luescher I, Valmori D, Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4+ T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107: 7437-42.
292. Wong R, Lau R, Chang J, Kuus-Reichel T, Brichard V, Bruck C, Weber J, Immune Responses to a Class II Helper Peptide Epitope in Patients with Stage III/IV Resected Melanoma. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5004-13.
293. Zhang Y, Renkvist N, Sun Z, Schuler-Thurner B, Glaichenhaus N, Schuler G, Boon T, van der Bruggen P, Colau D, A polyclonal anti-vaccine CD4 T cell response detected with HLA-DP4 multimers in a melanoma patient vaccinated with MAGE-3.DP4-peptide-pulsed dendritic cells. *Eur J Immunol* 2005;35: 1066-75.
294. Raddassi K, Kent SC, Yang J, Bourcier K, Bradshaw EM, Seyfert-Margolis V, Nepom GT, Kwok WW, Hafler DA, Increased Frequencies of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein/MHC Class II-Binding CD4 Cells in Patients with Multiple Sclerosis. *J Immunol* 2011;187: 1039-46.

295. Reddy J, Bettelli E, Nicholson L, Waldner H, Jang M-H, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK, Detection of Autoreactive Myelin Proteolipid Protein 139–151-Specific T Cells by Using MHC II (IAs) Tetramers. *J Immunol* 2003;170: 870-77.
296. Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT, Detection of CD4+ Autoreactive T Cells in T1D Using HLA Class II Tetramers. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1005: 82-87.
297. Bronke C, Palmer NM, Westerlaken GHA, Toebe M, van Schijndel GMW, Purwaha V, van Meijgaarden KE, Schumacher TNM, van Baarle D, Tesselaar K, Geluk A, Direct Ex Vivo Detection of HLA-DR3-Restricted Cytomegalovirus- and Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4+ T Cells. *Human Immunol* 2005;66: 950-61.
298. Day CL, Seth NP, Lucas M, Appel H, Gauthier L, Lauer GM, Robbins GK, Szczepiorkowski ZM, Casson DR, Chung RT, Bell S, Harcourt G, Walker BD, Klenerman P, Wucherpfennig KW, Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *The J Clin Invest* 2003;112: 831-42.
299. Höhn H, Kortsik C, Zehbe I, Hitzler WE, Kayser K, Freitag K, Neukirch C, Andersen P, Doherty TM, Maeurer M, MHC class II Tetramer Guided Detection of Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T Cells in Peripheral Blood from Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Scand J Immunol* 2007;65: 467-78.
300. Ulsenheimer A, Lucas M, Seth NP, Tilman Gerlach J, Gruener NH, Loughry A, Pape GR, Wucherpfennig KW, Diepolder HM, Klenerman P, Transient immunological control during acute hepatitis C virus infection: ex vivo analysis of helper T-cell responses. *J Viral Hepat* 2006;13: 708-14.
301. Gadermaier G, Jahn-Schmid B, Vogel L, Egger M, Himly M, Briza P, Ebner C, Vieths S, Bohle B, Ferreira F, Targeting the cysteine-stabilized fold of Art v 1 for immunotherapy of Artemisia pollen allergy. *Molecular Immunology* 2010;47: 1292-98.
302. Kinnunen T, Jutila K, Kwok WW, Rytkönen-Nissinen M, Immonen A, Saarelainen S, Närvänen A, Taivainen A, Virtanen T, Potential of an altered peptide ligand of lipocalin allergen Bos d 2 for peptide immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119: 965-72.
303. Vollers SS, Stern LJ, Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology* 2008;123: 305-13.
304. Gammon G, Shastri N, Cogswell J, Wilbltr S, Sadegh-Nasseri S, Krzych U, Miller A, Sercarz E, The Choice of T-Cell Epitopes Utilized on a Protein Antigen Depends on Multiple Factors Distant from, as well as at the Determinant Site. *Immunol Rev* 1987;98: 54-73.
305. Texier C, Pouvelle S, Busson M, Herve M, Charron D, Menez A, Maillere B, HLA-DR Restricted Peptide Candidates for Bee Venom Immunotherapy. *J Immunol* 2000;164: 3177-84.
306. Immonen AK TA, Närvänen AT, Kinnunen TT, Saarelainen SA, Rytkönen-Nissinen MA, Virtanen TI., Use of multiple peptides containing T cell epitopes is a feasible approach for peptide-based immunotherapy in Can f 1 allergy. *Immunology* 2007;120: 38-46.
307. Immonen A, Kinnunen T, Sirven P, Taivainen A, Houitte D, Peräsaari J, Närvänen A, Saarelainen S, Rytkönen-Nissinen M, Maillere B, Virtanen T, The major horse allergen Equ c 1 contains one immunodominant region of T cell epitopes. *Clin Exp Allergy* 2007;37: 939-47.

308. Ebner C, Schenk S, Najafian N, Siemann U, Steiner R, Fischer G, Hoffmann K, Szepfalusi Z, Scheiner O, Kraft D, Nonallergic individuals recognize the same T cell epitopes of Bet v 1, the major birch pollen allergen, as atopic patients. *J Immunol* 1995;154: 1932-40.
309. Counsell CM, Bond JF, Ohman Jr JL, Greenstein JL, Garman RD, Definition of the human T-cell epitopes of Fel d 1, the major allergen of the domestic cat. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98: 884-94.
310. Jahn-Schmid B, Sirven P, Leb V, Pickl WF, Fischer GF, Gadermaier G, Egger M, Ebner C, Ferreira F, Maillère B, Bohle B, Characterization of HLA Class II/Peptide-TCR Interactions of the Immunodominant T Cell Epitope in Art v 1, the Major Mugwort Pollen Allergen. *J Immunol* 2008;181: 3636-42.
311. Mutschlechner S, Egger M, Briza P, Wallner M, Lackner P, Karle A, Vogt AB, Fischer GF, Bohle B, Ferreira F, Naturally processed T cell-activating peptides of the major birch pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125: 711-18.e2.
312. Oseroff C, Sidney J, Kotturi MF, Kolla R, Alam R, Broide DH, Wasserman SI, Weiskopf D, McKinney DM, Chung JL, Petersen A, Grey H, Peters B, Sette A, Molecular Determinants of T Cell Epitope Recognition to the Common Timothy Grass Allergen. *J Immunol* 2010;185: 943-55.
313. Castelli FA, Buhot C, Sanson A, Zarour H, Pouv lle-Moratille S, Nonn C, Gahery-Segard H, Guillet J-G, Menez A, Georges B, Maillère B, HLA-DP4, the Most Frequent HLA II Molecule, Defines a New Supertype of Peptide-Binding Specificity. *J Immunol* 2002;169: 6928-34.
314. Reijonen H, Kwok WW, Use of HLA class II tetramers in tracking antigen-specific T cells and mapping T-cell epitopes. *Methods* 2003;29: 282-88.
315. Kern F, LiPira G, Gratama JW, Manca F, Roederer M, Measuring Ag-specific immune responses: understanding immunopathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer. *Trends Immunol* 2005;26: 477-84.
316. Buckner JH, Holzer U, Novak EJ, Reijonen H, Kwok WW, Nepom GT, Defining antigen-specific responses with human MHC class II tetramers. *J Allergy Clin Immunol* 2002;110: 199-208.
317. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M, Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4: 648-55.
318. Garcia KC DM, Speir JA, Wilson IA., Emerging principles for T cell receptor recognition of antigen in cellular immunity. *Reviews in immunogenetics* 1999;1: 75-90.
319. Valitutti S MS, Dessing M, Lanzavecchia A., Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *journal of Experimental Medicine* 1996;183: 1917-21.
320. R ki M, Fallang L-E, Brottveit M, Bergseng E, Quarsten H, Lundin KEA, Sollid LM, Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 2831-36.
321. Cecconi V, Moro M, Del Mare S, Dellabona P, Casorati G, Use of MHC class II tetramers to investigate CD4+ T cell responses: Problems and solutions. *Cyt Part A* 2008;73A: 1010-18.

322. Scriba TJ, Purbhoo M, Day CL, Robinson N, Fidler S, Fox J, Weber JN, Klenerman P, Sewell AK, Phillips RE, Ultrasensitive Detection and Phenotyping of CD4+ T Cells with Optimized HLA Class II Tetramer Staining. *J Immunol* 2005;175: 6334-43.
323. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR, Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research* 2011;39: D913-D19.
324. Higgins JA, Thorpe CJ, Hayball JD, O'Hehir RE, Lamb JR, Overlapping T-cell epitopes in the group I allergen of *Dermatophagoides* species restricted by HLA-DP and HLA-DR class II molecules. *J Allergy Clin Immunol* 1994;93: 891-99.
325. Verhoef A, Higgins JA, Thorpe CJ, Marsh SGE, Hayball JD, Lamb JR, O'Hehir RE, Clonal analysis of the atopic immune response to the group 2 allergen of *Dermatophagoides* spp.: identification of HLA-DR and -DQ restricted T cell epitopes. *Int Immunol* 1993;5: 1589-97.
326. Colombani J DL, Variations of HL-A antigens in populations (a survey). *Revue Européenne d'Etudes Cliniques et Biologiques* 1972;17: 551-63
327. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GMA, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HML, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL, HIV-Specific Cd8+ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *J Exp Med* 2000;192: 63-76.
328. He XS RB, Boisvert J, Mumm J, Maecker HT, Roederer M, Wright TL, Maino VC, Davis MM, Greenberg HB., Direct functional analysis of epitope-specific CD8+ T cells in peripheral blood. *Viral Immunology* 2001;14: 59-69.
329. Falta MT, Fontenot AP, Rosloniec EF, Crawford F, Roark CL, Bill J, Marrack P, Kappler J, Kotzin BL, Class II major histocompatibility complex-peptide tetramer staining in relation to functional avidity and T cell receptor diversity in the mouse CD4+ T cell response to a rheumatoid arthritis-associated antigen. *Arthritis & Rheumatism* 2005;52: 1885-96.
330. Bercovici N, Duffour M-T, Agrawal S, Salcedo M, Abastado J-P, New Methods for Assessing T-Cell Responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000;7: 859-64.
331. Bousso P, Lemaître F, Laouini D, Kanellopoulos J, Kourilsky P, The peripheral CD8 T cell repertoire is largely independent of the presence of intestinal flora. *Int Immunol* 2000;12: 425-30.
332. Striebich CC, Falta MT, Wang Y, Bill J, Kotzin BL, Selective Accumulation of Related CD4+ T Cell Clones in the Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 1998;161: 4428-36.
333. McLean-Tooke A BD, Spickett GP, Gennery AR., Flow cytometric analysis of TCR V β repertoire in patients with 22q11.2 deletion syndrome. *Scand J Immunol* 2011;73: 577-85.
334. Genova GD, Savelyeva N, Suchacki A, Thirdborough SM, Stevenson FK, Bystander stimulation of activated CD4+ T cells of unrelated specificity following a booster vaccination with tetanus toxoid. *Eur J Immunol* 2010;40: 976-85.
335. Stubbe M, Vanderheyde N, Pircher H, Goldman M, Marchant A, Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines. *Eur J Immunol* 2008;38: 273-82.

336. Jin HT JY, Park HJ, Ha SJ, Mechanism of T cell exhaustion in a chronic environment. *BMB reports* 2011;44: 217-31.
337. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R, Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J Virol* 2003;77: 4911-27.
338. Kauffman H, Tamm M, Timmerman JA, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy* 2006;4:5.
339. Brown A, Farmer K, MacDonald L, Kalsheker N, Pritchard D, Haslett C, et al. House Dust Mite Der p 1 Downregulates Defenses of the Lung by Inactivating Elastase Inhibitors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003;29(3):381-9
340. Wallner M, Hauser M, Himly M, Zaborsky N, Mutschlechner S, Harrer A, et al. Reshaping the Bet v 1 fold modulates TH polarization. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1571-78.
341. Fernandez-Rivas M AM, Fötisch K, de Heer P, Notten S, Vieths S, van Ree R. Immune reactivity of candidate reference materials. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 2006;95:84-8.
342. Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:414-20.
343. Huby RDJ, Dearman RJ, Kimber I. Why Are Some Proteins Allergens? *Toxicol Sci* 2000;55(2):235-46.
344. Egger M, Jürets A, Wallner M, Briza P, Ruzek S, Hainzl S, Pichler U, Kitzmüller C, Bohle B, Huber CG, Ferreira F, Assessing Protein Immunogenicity with a Dendritic Cell Line-Derived Endolysosomal Degradome. *PLoS ONE* 2011;6: e17278.
345. Trivedi B, Valerio C, Slater JE, Endotoxin content of standardized allergen vaccines. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111: 777-83.
346. Barrett NA, Maekawa A, Rahman OM, Austen KF, Kanaoka Y, Dectin-2 Recognition of House Dust Mite Triggers Cysteinyl Leukotriene Generation by Dendritic Cells. *J Immunol* 2009;182: 1119-28.
347. Harari A, Vallelia F, Meylan PR, Pantaleo G, Functional Heterogeneity of Memory CD4 T Cell Responses in Different Conditions of Antigen Exposure and Persistence. *J Immunol* 2005;174: 1037-45.
348. Lefrancois L, Marzo AL, The descent of memory T-cell subsets. *Nat Rev Immunol* 2006;6: 618-23.
349. Goodenough B, Kampel L, Champion GD, Laubreaux L, Nicholas MK, Ziegler JB, McInerney M, An investigation of the placebo effect and age-related factors in the report of needle pain from venipuncture in children. *Pain* 1997;72: 383-91.
350. Hamunen K, Kalso E, A systematic review of trial methodology, using the placebo groups of randomized controlled trials in paediatric postoperative pain. *Pain* 2005;116: 146-58.
351. Pfaar Oab, Anders Cab, Klimek Lab, Clinical outcome measures of specific immunotherapy. *Current Opinion in Allergy & Clin Immunol* 2009;9: 208-13.

ABSTRACT

Allergenic immunotherapy (AIT) is currently the only curative treatment for allergic disease. Whereas efficacy of this treatment is well established, its mechanisms of action are not clearly understood and predictive as well as surrogate biomarkers are needed to further support AIT development. We focused on allergen specific CD4 T cells, highly involved in allergic inflammation, and monitored their responses both in normal and pathologic conditions, or during AIT. Using MHC class II tetramers, we highlighted distinct patterns of polarization between seasonal and perennial allergen-specific CD4 T cells as well as between healthy and allergic individuals. Then, allergen-specific CD4 T cell responses were monitored during 2 double-blind placebo-controlled sublingual AIT clinical trials. After short term AIT (4 months), we observed a decrease of Th2A cells, a newly define subset, thought to contain most allergen-specific CD4⁺ T cells. IFN- γ production was increased after one year of treatment. However, these variations were not related to AIT clinical efficacy.

We further compared the expression of various activation markers and MHC class II tetramer staining following *in vitro* stimulation in order to circumvent inherent limitation of tetramers. No correlation could be established between tetramer staining and the expression of multiple activation markers in allergen-stimulated CD4 T cells. Combining these methods helps understanding patient heterogeneity regarding CD4 T cell responses. Moreover, Th2A cells detection is likely a promising approach to identify allergen-specific CD4 T cell during long-term AIT.

Key words: Allergen-specific immunotherapy, CD4 T cells, MHC class II tetramers.

RESUME

L'immunothérapie allergénique (ITA) est la seule thérapie capable d'agir sur l'étiologie des allergies. La compréhension des mécanismes d'action de ce traitement et la mise en évidence de biomarqueurs d'efficacité favoriseraient l'optimisation de l'ITA. A l'aide des tétramères de classe II, nous avons suivi les lymphocytes T CD4 périphériques spécifiques d'allergènes, acteurs centraux de la réaction allergique, dans des conditions normales, pathologiques ou en cours d'ITA, afin d'établir un lien entre ces trois situations physiologiques. Nous avons mis en évidence des différences entre les réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes saisonniers et perannuels, chez les individus sains et allergiques. Puis, lors de 2 études cliniques d'ITA sublinguale, l'une menée chez des adultes allergiques aux pollens de graminées traités pendant 4 mois et l'autre menée chez des enfants allergiques aux acariens traités pendant 1, nous avons respectivement observé une diminution des lymphocytes Th2A et une augmentation de la production d'IFN- γ liées au traitement. Toutefois, ces variations ne corrélaient pas avec l'efficacité clinique de l'ITA observée dans ces deux études.

Les limites d'utilisation des tétramères de classe II nous ont amené à rechercher si l'expression de marqueurs d'activation membranaires pouvait remplacer un marquage « tétramère ». Alors qu'une corrélation insuffisante a été observée entre le marquage « tétramère » et l'expression des marqueurs d'activation testés, nous avons mis en évidence 3 populations cellulaires aux propriétés fonctionnelles diverses, soulignant l'hétérogénéité des réponses lymphocytaires spécifiques d'allergènes. De plus, la découverte des lymphocytes Th2A pourrait être une approche prometteuse pour le suivi des réponses lymphocytaires T CD4 spécifiques d'allergènes lors d'ITA à plus long terme.

Mot clés : immunothérapie allergénique, lymphocytes T CD4, tétramères de molécules de classe II du CMH.

Stallergenes, Recherche et Développement
6, rue Alexis de Tocqueville
92183 ANTONY Cedex

Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire
(IBBMC)
UFR Sciences
15, rue Georges Clémenceau
91405 ORSAY Cedex

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
UFR de Médecine
78, rue du Général Leclerc
94270 Le KREMLIN BICETRE