

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire
UMR6218 – CNRS/Université d'Orléans

THÈSE présentée par :
Anne-Gaëlle BESNARD

Soutenue le : **17 décembre 2010**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

**Etude des mécanismes immunitaires dans un
modèle d'inflammation pulmonaire allergique
chez la souris : Rôles de l'interleukine-22**

THÈSE dirigée par :
Bernhard RYFFEL
François ERARD

Directeur de recherche au CNRS d'Orléans
Professeur à l'université d'Orléans

RAPPORTEURS :
Hamida HAMMAD
François HUAUX

Professeur à l'université de Gent, Belgique
Professeur à l'université de Louvain, Belgique

JURY
Hamida HAMMAD
François HUAUX (président)
Jean-Claude LECRON
Bernhard RYFFEL
François ERARD

Professeur à l'université de Gent, Belgique
Professeur à l'université de Louvain, Belgique
Maître de conférences à l'université de Poitiers
Directeur de recherche au CNRS d'Orléans
Professeur à l'université d'Orléans

“La science consiste à passer d’un étonnement à un autre”

Aristote

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements s'adressent à tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail.

Je fais part de mes plus vifs *remerciements* au **Professeur Hamida Hammad** et au **Professeur François Huaux** pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également le **Docteur Jean-Claude Lecron** de participer à mon jury de thèse comme *examineur*.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Docteur Bernhard Ryffel** pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Il a su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présent pour discuter des problèmes rencontrés, des résultats obtenus et des orientations à suivre.

Je remercie chaleureusement le **Professeur François Erard** pour la confiance qu'il m'a témoignée en me proposant ce financement de thèse, et pour l'honneur qu'il me fait de bien vouloir participer à mon jury de thèse.

Merci au **Docteur Valérie Quesniaux** de m'avoir accueillie au sein de son unité CNRS UMR6218 pendant ces trois années de thèse, et pour son aide précieuse dans l'écriture de ce manuscrit.

Ce travail n'aurait également pas pu se faire sans la volonté et l'efficacité du **Docteur Dieudonnée Togbe**. Je la remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et les conseils qu'elle a pu me fournir pendant la durée de cette thèse.

Je souhaite remercier tous les étudiants, thésards, post-docs, techniciens, chercheurs et personnel administratif de l'unité pour leur bonne humeur et leur soutien dans les moments difficiles. Je ne vous oublierai pas !

Un grand merci au personnel des animaleries de l'institut pour la qualité de leur travail et leur réactivité.

Je ne saurais oublier tous ceux, qui de près ou de loin, pour leur compétence, leur aide technique ou leur soutien moral, ont contribué à la réalisation de ce travail. Merci à tous !

Mes derniers remerciements s'adressent à mes parents et à mon frère, qui m'ont toujours aidée, soutenue et encouragée au cours de mes études et bien évidemment de cette thèse.

SOMMAIRE

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	8
INTRODUCTION	11
GENERALITES SUR L'ASTHME ALLERGIQUE	12
1. Définition de l'asthme allergique	12
2. Historique	12
3. Epidémiologie et coût	13
4. Etiopathologie et facteurs déclenchants	13
4.1 Les origines génétiques de l'asthme	13
4.2 Les facteurs hormonaux	14
4.3 Facteurs environnementaux	15
5. Pathophysiologie de l'asthme	15
5.1 La phase d'immunisation	16
5.2 La phase effectrice	17
5.3 La phase de remodelage bronchique	18
6. Traitement de l'asthme allergique	19
7. Les modèles murins d'asthme allergique	20
LES MEDiateURS CELLULAIRES DE L'ASTHME ALLERGIQUE	22
1. Les cellules dendritiques	22
2. Les mastocytes	25
3. Les basophiles	26
4. Les éosinophiles	27
5. Les neutrophiles	28
6. Les lymphocytes B	28
7. Les lymphocytes T	29
7.1 Les lymphocytes Th1 et Th2 : le paradigme classique	29
7.2 Les lymphocytes T régulateurs: indispensables au contrôle de l'immunité	31
7.3 Les lymphocytes Th17 : entre immunité mucoale et auto-immunité	32
7.4 Les lymphocytes Th9 et Th22 : les derniers arrivés	33
8. Les cellules NKT	34
9. Les lymphocytes $\gamma\delta$	35
10. Le poumon, effecteur de la réponse immune	36
10.1 L'épithélium bronchique	36
10.2 L'endothélium vasculaire	38
10.3 Les cellules musculaires lisses bronchiques	39
10.4 Les fibroblastes	39

LES MEDiateURS SOLUBLES DE L'ASTHME ALLERGIQUE	40
1. Les cytokines Th2	40
1.1 L'interleukine-9	40
1.2 L'interleukine-25	41
1.3 L'interleukine-33	41
1.4 Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)	44
2. Les cytokines Th17	45
2.1 L'interleukine-17	45
2.2 L'interleukine-23	46
2.3 L'interleukine-21	47
2.4 L'interleukine-22	47
3. Autres cytokines pro-inflammatoires	49
3.1 Les interleukines-1 α et β	49
3.2 L'interleukine-18	51
4. Les cytokines immunorégulatrices	51
4.1 L'interleukine-10	51
4.2 L'interferon- γ	53
4.3 L'interleukine-12	53
5. Les chimiokines importantes dans l'asthme allergique	55
RESULTATS ET DISCUSSIONS	57
ARTICLE 1 : ETUDE DE LA FONCTION DE L'INTERLEUKINE-22 DANS UN MODELE D'ASTHME ALLERGIQUE CHEZ LA SOURIS	58
Dual role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A	60
Discussion article 1	95
1. Rôle pro-inflammatoire de l'IL-22	95
2. Rôle régulateur de l'IL-22	96
3. Le lien avec le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)	98
ARTICLE 2 : ETUDE DU ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3 ET DE LA VOIE DE SIGNALISATION IL-1/IL-1R1 DANS UN MODELE EXPERIMENTAL D'ASTHME ALLERGIQUE SANS ADJUVANT	100
Critical role of NLRP3 inflammasome in allergic lung inflammation in absence of adjuvant	102
Discussion article 2	125
ARTICLE 3 : ETUDE DE L'INTERLEUKINE-33 DANS L'ACTIVATION ET LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES DANS UN MODELE MURIN D'ASTHME ALLERGIQUE	127
IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation	129
Discussion article 3	153
Maturation et sécrétion de l'IL-33	155
DISCUSSION ET CONCLUSIONDISCUSSION GENERALE	158
DISCUSSION GENERALE	159
1. La pertinence des modèles expérimentaux d'asthme allergique chez la souris	162
PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	164
CONCLUSIONS	166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167

LISTE DES ABREVIATIONS

Alum	Hydroxyde d'aluminium
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucleique
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain
ATP	Adénosine tri-phosphate
BAL	Lavage bronchoalvéolaire
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CpG	Motif ADN "cytosine-phosphate-guanine"
DAMP	Danger associated molecular pattern
DC	Cellule dendritique
DSS	Dextran sulfate domain
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EPO	Eosinophil peroxidase
FoxP3	Forkhead box protein 3
FICZ	6-formylindolol[3,2-b]carbazole
HDM	House dust mite
HMGB1	High-mobility group protein B1
HRB	Hyperréactivité bronchique
IBD	Intestinal bowel disease
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IgE	Immunoglobuline de type E
InVs	Institut de veille sanitaire
IRF-4	Interferon-regulatory factor 4
kDA	kilo Dalton
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
Mch	Metacholine
MMP	Matrix metalloproteinase
NFκB	Nuclear factor κ B
NKT	Lymphocyte T natural killer
NLR	Nod-like receptor
NLS	Séquence de localisation nucléaire
OVA	Ovalbumine
PAR	Protease-associated receptor
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RORγT	Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ T
ROS	Reactive oxygen species
SCF	Stem cell factor
TCR	T-cell receptor
TGFβ	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	Lymphocyte T régulateur
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VRS	Virus respiratoire syncytial

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1	Gènes de susceptibilité associés à l'asthme
Tableau 2	Toll-like récepteurs, ligands et sources
Tableau 3	Différences entre les modèles murins et la pathophysiologie humaine dans l'asthme allergique
Figure 1	Représentation schématique de la cascade allergique
Figure 2	La réaction inflammatoire pulmonaire dans l'asthme allergique
Figure 3	Modèle expérimental murin d'inflammation allergique pulmonaire utilisé à l'Institut
Figure 4	Capture des allergènes par les cellules dendritiques et induction de la réponse immune
Figure 5	La synapse immunologique entre les cellules dendritiques et les cellules T
Figure 6	Rôle des cellules dendritiques au cours de la phase effectrice de l'asthme allergique
Figure 7	Interaction entre les lymphocytes B et T
Figure 8	Différenciation des cellules T naïves
Figure 9	Fonctions immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs dans l'asthme allergique
Figure 10	Les 3 stimuli reconnus par les lymphocytes T $\gamma\delta$
Figure 11	Fonction des cellules épithéliales dans l'induction de l'inflammation allergique pulmonaire
Figure 12	Représentation schématique de l'IL-33
Figure 13	Activités cellulaires de l'IL-33 dans l'asthme allergique
Figure 14	Activation de l'inflammasome NLRP3
Figure 15	Fonctions de l'IL-10 dans l'asthme allergique
Figure 16	Modèle hypothétique d'exacerbation de la réponse Th2 par l'axe IL-12/STAT4/IFN γ
Figure 17	Implication des chimiokines dans les différents processus de l'asthme allergique
Figure 18	Induction de l'IL-33 dans les poumons des souris asthmatiques

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Au cours de mon doctorat, mes recherches ont porté sur l'étude des mécanismes de la réponse immunitaire mis en jeu dans l'asthme allergique, et plus particulièrement sur le rôle de deux cytokines associées à la fonctionnalité ou au développement des lymphocytes Th17. Parallèlement à ce projet, je me suis intéressée au rôle de l'interleukine-33 dans l'initiation de la réponse allergique pulmonaire dans un modèle expérimental d'asthme allergique chez la souris.

L'asthme allergique est une maladie multifactorielle résultant de la conjonction de facteurs congénitaux (terrains atopiques, polymorphismes génétiques) et d'éléments liés à l'environnement (allergènes, polluants, infections...). La réaction inflammatoire asthmatique est caractérisée par une étape d'initiation sous la dépendance des cellules dendritiques, suivie par une étape effectrice avec la libération de multiples médiateurs par les cellules inflammatoires, et enfin par une phase de réparation aboutissant au remodelage des voies aériennes. Au cours des dernières années, le rôle des cytokines et chimiokines dans le trafic cellulaire local a fait l'objet de nombreuses études. D'autres travaux ont mis en lumière l'intervention de l'épithélium bronchique et de l'endothélium qui participent à l'inflammation pulmonaire en sécrétant des molécules « d'alerte » ou en facilitant le recrutement des médiateurs cellulaires.

Des études réalisées chez l'Homme ou la souris ont mis en évidence un rôle critique des lymphocytes Th2 dans l'orchestration de l'inflammation pulmonaire allergique. Néanmoins, des travaux récents ont montré l'implication des lymphocytes Th17 dans cette pathologie. Cette population se caractérise par la production des cytokines IL-17A, IL-17F, et de l'IL-22 et intervient dans le maintien de la barrière homéostatique épithéliale contre les attaques extérieures et dans diverses pathologies inflammatoires chroniques. L'étude du rôle de l'IL-22 dans l'asthme allergique a constitué l'essentiel de mon travail de thèse. L'expression du récepteur IL-22R dans les tissus comme la peau, l'intestin ou les voies respiratoires, suggère que l'IL-22 pourrait jouer un rôle dans l'immunité mucoale. Plusieurs études ont notamment révélé un rôle protecteur de l'IL-22 lors d'infections bactériennes intestinales ou pulmonaires. Les Th17 étant impliqués dans l'induction de la réponse allergique, il était intéressant de savoir si l'IL-22 jouait un rôle dans cette pathologie.

Dans un modèle murin d'inflammation allergique pulmonaire induite par l'ovalbumine, nous avons mis en évidence une fonction différentielle de cette cytokine dans l'induction et la résolution de l'asthme allergique.

Le développement des lymphocytes Th17 nécessite des facteurs particuliers, parmi lesquels se trouve l'interleukine-1 beta (IL-1 β) qui semble essentielle à la polarisation des Th17 chez l'Homme. L'IL-1 β , première cytokine identifiée dans les années 1970, joue un rôle clé dans l'immunité innée.

Dernièrement, la mise en évidence de l'inflammasome dans la maturation et la sécrétion de l'IL-1 β a apporté de nouveaux éléments de compréhension des processus inflammatoires, et notamment le concept d'inflammation "stérile". En se basant sur ces nouvelles connaissances, nous nous sommes intéressés aux rôles de la voie IL-1 β /IL-1R et à l'inflammasome NLRP3 dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique n'utilisant pas d'adjuvant.

Enfin, mon intérêt s'est porté sur l'IL-33, une cytokine importante dans les pathologies Th2. Le rôle de cette cytokine est bien décrit dans la littérature, et on sait que l'IL-33 participe à l'exacerbation de la réponse allergique en agissant sur les éosinophiles, les mastocytes, les basophiles et les lymphocytes Th2. Plus récemment, une équipe a montré que l'IL-33 était libérée par les cellules épithéliales pulmonaires dans les heures qui suivent l'exposition à un allergène. Sachant que les cellules dendritiques expriment le récepteur de l'IL-33, nous avons voulu savoir si la libération précoce d'IL-33 après contact avec l'allergène pouvait influencer l'immunité innée et notamment les cellules dendritiques dans l'induction de la réponse allergique.

Ce manuscrit s'articule autour de l'étude de ces trois cytokines, l'IL-22, l'IL-1 β et l'IL-33, dans un modèle d'asthme allergique murin. Une courte introduction aborde les points essentiels à la compréhension de la physiopathologie de l'asthme et s'attache à décrire les principaux médiateurs cellulaires et solubles impliqués dans la réponse inflammatoire allergique.

La partie « Résultats » de ce manuscrit comprend trois chapitres correspondant aux trois projets entrepris au cours de ma thèse. Ces projets ont donné lieu à la rédaction d'articles scientifiques, présentés ci-dessous tel qu'ils ont été soumis aux différents journaux. Ces trois articles sont brièvement introduits, puis discutés individuellement.

Enfin, une discussion générale reviendra sur l'intérêt de ce type d'étude et la pertinence des résultats obtenus.

INTRODUCTION

GENERALITES SUR L'ASTHME ALLERGIQUE

1. Définition de l'asthme allergique

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), « l'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires qui se manifeste par des épisodes récurrents de toux, de sifflements et de dyspnée, traduisant un trouble ventilatoire obstructif, variable dans le temps et réversible (au moins partiellement) spontanément ou sous l'effet d'un traitement bronchodilatateur ». Chez les sujets prédisposés, cette inflammation provoque une hyperréactivité bronchique (HRB) en réponse à divers stimuli entraînant un essoufflement, une toux, une sensation d'oppression au niveau de la poitrine et la production de sécrétions bronchiques.

2. Historique

L'asthme n'est pas une maladie récente et de nombreuses théories ont été émises pour en expliquer les causes et proposer des traitements.

La première description de l'asthme remonte à l'Egypte ancienne. En effet, il y a 3500 ans, le papyrus d'Ebers décrivait déjà les symptômes de la maladie et recommandait de respirer la fumée dégagée par la combustion de certaines herbes en cas de crise. De façon surprenante, des traités de médecine chinoise proposent depuis des siècles des remèdes contre l'asthme à base de plantes riches en beta-agonistes, permettant ainsi de réduire la broncho-constriction.

Le terme actuel d'asthme vient du verbe grec « azein » signifiant « respirer par la bouche » ou « haleter », et fut utilisé au quatrième siècle avant Jésus-Christ par le médecin Hyppocrate pour décrire la maladie.

Jusqu'au vingtième siècle, les connaissances scientifiques de l'asthme et des allergies ont évoluées lentement. Jusqu'au début du vingtième siècle, l'asthme était considéré comme une maladie psychosomatique. La reconnaissance des grains de pollens comme agent étiologique (Blackley, 1873), puis la découverte d'un facteur transférable à partir du sérum par Prausnitz et Kustner en 1921 et enfin l'identification de ce facteur comme étant une sous-classe d'immunoglobuline (les immunoglobulines E ou IgE) par Ishigaha aux Etats-Unis en 1966, ont permis d'identifier l'asthme comme une maladie d'origine inflammatoire.

3. Epidémiologie et coût

Dans les pays industrialisés, la prévalence de l'asthme a doublé au cours des 30 dernières années. L'atopie (qui concerne environ la moitié des asthmatiques) a également vu sa prévalence doubler dans la même période. L'atopie correspond à une prédisposition à développer un certain nombre de manifestations cliniques au contact d'allergènes inoffensifs.

Cette augmentation de la fréquence de l'affection est un phénomène mondial, dont les explications peuvent être diverses : la vie occidentale moderne serait source d'une diversification des pneumallergènes connus (banalisation des animaux domestiques, logements mieux isolés et moins ventilés donc plus humides, importation de nouvelles essences d'arbres...) (Wilson et al., 2006).

Environ 8% des moins de quinze ans et 4,5% des plus de quinze ans (soit environs 6% de la population française) sont actuellement asthmatiques (Delmas and Fuhrman). C'est aussi la maladie la plus fréquente en pédiatrie et la première cause d'absentéisme scolaire.

Le coût annuel de l'asthme en France est estimé à 1,5 milliard d'euro. Les services publics cherchent à réduire ce coût par des programmes d'éducation des malades, qui au-delà de l'amélioration de la qualité de vie d'un malade bien informé, visent à réduire les recours aux urgences et aux hospitalisations. En effet, chaque année, on observe une augmentation des hospitalisations pour insuffisance respiratoire aiguë associée à l'asthme, surtout chez les enfants de moins de dix ans (Source InVS, 2007). Malgré l'amélioration de la prise en charge des patients, les taux de mortalité par l'asthme restent stables. Entre 2000 et 2006, 1270 décès par asthme ont été enregistrés en France dont 84 chez les enfants et les adultes de moins de 45 ans (Source InVS, 2007).

4. Etiopathologie et facteurs déclenchants

L'asthme est une maladie plurifactorielle. Les patients asthmatiques présentent généralement un terrain de prédisposition où interviennent des facteurs génétiques, auxquels se rajoutent des facteurs environnementaux déclenchants ou aggravants.

4.1 Les origines génétiques de l'asthme

Les avancées récentes dans les technologies moléculaires permettant le génotypage de milliers de polymorphismes génétiques ont permis d'importants progrès dans la caractérisation de nouveaux gènes de susceptibilité à l'asthme. A ce jour, 43 gènes ont été identifiés en comparant le génome de patients asthmatiques à celui d'individus sains (Vercelli, 2008).

Les gènes de susceptibilité à l'asthme peuvent être classés en quatre groupes (Tableau 1) :

Groupe I : Gènes associés à l'immunité innée et à l'immunorégulation

Groupe II : Gènes associés à la différenciation des Th2 et aux fonctions effectrices

Groupe III : Gènes associés à la biologie des cellules épithéliales et à l'immunité mucoale

Groupe IV : Gènes associés aux fonctions pulmonaires et au remodelage bronchique

Gènes	Locus	Nom officiel	Fonction biologique
Groupe I			
CD14	5q31.1	CD14 molecule	Immunité innée, reconnaissance microbienne
IL 10	1q31 q32	Interleukin 10	Immunorégulation
TLR2	4q32	Toll like receptor like 2	Immunité innée, reconnaissance microbienne
TLR4	9q33.1	Toll like receptor 4	Immunité innée, reconnaissance microbienne
Groupe II			
IL 4	5q31.1	Interleukin 4	Effecteur dans la différenciation des lymphocytes Th2 et dans l'induction des IgE
IL 13	5q31	Interleukin 13	Effecteur dans la différenciation des Th2, hyper réactivité bronchique
STAT6	12q13	Signal transducer and activator of transcription 6	Signalisation de l'IL 4 et 13
FcεRI	11q13	Fc fragment of IgE high affinity I	Effecteur de la réponse Th2
IL 4Ra	16p12.1 p12.2	Interleukin 4 receptor alpha chain	Signalisation de l'IL 4 et 13
Groupe III			
CCL5	17q11.2 q12	Chemokine ligand 5 (RANTES)	Chimioattractant pour les monocytes, les cellules T et les éosinophiles
CCL11	17q21.1q21.2	Chemokine ligand 11 (eotaxin 1)	Chimioattractant des éosinophiles
CCL24	7q11.23	Chemokine ligand 11 (eotaxin 2)	Chimioattractant des éosinophiles
ADAM33	20p13	ADAM metalloproteinase domain 33	Interaction cellule cellule et cellule tissu
FLG	1q21.3	Filaggrin	Intégrité de la barrière épithéliale
Groupe IV			
ADRB2	5q31 q32	Adrenergic receptor beta 2	Relaxation du muscle lisse
TBXAR2	19p13.3	Tromboxane A2 receptor	Contraction du muscle lisse, inflammation
TNFα	6p21.3	Tumor necrosis factor	Inflammation
TGFβ1	19q13.1	Transforming growth factor, beta 1	Immunorégulation, prolifération cellulaire
LTA	6p21.3	Lymphotoxin alpha	Inflammation

Tableau 1 : Gènes de susceptibilité associés à l'asthme allergique ou à ses phénotypes dans au moins cinq études d'association indépendantes et basées sur l'approche par gènes candidats. (D'après Vercelli D, 2008).

4.2 Les facteurs hormonaux

Une influence hormonale est parfois retrouvée, comme chez certaines femmes qui présentent une recrudescence prémenstruelle des crises asthmatiques. D'autre part, certains asthmes s'aggravent ou débutent à la ménopause. A l'inverse, une amélioration des symptômes est observée chez les femmes enceintes. Des études suggèrent que la production accrue d'hormones, en particulier de la progestérone et du cortisol pourrait exercer un effet protecteur (Balzano et al., 2001).

4.3 Facteurs environnementaux

Les allergènes sont des antigènes particuliers qui, même en très faibles quantités, sont susceptibles de déclencher des réponses immunes, caractérisées par la production d'immunoglobulines de type E (IgE). Les principaux pneumallergènes présents dans l'air ambiant sont les acariens de la poussière domestique, les pollens, les phanères d'animaux (principalement le chat) et certaines moisissures. Les allergènes présents dans les aliments peuvent également induire l'asthme, de même que les sulfites (présents dans le vin, dans certains médicaments ou dans certains aliments en tant que conservateur). La farine de blé, les isocyanates contenus dans les teintures et peintures peuvent être à l'origine d'asthme professionnel.

Les infections virales (VRS chez le nourrisson, parainfluenza chez l'enfant ou la grippe chez l'adulte) ou bactériennes (Chlamydia, mycoplasme, sinusite ou infections gingivodentaires...) sont des facteurs déclenchants extrêmement fréquents de l'exacerbation de l'asthme.

Les irritants de l'environnement, la pollution (hydrocarbures des gaz d'échappement) ont une action directement mécanique sur la muqueuse bronchique, pouvant entraîner une inflammation et des sécrétions bronchiques. Les asthmatiques sont beaucoup plus sensibles que les sujets sains à cette pollution.

5. Pathophysiologie de l'asthme

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes rendues sensibles (hyper réactives) à des stimuli tels que les allergènes, les irritants chimiques, la fumée de tabac, l'air froid ou l'exercice, et provoque des épisodes récidivants de toux, sifflements et difficultés respiratoires. Lorsqu'elles sont exposées à ces stimuli, les voies aériennes peuvent se contracter, produire des œdèmes, se remplir de mucus et progressivement se remodeler.

La réaction inflammatoire allergique se développe en plusieurs étapes (Figure 1):

- L'étape d'initiation de la réponse allergique, sous la dépendance des cellules dendritiques
- L'étape effectrice caractérisée par la libération de nombreux médiateurs chimiques par les cellules inflammatoires
- L'étape de remodelage bronchique qui apparaît au stade de l'asthme chronique et rend compte des altérations en partie irréversibles des bronches (Tillie-Leblond et al., 2004).

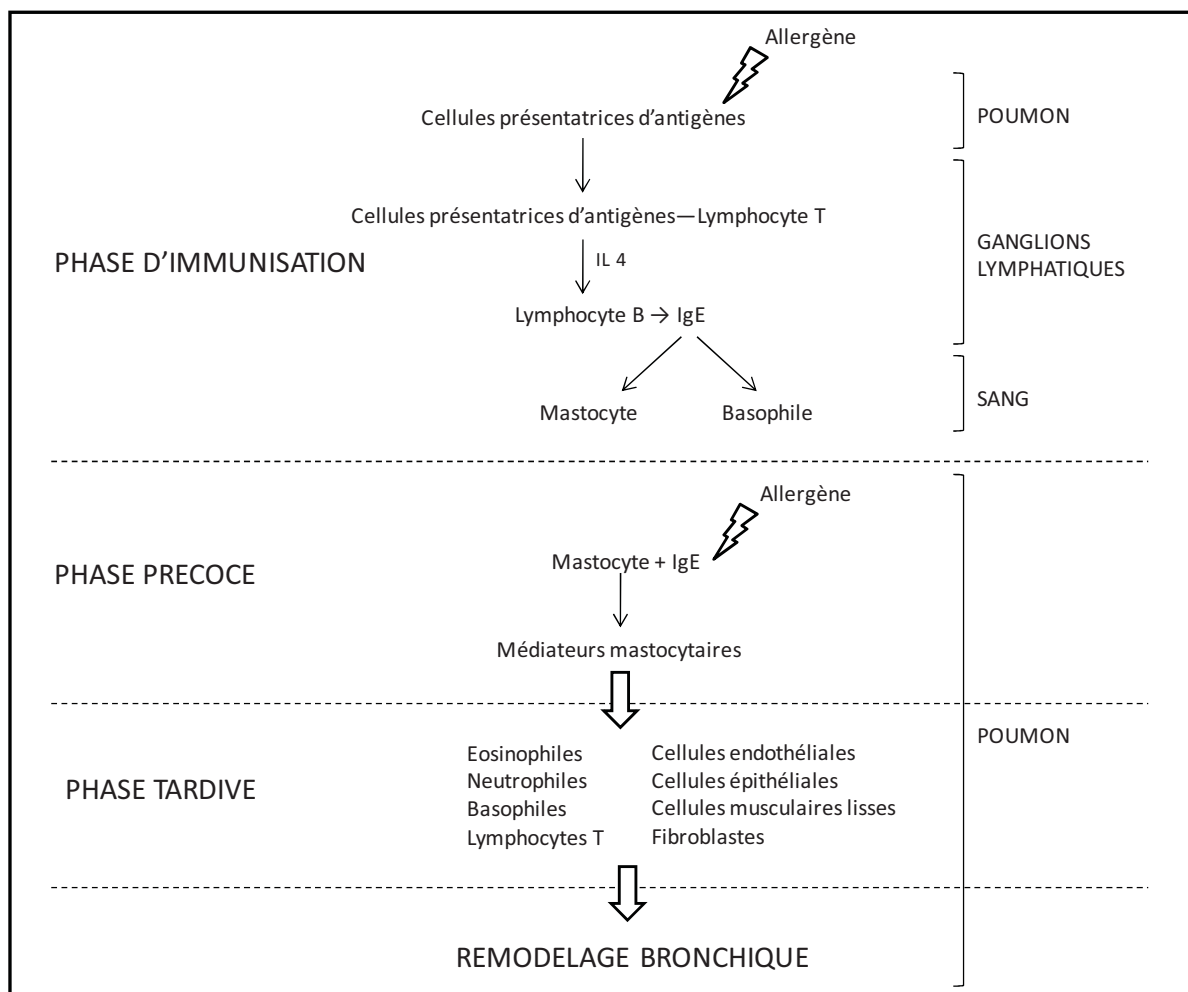


Figure 1 : Représentation schématique de la cascade allergique. Au cours de la phase d'immunisation, les antigènes inhalés sont capturés par les cellules présentatrices d'antigènes qui activent alors la prolifération des cellules T et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ceci entraîne une production d'IgE spécifiques de l'allergène, lesquels se lient aux récepteurs à haute affinité pour les fragments Fc des IgE (FcεRI) présents sur les mastocytes et les basophiles. Suite à une nouvelle exposition à l'allergène, les mastocytes et les basophiles libèrent les médiateurs chimiques contenus dans leurs granules (phase précoce), ce qui aboutit au recrutement de nombreux médiateurs cellulaires dans les poumons (phase tardive) qui seront à l'origine du remodelage bronchique (D'après Verstraelen S, 2008).

5.1 La phase d'immunisation

Lorsque l'allergène pénètre dans les voies aériennes, il interagit en premier lieu avec les cellules dendritiques présentes au niveau de l'épithélium bronchique. Les cellules dendritiques forment un réseau très dense capable de capturer les antigènes inhalés, de les dégrader en peptides, puis de les présenter aux lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques drainants. En l'absence de signaux pro-inflammatoires, l'inhalation d'antigènes inoffensifs aboutit à une tolérance du système immunitaire caractérisée par la sécrétion d'IL-10 par les cellules dendritiques et l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Akbari et al., 2001; Kim et al., 2010; Lambrecht and Hammad, 2003). Lorsque l'antigène est inhalé en présence de signaux pro-inflammatoires, tel l'exposition à de faibles quantités de produits d'origines bactériennes ou lors d'infections pulmonaires virales, les

cellules dendritiques perdent leur propriété immuno-toléro-gène et sont alors en mesure d'induire une réponse effectrice de type 2 dirigée contre l'allergène (Eisenbarth et al., 2002; Hammad and Lambrecht, 2008). Après expansion clonale, une partie des cellules T activées se retrouve dans la circulation, les autres s'accumulent dans les ganglions lymphatiques et la rate pour constituer un stock de cellules T mémoires. Lors d'un nouveau contact avec l'allergène, ces cellules produiront rapidement et en grande quantité, les cytokines pro-allergisantes IL-4 et IL-5 qui seront impliquées dans la production d'IgE par les lymphocytes B.

5.2 La phase effectrice

5.2.1 La réaction d'asthme immédiate ou précoce

La réaction d'asthme immédiate se manifeste par une diminution des débits expiratoires et l'apparition des symptômes asthmatiques comme la dyspnée, la sensation d'oppression thoracique et la toux. Ces symptômes apparaissent dès la première heure après l'exposition à l'allergène et s'estompent habituellement en moins d'une heure. Cette réaction immédiate est principalement due à la contraction des muscles lisses bronchiques et à l'œdème de la muqueuse en réponse à des médiateurs chimiques d'origine essentiellement mastocytaire.

En effet, les IgE libérés dans la circulation par les lymphocytes B, se lient aux récepteurs FcεRI à la surface des mastocytes et des basophiles entraînant, en présence d'allergène, la dégranulation de médiateurs pré-formés (histamine, peroxydases, facteurs chimiotactiques et protéases neutres) et néo-formés (superoxyde, cytokines, facteurs d'activation plaquettaires, leucotriènes et prostaglandines). Les médiateurs pré-formés sont responsables du bronchospasme, de la vasodilatation, de la perméabilisation vasculaire et de l'augmentation de la sécrétion glandulaire. Les médiateurs néo-formés participent aux mêmes mécanismes que les médiateurs pré-formés, mais ont aussi une activité pro-inflammatoire préparant le microenvironnement à la réaction tardive.

5.2.2 La réaction d'asthme tardive

Chez certains sujets, une deuxième réaction asthmatique peut-être observée 3 à 8 heures après l'inhalation de l'allergène (Verstraelen et al., 2008).

Les médiateurs dérivés des mastocytes augmentent la perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou ICAM-1, ce qui a pour conséquence le recrutement de cellules inflammatoires dans les voies aériennes, principalement des éosinophiles, mais également des neutrophiles, des lymphocytes, des macrophages et des basophiles (Bousquet et al., 2000). La présence répétée de ces médiateurs est à l'origine de l'inflammation chronique et aboutit à des modifications structurales des voies aériennes.

5.3 La phase de remodelage bronchique

La persistance de l'inflammation pulmonaire entraîne des modifications structurales au niveau des poumons réduisant progressivement, et de façon irréversible les fonctions respiratoires des patients. Sur le plan histopathologique, le remodelage bronchique se caractérise par une desquamation de l'épithélium accompagnée d'une augmentation de l'espace situé entre les cellules épithéliales basales, une hypertrophie et une hyperplasie du muscle lisse, une hypertrophie des cellules glandulaires, associée à une hypersécrétion de mucus et à une fragmentation des fibres d'élastine du tissu conjonctif. Un épaissement de la membrane basale, accompagné d'une fibrose sous-épithéliale, caractérisée par une augmentation du dépôt des protéines de la matrice extracellulaire, un déséquilibre entre l'expression des métalloprotéinases qui dégradent ces protéines et leurs inhibiteurs endogènes (les TIMP), et une accumulation de fibroblastes et de myofibroblastes activés sont aussi caractéristiques de cette pathologie. Cette fibrose s'accompagne d'une inflammation chronique de la muqueuse bronchique qui se manifeste notamment par une accumulation d'éosinophiles et par des lésions épithéliales persistantes (Bousquet et al., 2000; Jeffery, 2001). (Figure 2)

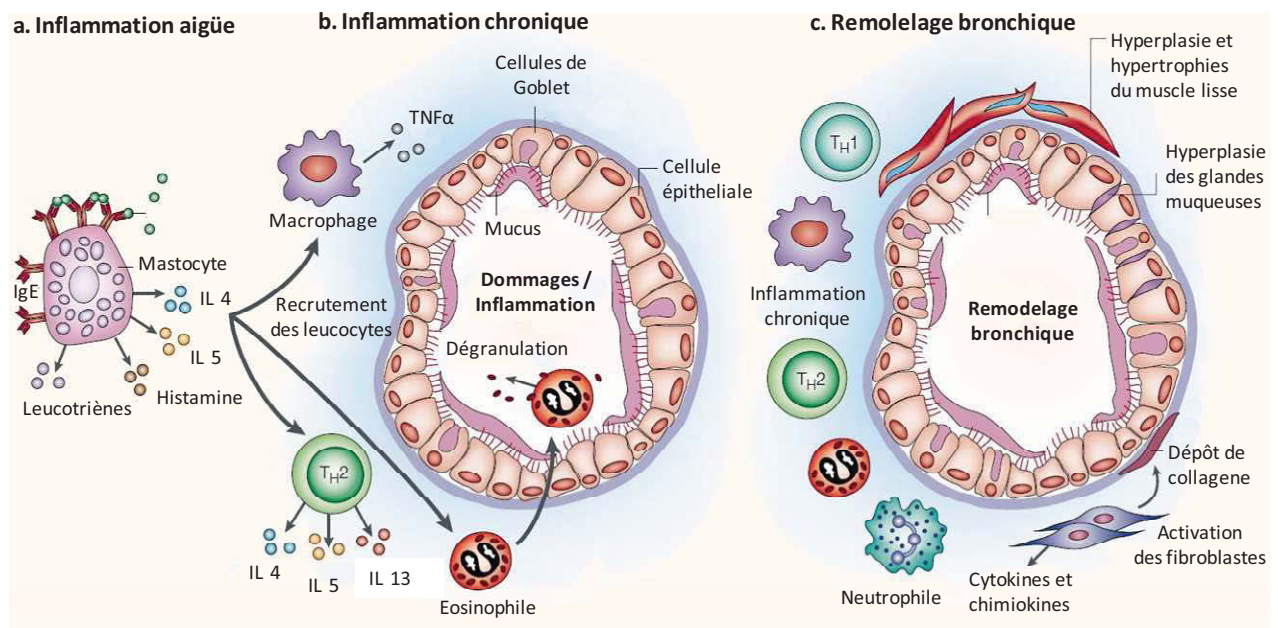


Figure 2: La réaction inflammatoire pulmonaire dans l'asthme allergique. L'asthme est une pathologie complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires et médiateurs de l'inflammation. Au cours de la phase aiguë de la maladie, les mastocytes sont responsables de l'hyper réactivité bronchique et du recrutement des cellules inflammatoires dans les poumons (a). Les éosinophiles, macrophages et lymphocytes Th2 recrutés produisent alors de nouveaux médiateurs créant une inflammation locale (b) qui aboutit dans certains cas à des modifications structurales et fonctionnelles des voies aériennes (c). Ce remodelage bronchique entraîne une obstruction et une insuffisance respiratoire irréversible. (D'après Busse W, 2002)

6. *Traitement de l'asthme allergique*

L'asthme, du fait de sa fréquence, de l'intensité des symptômes, des maladies associées, de la mortalité et du poids économique généré, représente un véritable problème de santé publique en France comme dans de nombreux pays. A défaut de pouvoir le guérir totalement, l'objectif des traitements est le contrôle de l'asthme, afin de prévenir les complications liées à la pathologie.

Deux grandes catégories de médicaments sont recommandées : les médicaments de traitement de fond ou de prévention, et les médicaments de traitement de crise. Le choix de la médication dépend de la sévérité de la maladie et de la fréquence des crises.

Classiquement, le traitement de fond comprend des anti-inflammatoires comme les glucocorticoïdes inhalés et oraux ou des antagonistes des récepteurs aux leucotriènes, associés ou non à des bronchodilatateurs à longue durée d'action (Walsh, 2008). Les glucocorticoïdes sont très efficaces dans le traitement des allergies grâce à leur capacité à inhiber le recrutement des cellules pro-inflammatoires et à réduire la production des médiateurs de l'inflammation. Cependant, ces traitements ne sont pas spécifiques et peuvent induire des effets indésirables comme des troubles métaboliques et endocriniens et une sensibilité accrue aux infections.

En cas de crise d'asthme, le traitement d'urgence est basé sur l'utilisation d'agonistes de type β_2 adrénergiques en inhalation, comme le Salbutamol (Ventoline®). Ces bronchodilatateurs agissent rapidement sur le muscle bronchique permettant de soulager instantanément les patients.

L'Omalizumab®, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre les récepteurs aux IgE, est prescrit en cas d'asthme sévère. Ce traitement s'est révélé très efficace chez des patients atteints d'asthme résistant aux glucocorticoïdes, et a permis de réduire la fréquence des exacerbations et d'améliorer les fonctions pulmonaires (Busse, 2001; Schulman, 2001).

De nouveaux traitements sont actuellement à l'étude, tels que les inhibiteurs de phosphodiesterases ou les inhibiteurs de cytokines et chimiokines. A l'exception des inhibiteurs du TNF α , la plupart des essais cliniques utilisant ces inhibiteurs se sont révélés décevants. De nouvelles études sont en cours pour tenter de réduire le recrutement cellulaire en neutralisant les molécules d'adhésions comme les sélectines, les intégrines ou les statines (Walsh, 2008).

7. Les modèles murins d'asthme allergique

Il existe différents modèles expérimentaux chez l'animal basés sur l'administration répétée d'un allergène. Le modèle le plus classique est obtenu par sensibilisation intra-péritonéale à l'ovalbumine en présence d'un adjuvant, le plus souvent l'hydroxyde d'aluminium, suivie d'une ou plusieurs provocations allergéniques par voie nasale (instillation) ou aérienne (aérosol). L'ovalbumine est par elle-même une protéine fortement immunogène et la co-administration d'adjuvant permet d'orienter la réponse Th2 (Brewer et al., 1999). Ce traitement induit, en fonction des modèles, de nombreux signes caractéristiques de la maladie asthmatique retrouvés chez l'Homme, incluant l'infiltrat d'éosinophiles, la production de médiateurs Th2, la dégranulation mastocytaire, l'hyperplasie des cellules de Goblet, la production d'IgE spécifiques de l'antigène et l'HRB en réponse à la métacholine. Des modèles d'asthmes chroniques ont également été mis au point en réalisant des provocations allergéniques pendant plusieurs semaines, et permettent d'étudier le remodelage des voies aériennes.

Le modèle d'asthme développé au laboratoire est basé sur l'administration sous-cutanée de l'ovalbumine en absence d'adjuvant (Figure 3). Cette voie permet une diffusion plus lente de l'allergène et facilite sa capture par les cellules dendritiques et les cellules de Langherans présentes en grand nombre sous la peau. L'absence d'adjuvant au moment des immunisations entraîne une réponse de plus faible amplitude, mais plus proche de la physiopathologie humaine. En effet, les modèles expérimentaux utilisant l'hydroxyde d'aluminium induisent une puissante réponse Th2 et une HRB indépendante des mastocytes et des IgE, mais dépendante de l'IL-13 (Taube et al., 2004a). Or, chez l'Homme, l'asthme allergique est le plus souvent dépendant des IgE, comme le prouve l'efficacité des traitements anti-IgE. De nombreux exemples illustrent les inconvénients des modèles expérimentaux utilisant l'hydroxyde d'aluminium, l'apparition d'une nécrose tissulaire au niveau du site d'injection, ou l'absence de différences phénotypiques entre souris sauvages et knock-out (Conrad et al., 2009; Eisenbarth, 2008; Schmitz et al., 2003). Il apparaît clair que l'utilisation d'adjuvants dans l'induction de l'asthme chez la souris biaise complètement la réponse immunitaire, masquant certains phénotypes.

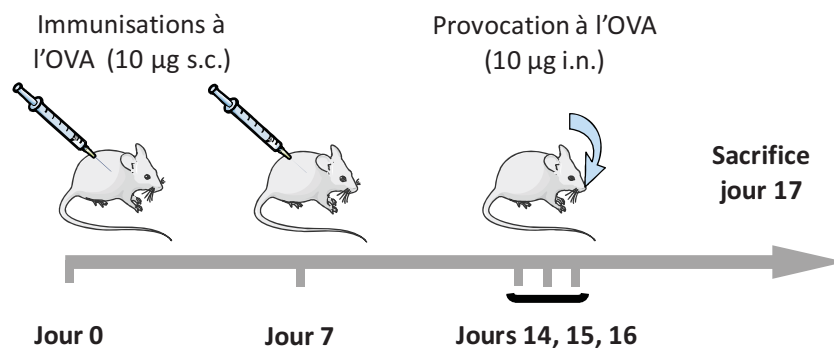


Figure 3 : Modèle expérimental murin d'inflammation pulmonaire allergique utilisé à l'Institut.

Plus récemment, des modèles dans lesquels l'allergène est administré par inhalation ont été développés. C'est le cas du modèle d'asthme allergique induit par un broyat d'acariens ou "house dust mite" (HDM). Les acariens contenus dans la poussière domestique sont une des premières causes de l'asthme dans les pays industrialisés. Dans ce modèle, l'allergène est un mélange de molécules dont certaines possèdent une activité protéase, telle la protéine Der p1 (Coyle et al., 1999; Kauffman et al., 2006). Des études ont montré que cette enzyme détruisait les jonctions serrées entre les cellules épithéliales en clivant les protéines de type claudine et occludine. Ceci a pour conséquence l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium pulmonaire et de la capture des antigènes par les cellules dendritiques (Hammad and Lambrecht, 2008; Willart and Hammad, 2010). De plus, un rôle important des "Toll-Like Receptor" (TLR) et des "protease-activated receptor" (PAR) a été mis en évidence dans ce modèle (Hammad et al., 2009).

La modélisation de l'asthme allergique chez la souris a permis d'élucider de nombreux mécanismes de l'inflammation pulmonaire et d'identifier les différents médiateurs chimiques ou cellulaires impliqués dans la physiopathologie asthmatique.

LES MEDiateurs CELLULAIRES DE L'ASTHME ALLERGIQUE

L'utilisation de modèles animaux, de provocation allergénique *in vitro* ou chez l'Homme ou encore l'analyse d'échantillons issus de sujets asthmatiques, ont permis de décrypter les différentes étapes de l'inflammation pulmonaire allergique. Les processus d'induction, d'amplification et de résolution de l'asthme allergique font intervenir un grand nombre de cellules immunitaires, telles les cellules dendritiques, les mastocytes, les basophiles, les éosinophiles, et les lymphocytes, mais également des cellules structurales comme les cellules épithéliales ou les cellules musculaires lisses. Dans cette partie, je développerai succinctement le rôle de chaque protagoniste cellulaire afin de comprendre les mécanismes inflammatoires mis en jeu au cours de l'asthme allergique chez l'Homme et la souris.

1. Les cellules dendritiques

En 1868, Langherans décrivait dans la peau des cellules hérissées de très nombreux prolongements cytoplasmiques: les cellules dendritiques (DC). Longtemps peu étudiées, elles ont pris une importance croissante en immunologie en raison de leur rôle fondamental dans le contrôle de l'immunité.

Les DC sont présentes en grand nombre dans les muqueuses et la peau où elles exercent la fonction de sentinelles en captant les antigènes d'origine exogène ou endogène. Au niveau pulmonaire, les DC sont situées sous l'épithélium bronchique et dans les tissus parenchymateux du poumon. L'expression de protéines de jonctions serrées de type claudine-1, claudine-2 ou zonula-occludine-1 (ZO-1) permet aux DC d'envoyer leurs dendrites ou de migrer à travers l'épithélium, et ainsi de sonder le contenu de la lumière bronchique tout en préservant l'intégrité de l'épithélium (Lambrecht and Hammad, 2009; Sung et al., 2006) (Figure 4).

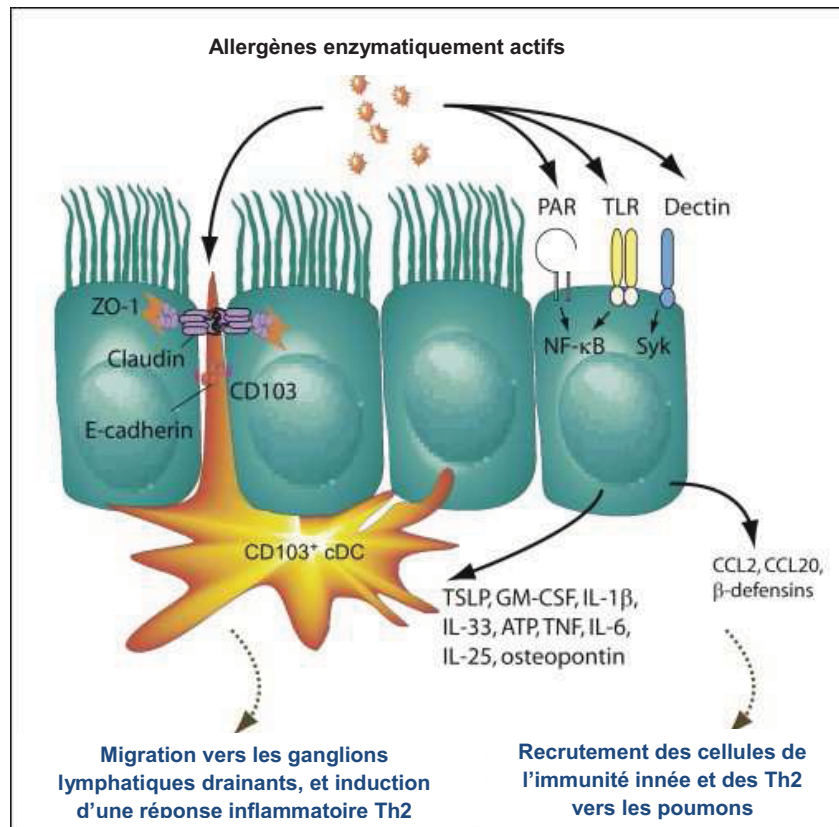


Figure 4 : Capture des allergènes par les cellules dendritiques et induction de la réponse immune. Les DC sondent la lumière des alvéoles pulmonaires par des extensions dendritiques entre les cellules épithéliales. L'intégrité de la paroi épithéliale est maintenue grâce aux jonctions serrées qui s'établissent entre les DC et les cellules épithéliales via des protéines de type claudine, zonula-occludine-1 (ZO-1), ou des E-cadhérines. Certains allergènes enzymatiquement actifs peuvent activer directement les récepteurs PAR ou les TLR exprimés par les cellules épithéliales, ce qui induit l'activation de NFκB et la production de cytokines et chimiokines d'attraction des DC ou des lymphocytes Th2. (D'après Hammad, H, 2009)

Les DC pulmonaires capturent les antigènes inhalés et migrent vers les ganglions lymphatiques médiastinaux par un processus faisant intervenir les récepteurs CCR7 et CCR8. Au cours de leur migration, les DC catabolisent les antigènes capturés et présentent les peptides antigéniques à leur surface grâce au CMH de classe II. Dans le paracortex des ganglions, l'engagement du TCR induit l'expression du CD40L à la surface des lymphocytes T, qui interagit alors avec le CD40 exprimé à la surface des DC. Cette interaction conduit à l'expression de molécules de co-stimulation de la famille B7 à la surface des DC, et plus particulièrement du CD80 et du CD86 (Banchereau et al., 2000; Jaiswal et al., 1996) interagissant avec le CD28 et le CTLA-4 à la surface des cellules T (Figure 5).

La durée d'interaction, les signaux de co-stimulation et l'environnement pro-inflammatoire sont déterminants pour une activation complète des lymphocytes T qui sont alors capables de proliférer et de se différencier (Croft, 2003). En l'absence de signaux inflammatoires, les DC ayant capturés des antigènes inoffensifs, n'expriment pas suffisamment les molécules de co-stimulation et sont incapables d'activer correctement les cellules T, ce qui aboutit à une tolérance de l'antigène.

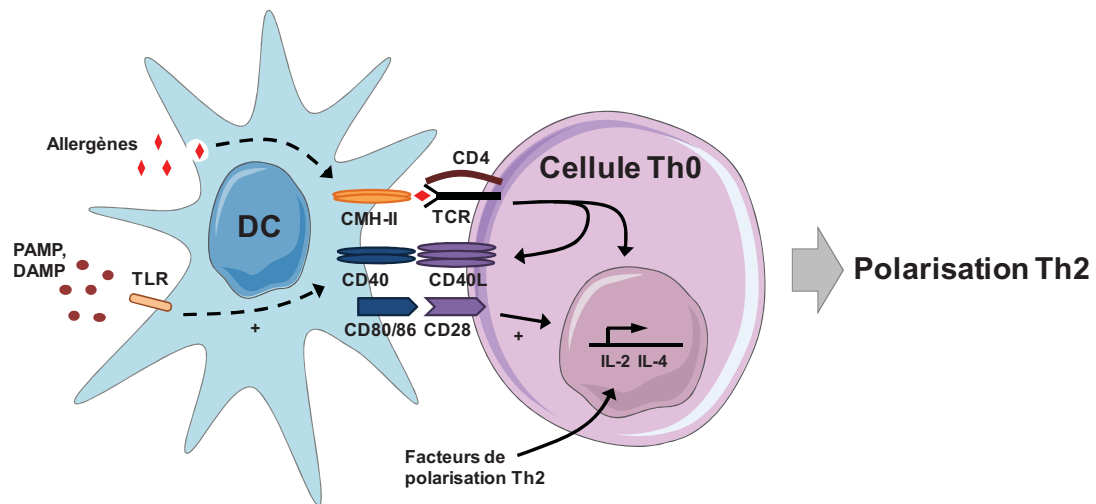


Figure 5 : La synapse immunologique entre les cellules dendritiques et les cellules T.

Les DC pulmonaires expriment de nombreux récepteurs, tels que les récepteurs TLR ou des récepteurs de la famille des lectines de type C, et sont ainsi capables de reconnaître les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les signaux de danger ou de stress libérés par les cellules endommagées (DAMP). Ces signaux jouent le rôle d'adjuvants dans la réponse en entraînant l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation sur les DC et la production de chimiokines telles CCL17 et CCL22 qui recrutent les cellules T, les granulocytes éosinophiles et basophiles au niveau pulmonaire (Lambrecht, 2006).

Différentes études réalisées chez la souris ont montré que les DC, plus que les macrophages alvéolaires, jouaient un rôle majeur dans l'induction de l'asthme. En effet, dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine, la déplétion des cellules CD11c+ (DC et macrophages alvéolaires) dans les poumons inhibe complètement les caractéristiques de la maladie. Le transfert de cellules dendritiques, mais pas celui de macrophages, permet de restaurer l'asthme (van Rijt et al., 2005). D'autres études ont montré que le transfert à des souris naïves de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) préalablement stimulées avec l'allergène, était suffisant pour induire une inflammation pulmonaire allergique après provocation avec le même allergène (Bedoret et al., 2009; Idzko et al., 2007; Pouliot et al., 2010). L'ensemble de ces résultats indiquent que les DC pulmonaires sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA) pulmonaires et sont nécessaires non seulement à la mise en place d'une réponse Th2, mais aussi lors de la phase effectrice (Figure 6).

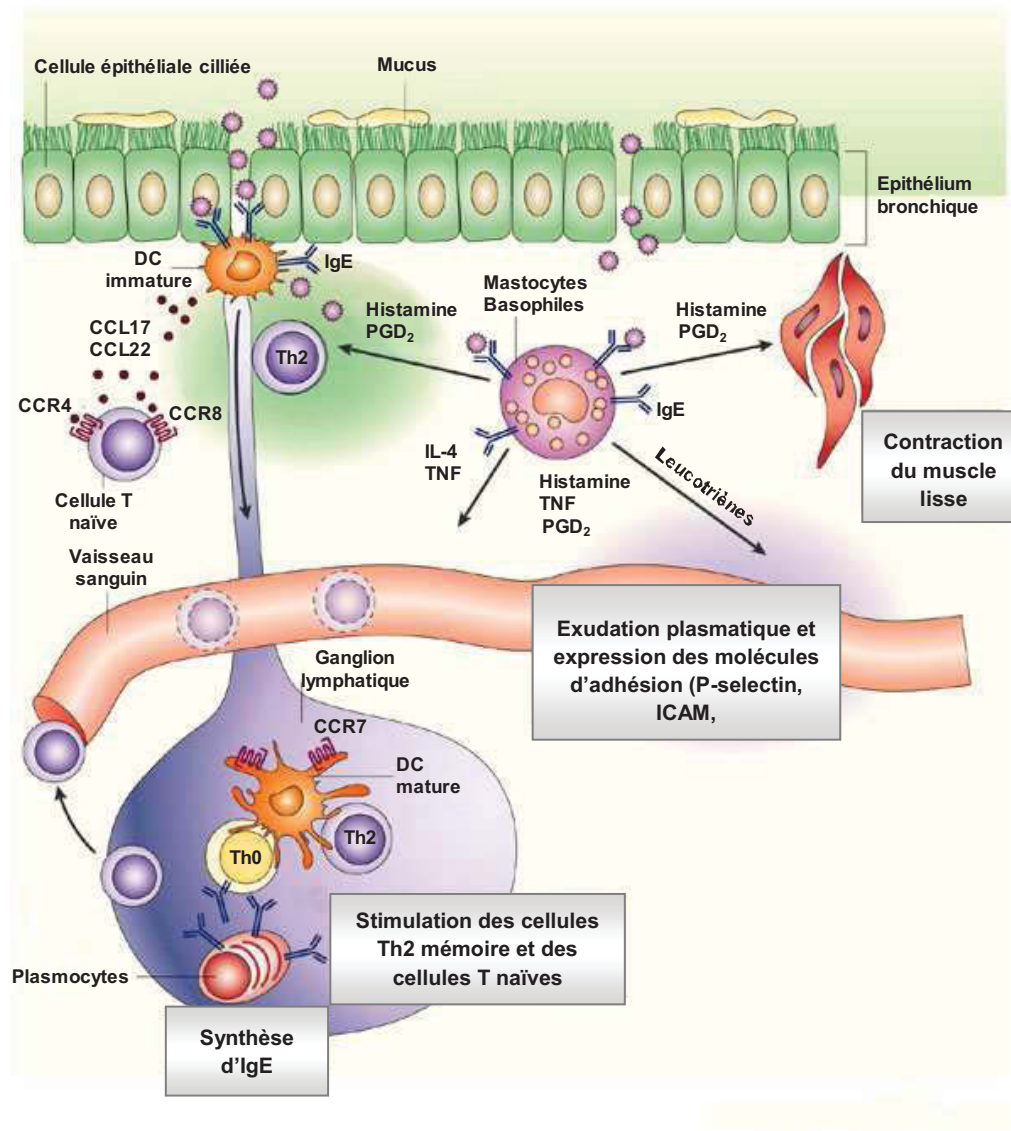


Figure 6 : Rôles des cellules dendritiques au cours de la phase effectrice de l'asthme allergique. Au cours de la phase d'immunisation, les IgE spécifiques de l'allergène produites par les plasmocytes, peuvent se fixer au récepteur FcεR1 sur les mastocytes, les basophiles, et les cellules dendritiques. Lors d'un nouveau contact avec l'allergène, celui-ci est rapidement reconnu par ces IgE entraînant l'activation de ces cellules et la libération de nombreux médiateurs de l'inflammation allergique. Les cytokines et les chimiokines produites par les cellules dendritiques participent au recrutement des lymphocytes Th2, elles-mêmes à l'origine de l'inflammation éosinophilique. (D'après Lambrecht B, 2003)

2. Les mastocytes

Les mastocytes jouent un rôle central dans la réaction d'hyperréactivité bronchique de part leur capacité à dégranuler en réponse à des signaux de la réponse adaptative (comme les IgE) ou innée (PAMP, fraction du complément) ou suite à une augmentation de la ventilation durant un exercice physique (asthme à l'effort) (Prussin and Metcalfe, 2006; Venkatesha et al., 2005).

Les mastocytes sont recrutés au niveau pulmonaire par le facteur de croissance SCF (aussi connu sous le nom de Kit-ligand) libéré par les cellules épithéliales, qui se lie au récepteur c-Kit (CD117) exprimé par les mastocytes (Reber et al., 2006).

En plus de la libération d'histamine et de leucotriènes, les mastocytes produisent une multitude de cytokines (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-16, TNF et TGF β) et de chimiokines (CXCL8, lymphotactin, CCL1, CCL5, CCL-2, CCL3) (Galli et al., 2005).

Les souris déficientes en mastocytes (lignées W/W^v et FC ϵ R1^{-/-}) présentent des symptômes atténués avec réduction de l'HRB, de l'inflammation pulmonaire et des taux d'IgE sériques comparativement à des souris sauvages (Taube et al., 2004b; Williams and Galli, 2000).

3. Les basophiles

Les basophiles sont des granulocytes circulants qui expriment le récepteur à haute affinité pour les IgE, Fc ϵ R1, ainsi que l'intégrine CD49b (DX5) mais pas le récepteur c-Kit. A l'instar des mastocytes, ils amplifient la réaction d'hypersensibilité immédiate en sécrétant l'histamine préformée dans les granules et en produisant de larges quantités d'IL-4 (Barrett and Austen, 2009).

Récemment, différentes études ont montré dans un modèle d'infection aux helminthes et dans un modèle d'allergie induit par injection de papaïne que les basophiles pourraient jouer un rôle critique dans l'induction de la réponse Th2 grâce à l'expression du CMH de classe II, des molécules de co-stimulation et à la production de cytokines Th2 (IL-4 et/ou TSLP) (Perrigoue et al., 2009; Sokol et al., 2009; Yoshimoto et al., 2009). *In vitro*, la co-culture de cellules T issues de souris transgéniques pour le TCR à l'ovalbumine (souris DO11.10) avec des basophiles dérivés de la moelle osseuse en présence du peptide OVA conduit à une différenciation Th2 des lymphocytes, dépendante du CMH de classe II (Sokol et al., 2009). *In vivo*, le transfert de basophiles à des souris sauvages ou déficientes pour le CMH de classe II (souris Ciita^{-/-}) suivi de provocations avec l'antigène induit une production d'IL-4 par les CD4⁺ identique. Au contraire, la déplétion des basophiles par administration d'anticorps neutralisants réduit la réponse Th2 (Perrigoue et al., 2009; Yoshimoto et al., 2009).

Cependant, une nouvelle étude indique que les basophiles ne seraient pas impliqués dans l'induction de la réponse Th2 dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique induit par HDM (Hammad et al., 2010). En effet, cette étude révèle que les basophiles présentent une faible capacité à capturer l'allergène, et sont incapables d'induire la prolifération de cellules T spécifiques de l'antigène, ou la production de cytokines Th2 *in vitro*. De plus, le transfert de basophiles issus d'animaux immunisés à l'HDM à des souris réceptrices ne permet pas le recrutement éosinophilique et neutrophilique après provocation avec l'allergène. Au contraire, les souris ayant reçu des cellules dendritiques génèrent

une forte inflammation pulmonaire. L'incapacité des basophiles à induire une réponse Th2 proviendrait d'une expression insuffisante du CMH de classe II et de la chaîne invariante nécessaire au transport et à l'assemblage des chaînes α et β des molécules du CMH de classe II. Dans ce modèle d'inflammation pulmonaire, les cellules dendritiques sont nécessaires et suffisantes pour initier la réponse inflammatoire de type 2. Les basophiles participeraient plutôt à l'amplification de la réponse Th2 consécutivement à la production de médiateurs chimiques par les cellules dendritiques ou les cellules épithéliales activées par HDM (Willart and Hammad, 2010).

En résumé, la fonction de présentation d'antigène par les basophiles a été montrée chez la souris dans des modèles d'inflammation cutanée et intestinale, mais ne semble pas être nécessaire dans l'induction de l'inflammation pulmonaire allergique induite par HDM. Ces divergences peuvent s'expliquer par des protocoles expérimentaux très différents, la nature des allergènes ou les voies d'administration utilisées.

4. Les éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles sont les principaux médiateurs de la réponse asthmatique tardive. Après activation par l'IL-5, les éosinophiles circulants sont recrutés sur le site de l'inflammation grâce à des cytokines telles que le GM-CSF, le TNF α , l'IL-13 et l'IL-4 et à certaines chimiokines telles CCL11 et CCL24, CCL3, CCL22 (Lampinen et al., 2004).

Après activation et recrutement au niveau pulmonaire, les éosinophiles exercent leur rôle pro-inflammatoire en relâchant des cysteinyl leucotriènes mais également des cytokines Th1 (IFN γ et IL-2) et Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et TNF α) (Rothenberg and Hogan, 2006).

L'implication des éosinophiles dans la réaction d'hyper réactivité bronchique n'est, à ce jour, pas établie chez l'Homme, puisque l'administration d'anticorps neutralisant dirigés contre l'IL-5 permet de réduire de façon notable le nombre d'éosinophiles dans le sang et les sécrétions bronchiques, mais n'a pas d'incidence sur le l'HRB ou les symptômes de l'asthme (Flood-Page et al., 2007; Leckie et al., 2000).

En présence de GM-CSF, les éosinophiles expriment le CMH de classe II et les molécules de co-stimulation et peuvent alors fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigènes (Lucey et al., 1989; MacKenzie et al., 2001). Chez la souris, dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine, le transfert d'éosinophiles préalablement chargés avec l'antigène est suffisant pour induire une production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les lymphocytes Th2 (MacKenzie et al., 2001).

5. Les neutrophiles

Ils jouent un rôle clé dans l'immunité innée et la protection contre les agents infectieux. Ils peuvent également être responsables de dommages locaux lorsqu'ils s'accumulent au niveau du site inflammatoire. Un recrutement important de neutrophiles est parfois observé dans certaines formes d'asthme sévère (Douwes et al., 2002). On parle alors d'asthme neutrophilique. D'origine non atopique, cette forme d'asthme est indépendante des IgE et des éosinophiles et est résistante aux traitements à base de corticostéroïdes.

6. Les lymphocytes B

Les taux d'IgE circulantes sont considérablement augmentés chez les patients allergiques (Postma and Lebowitz, 1995). La production d'IgE par les lymphocytes B activés ou plasmocytes est une étape essentielle dans la pathogénèse de l'asthme. L'activation des lymphocytes B nécessite deux signaux. Dans un premier temps, l'IL-4 stimule la synthèse de la chaîne lourde des IgE. Puis l'interaction du CD40L exprimé par les lymphocytes T activés, avec le CD40 exprimé par les lymphocytes B, active le réarrangement V (D) J permettant la production d'IgE spécifiques de l'allergène et l'expansion des cellules B (Lindell et al., 2008) (Figure 7).

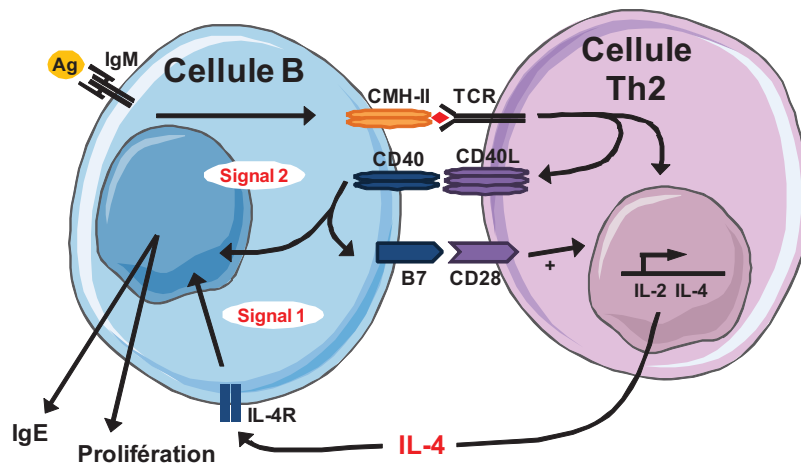


Figure 7 : Interaction entre les lymphocytes B et T. Deux signaux sont nécessaires à la production d'IgE par les cellules B. Dans un premier temps, les lymphocytes B captent l'IL-4 produite par les lymphocytes T ou les éosinophiles au niveau du site d'inflammation. Ceci entraîne la transcription de la chaîne lourde des IgE. Puis, l'interaction CD40-CD40L induit la bascule isotypique et la production d'IgE spécifiques de l'allergène. De plus, la présence de récepteurs de basse affinité pour les IgE (FcεRII ou CD23) à la surface des lymphocytes B crée une boucle de régulation positive des IgE. Après internalisation, les antigènes sont présentés aux lymphocytes T via le CMH-II. L'interaction subséquente de B7 avec le CD28 exprimés par les cellules T favorise la synthèse des cytokines et la prolifération des cellules B. Ces différents mécanismes amplifient la réponse humorale via l'expansion clonale des lymphocytes B. (D'après Hans C, 1999)

Depuis quelques années, l'existence d'une population de lymphocytes B régulateurs (Breg), produisant de l'IL-10, a été mentionnée. Il a été montré que ces cellules réduisaient l'inflammation dans des modèles murins d'encéphalomyélite auto-immune (EAE), d'inflammation intestinales (IBD), d'anaphylaxie ou d'arthrite induite par le collagène (Tedder and Matsushita, 2010). Les Breg se caractérisent par l'expression de $CD19^{high}CD5^{+}CD1d^{high}$ et par la production d'IL-10, et représentent 1 à 2 % des lymphocytes B de la rate (Amu et al., 2010). Des travaux récents ont révélé un rôle bénéfique des Breg dans l'asthme allergique induit par l'ovalbumine. Dans cette étude, le transfert de cellules Breg à des souris immunisées et provoquées à l'ovalbumine réduit l'inflammation allergique pulmonaire par un mécanisme dépendant de l'IL-10 et des Treg (Amu et al., 2010). Cependant, les mécanismes d'action des Breg et leur implication chez l'Homme restent à éclaircir.

7. Les lymphocytes T

L'identification de deux sous-populations de lymphocytes T $CD4^{+}$ Th1 et Th2, par Coffman et Mossman dans les années 1980, a permis une avancée formidable dans la compréhension des fonctions des cellules T et de leur rôle en pathologie (Mosmann et al., 1986).

Classiquement, l'asthme allergique est attribué à une exacerbation de la réponse Th2. Cependant, cette vision minimaliste se heurte à certaines contradictions, telles que la présence de neutrophiles dans certains types d'asthme, ou les résultats décevants des thérapies anti-IgE ou anti-cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-13) chez l'Homme, ou encore l'exacerbation de l'asthme en cas d'infections virales. Ces observations, appuyées par des découvertes récentes en immunologie, permettent aujourd'hui de considérer l'asthme comme une maladie complexe et hétérogène faisant intervenir non seulement la réponse Th2, mais également les réponses Th17, Th9 et Treg.

7.1 Les lymphocytes Th1 et Th2 : le paradigme classique

La différenciation des lymphocytes Th0 vers l'une ou l'autre composante s'effectue après interaction du TCR avec le CMH-II des cellules présentatrices d'antigènes et dépend de l'environnement pro inflammatoire (Figure 8).

Brièvement, les lymphocytes Th1 sont obtenus en présence d'IL-12 et se caractérisent par la production d'interféron- γ (IFN γ) et de lymphotoxines sous la dépendance du facteur de transcription T-bet. Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans les réponses immunes à médiation cellulaire, et plus particulièrement dans les processus immunitaires déclenchés contre des micro-organismes intracellulaires (mycobactéries et virus par exemple).

Les lymphocytes Th2 sont obtenus en présence d'IL-4 et sont impliqués dans les réponses allergiques, la lutte contre les micro-organismes extracellulaires et les infections parasitaires. Ces lymphocytes se caractérisent par leur capacité à sécréter les cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-25 (Romagnani, 2004), les chimiokines CCL1 et CCL2 (Smit and Lukacs, 2006) et à exprimer les récepteurs à l'IL-4 (IL-4R α), l'IL-2 (IL-2R α) et l'IL-33 (T1/ST2) (Smith, 2005; Zhu and Paul, 2008).

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

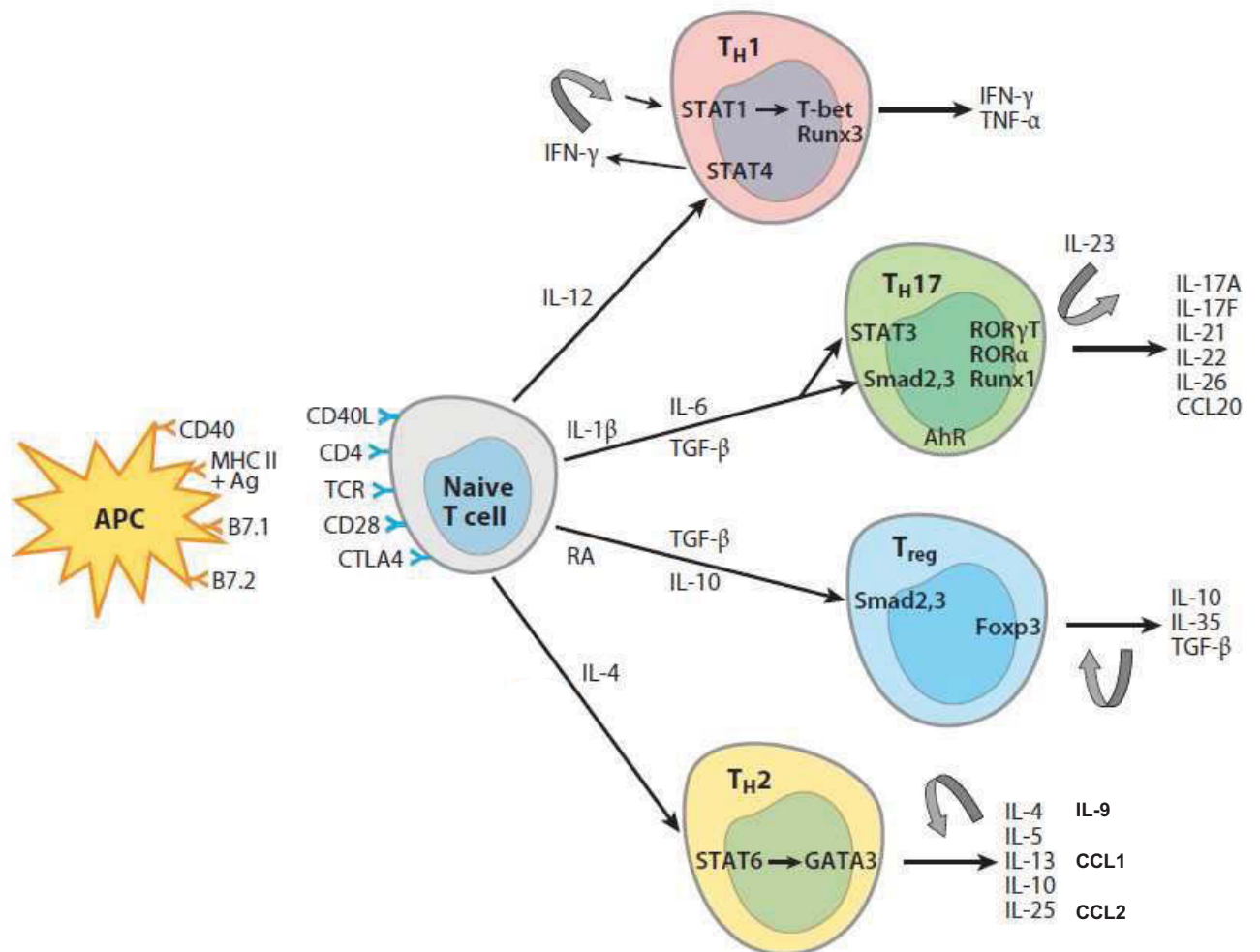


Figure 8 : Différenciation des cellules T naïves. L'environnement inflammatoire oriente la polarisation des lymphocytes au cours de la réponse inflammatoire. La voie de signalisation et les facteurs de transcription spécifiques à chaque lignée sont inscrits dans les cellules. Le profil cytokinique de chaque type cellulaire est indiqué, ainsi qu'un éventuel effet autocrine ou paracrine (flèche grise). (D'après Kolls JK, 2010)

Chez les sujets asthmatiques, on observe une infiltration pulmonaire de lymphocytes CD4⁺ dotés d'un profil cytokinique de type Th2 (Robinson et al., 1992; Robinson et al., 1993). Ces cellules jouent un rôle pivot dans la pathogénèse de l'asthme en orchestrant le recrutement et l'activation des cellules effectrices primaires (mastocytes et éosinophiles) à travers la sécrétion de cytokines telles

l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'infiltration des lymphocytes Th2 dans les voies aériennes est corrélée avec la sévérité de la maladie (Robinson et al., 1993; Walker et al., 1991).

Des expériences de transfert de lymphocytes Th2 issus de souris transgéniques DO11.10 (exprimant le TCR spécifique de l'ovalbumine) suivi de provocations à l'ovalbumine, induit le développement d'une HRB et d'une inflammation pulmonaire allergique (éosinophilie et cytokines Th2) dans le BAL (Cohn et al., 1999; Cohn et al., 1997; Cohn et al., 1998).

Contrairement aux lymphocytes Th2, le transfert de cellules Th1 spécifiques à l'ovalbumine à des souris naïves, suivi de provocations à l'ovalbumine, n'induit pas d'HRB, ni d'inflammation pulmonaire allergique (Cohn et al., 1997; Cohn et al., 1998). Par ailleurs, le transfert de cellules Th1 conjointement à celui de lymphocytes Th2 permet de réduire l'éosinophilie, la production de mucus, ainsi que la production d'IL-5 et d'IL-13 dans le BAL (Cohn et al., 1999).

De même, des souris déficientes pour le facteur de transcription T-bet développent spontanément les caractéristiques de l'asthme allergique, incluant l'HRB, l'infiltration éosinophilique et le remodelage bronchique (Finotto et al., 2002). Ces résultats illustrent l'importance de la balance Th1/Th2 dans le développement de la réponse inflammatoire allergique.

7.2 Les lymphocytes T régulateurs: indispensables au contrôle de l'immunité

La muqueuse respiratoire est en permanence exposée à divers antigènes aériens non pathogènes et des molécules immunostimulatrices d'origine bactérienne, comme le LPS, présents dans l'environnement. Pourtant, seulement une faible proportion de la population développe un asthme allergique. Cette disparité peut s'expliquer par un dysfonctionnement des lymphocytes T régulateurs dont le rôle est de maintenir l'état de tolérance vis-à-vis d'antigènes inoffensifs.

Obtenus *in vitro* par culture de lymphocytes CD4⁺ naïfs en présence de TGFβ, les Treg se caractérisent par la forte expression du marqueur de surface CD25 (chaîne β du récepteur à l'IL-2), par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et par la production d'IL-10 et de TGFβ (Palomares et al., 2010). Les nombreuses fonctions immuno-suppressives des Treg dans l'asthme allergique sont présentées dans la figure 9.

Dans un modèle murin de sensibilisation et de provocation allergénique par l'ovalbumine, le transfert par voie intratrachéale de cellules T CD4⁺ CD25⁺ avant les provocations allergéniques réduit l'HRB, le recrutement d'éosinophiles et la production de cytokines Th2 dans le BAL et le tissu pulmonaire, par un mécanisme dépendant de IL-10 et du TGFβ (Joetham et al., 2007). Chez l'enfant asthmatique, le nombre et la fonction des cellules T CD25⁺ FoxP3⁺ dans le BAL sont réduits comparativement à des sujets sains (Hartl et al., 2007). Ainsi, une dérégulation des lymphocytes Treg pourrait entraîner une rupture de la tolérance et la mise en place d'une réponse immune allergique.

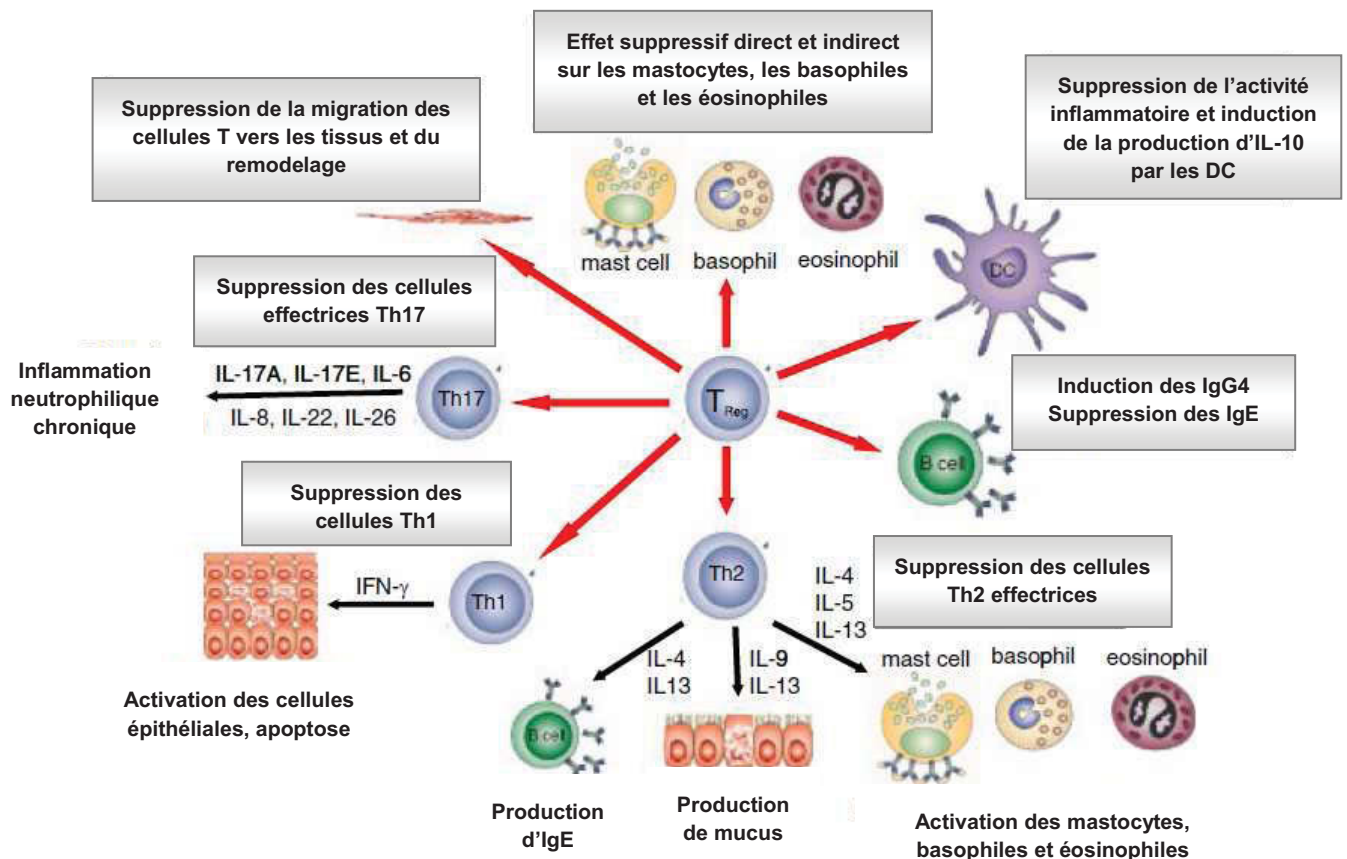


Figure 9 : Fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs dans l'asthme allergique.
 Les flèches rouges indiquent un effet régulateur ou suppressif exercé directement ou indirectement par les Treg. Les flèches noires montrent les fonctions effectrices des lymphocytes Th1, Th2 et Th17. (D'après Palomares O, 2010)

7.3 Les lymphocytes Th17 : entre immunité mucoale et auto-immunité

Plus récemment, une nouvelle catégorie de cellules T effectrices, distinctes des Th1, Th2 et Treg, a été mise en évidence : les Th17 (Harrington et al., 2005; Harrington et al., 2006; Park et al., 2005b).

In vitro, il est possible de différencier des cellules CD4⁺ naïves humaines ou murines en Th17 en les cultivant en présence d'IL-6, de TGF β et d'IL-1 β . Après différenciation, ces cellules se caractérisent par la production d'IL-17, d'IL-17F, d'IL-21, d'IL-22 et d'IL-23, ainsi que par l'expression spécifique du facteur de transcription ROR γ T (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Burgler et al., 2009). Bien que non indispensable à la différenciation Th17, l'IL-21 semble agir comme un facteur autocrine d'amplification et de maintien de ce lignage (Coquet et al., 2008; Louten et al., 2009; Sonderegger et al., 2008). Différentes études ont mis en lumière un rôle crucial de l'IL-23 dans le maintien, mais aussi dans la pathogénicité des lymphocytes Th17 (Langrish et al., 2005; McGeachy et al., 2007). L'IL-23 est également produite par les macrophages et cellules dendritiques en réponse à divers stimuli (LPS, TNF α , motifs CpG, allergènes), et peut alors participer au développement des Th17 et à la sécrétion des cytokines associées.

Depuis leur découverte en 2005, ces cellules ont été associées à de nombreuses pathologies inflammatoires, telle que l'arthrite rhumatoïde, la sclérose multiple, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, le psoriasis et l'asthme (Korn et al., 2009). L'implication des lymphocytes Th17 dans le recrutement des neutrophiles dans l'asthme sévère est bien connue (Hellings et al., 2003). Plus récemment, il a été démontré que l'axe IL-23/Th17 participait au recrutement des cellules Th2 et à l'inflammation éosinophilique au cours de l'asthme allergique (Wakashin et al., 2008). Le transfert de cellules Th17 spécifiques de l'antigène à des souris préalablement immunisées augmente l'inflammation éosinophilique pulmonaire par un mécanisme dépendant des Th2 (Wakashin et al., 2008). La pathogénicité des Th17 provient en grande partie de la production d'IL-17A. La caractérisation de cette cytokine dans l'asthme allergique a fait l'objet de plusieurs études chez la souris, qui ont donné lieu à des résultats contradictoires en fonction du modèle expérimental utilisé (Nakae et al., 2002; Schnyder-Candrian et al., 2006; Song et al., 2008; Wakashin et al., 2008).

7.4 Les lymphocytes Th9 et Th22 : les derniers arrivés

Au cours des derniers mois, deux nouvelles populations de lymphocytes sont apparues dans la littérature : Les Th9 et les Th22. Ces populations lymphocytaires se distinguent des composantes déjà établies par la production respective d'IL-9 et d'IL-22, ainsi que par l'absence d'expression des facteurs de transcription classiques des Th1, Th2, Th17 ou Treg.

Relativement bien caractérisés *in vitro*, la régulation et les fonctions des Th9 sont encore mal connues *in vivo*. *In vitro* l'IL-4 seule polarise les cellules T naïves vers le lignage Th2. La stimulation de cellules T naïves avec de l'IL-4 en présence de TGF β favorise la production d'IL-9 et inhibe la production des cytokines Th2 classiques IL-4, IL-5 et IL-13 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008b). Contrairement aux cellules Th2, les Th9 n'expriment que faiblement le facteur de transcription GATA3. Des travaux récents réalisés chez la souris suggèrent que la production d'IL-9 par les Th9 serait sous la dépendance des facteurs de transcription PU.1 et IRF4 (Chang et al., 2010; Staudt et al., 2010). Dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique, des souris, dont les lymphocytes sont déficients en PU.1, développent des caractéristiques atténuées de l'asthme, en accord avec une réduction de la production d'IL-9. Chez l'Homme, l'expression de l'IL-9 est augmentée dans les poumons de patients asthmatiques (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008b). De même, les cellules mononuclées du sang périphérique isolées de patients atteints de maladies atopiques, produisent plus d'IL-9 que des cellules isolées de sujets sains (Chang et al., 2010). A la lumière de ces récentes publications, il apparaît évident que les Th9 interviennent au côté des Th2 dans l'initiation de l'asthme allergique.

Deux équipes indépendantes ont identifié en 2009 une nouvelle classe de lymphocytes T mémoire, les Th22, à partir du sang périphérique de volontaires sains. (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009). Ces cellules se distinguent par l'expression des récepteurs CCR4, CCR6 et CCR10 et par la production d'IL-22, mais pas d'IL-4, d'IL-17 ou d'IFN γ . Aucun facteur de transcription spécifique n'a pu à ce jour être identifié. L'expression de CCR4 et CCR10 suggère que ces cellules seraient majoritairement impliquées dans les pathologies de la peau. C'est pourquoi, les Th22 ne seront plus mentionnés au cours de cette thèse.

8. Les cellules NKT

Les NKT font le lien entre l'immunité innée et adaptative. En effet, elles reconnaissent par leur TCR les glycolipides présentés par le CD1d (ou CD1.1 chez la souris) des cellules présentatrices d'antigènes, et sont ensuite capables de produire rapidement des cytokines de type Th1 ou Th2 en fonction de l'environnement inflammatoire. Cette capacité à orienter la réponse immunitaire explique probablement leur rôle controversé dans l'asthme allergique. Parmi les différentes catégories de NK, les plus étudiés dans l'asthme sont les iNKT qui expriment un TCR invariant (V α 24-J α 18 chez l'Homme ou V α 14-J α 18 chez la souris).

Dans plusieurs modèles d'inflammations pulmonaires allergiques chez la souris, les iNKT sont indispensables au développement de l'HRB, tandis que les souris déficientes en iNKT (souris J α 18^{-/-}) sont protégées de l'HRB et présentent une réduction de l'éosinophilie dans le BAL et des IgE spécifiques de l'ovalbumine dans le sérum après immunisation et provocation avec l'antigène (Akbari et al., 2003; Hachem et al., 2005; Terashima et al., 2008). La production de cytokines Th2 par les cellules iNKT est sous la dépendance de l'IL-25 qui se lie à son récepteur, l'IL-17RB, sur les iNKT (Stock et al., 2009; Terashima et al., 2008).

A l'inverse, d'autres études ont montré que sous certaines conditions d'activation, les cellules iNKT peuvent inhiber la réaction pulmonaire allergique par un mécanisme dépendant de l'IFN γ . Dans ces modèles murins de sensibilisation et de provocation à l'ovalbumine, l'administration d' α -Galactosyl-céramide, un ligand du TCR des iNKT, au moment des challenges, inhibe l'inflammation pulmonaire allergique et le développement de l'HRB (Hachem et al., 2005; Matsuda et al., 2005). Les études menées chez l'Homme montrent que le nombre de cellules iNKT retrouvé dans le BAL de patients asthmatiques est corrélé avec l'intensité de la maladie (Matangkasombut et al., 2009; Reparon-Schuijt et al., 2000). Une étude menée en 2006 montrait que les cellules iNKT pulmonaires isolées de sujets asthmatiques produisaient rapidement de l'IL-4 et de l'IL-13, mais pas d'IFN γ après restimulation avec α -Galactosyl-céramide *ex vivo* (Akbari, 2006). L'ensemble de ces observations

suggère que les cellules iNKT participent à la pathophysiologie de l'asthme en produisant des cytokines Th2.

9. Les lymphocytes $\gamma\delta$

Les lymphocytes $\gamma\delta$ sont généralement associés à l'immunité innée. En effet, ils ont la faculté de reconnaître directement certains motifs d'agents pathogènes ou certains signaux de danger grâce à des récepteurs de type TLR ou directement par leur TCR $\gamma\delta$ (Figure 10). Localisés essentiellement dans les tissus épithéliaux, ces cellules sont en permanence pré-activées, ce qui leur permet d'exercer leur fonction effectrice aussitôt après la détection de l'antigène (Bonneville et al., 2010).

Les lymphocytes exprimant le TCR $\gamma\delta$ représentent environ 10% des lymphocytes circulants. Cependant, cette proportion est augmentée chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde, de maladies intestinales chroniques ou dans l'épithélium pulmonaire de patients atteints d'asthme allergique (Spinozzi et al., 1998; Svensson et al., 2003). Pourtant, les mécanismes d'action de ces cellules sont assez mal connus.

Dans des modèles d'inflammation allergique pulmonaire induits par immunisation et provocation à l'ovalbumine, il a été montré que les lymphocytes $\gamma\delta$ participaient à l'inflammation Th2 par la production d'IL-4 qui stimulerait la production d'IgE et d'IgG1 par les plasmocytes (Schramm et al., 2000; Svensson et al., 2003; Zuany-Amorim et al., 1998). Ces études montrent une réduction de l'éosinophilie, de la production d'IL-5 et d'IL-4 chez les souris déficientes en TCR $\gamma\delta$, mais aucun effet sur l'HRB ou sur le recrutement des cellules T dans les poumons.

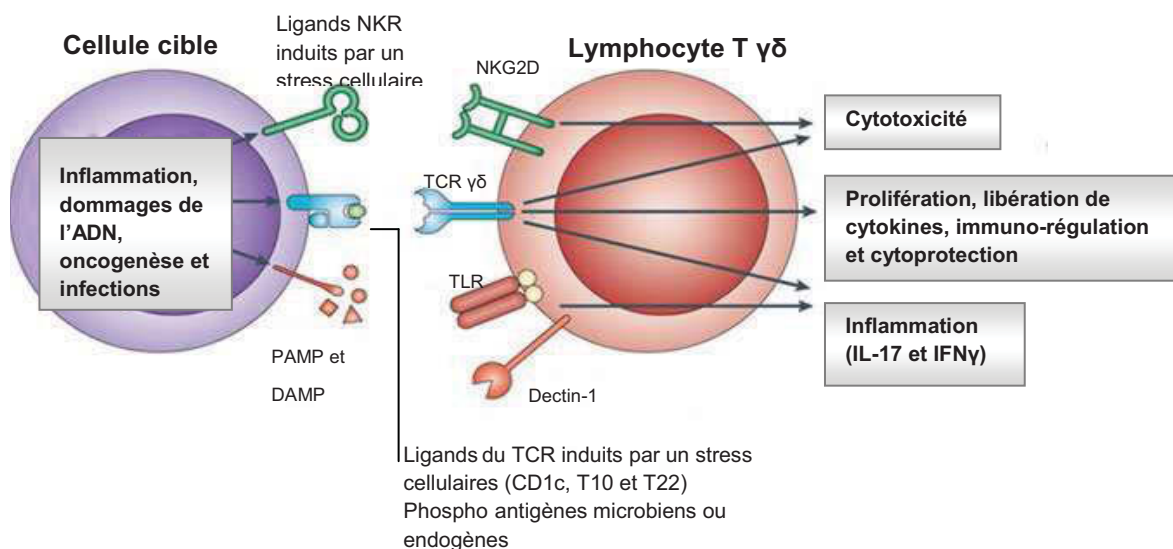


Figure 10 : Les 3 stimuli reconnus par les cellules T $\gamma\delta$. Certaines molécules CMH-I-like interagissent avec le TCR $\gamma\delta$ entraînant la prolifération et la sécrétion de cytokines. C'est le cas du CD1c chez l'humain ou de T10 et T22 chez la souris, ainsi que certains produits d'origine microbienne ou endogène. Les lymphocytes $\gamma\delta$ peuvent également reconnaître des motifs spécifiques des cellules infectées ou tumorales par le récepteur NKG2D et induire une réponse cytotoxique contre ces dernières. A ceci s'ajoute l'expression de récepteurs de l'immunité innée de type TLR reconnaissant les DAMP ou les PAMP. (D'après Bonneville M, 2010)

A l'inverse, d'autres études rapportent que la déplétion des cellules $\gamma\delta$ n'affecte pas l'inflammation pulmonaire allergique, ni la production d'IL-4 et d'IL-5 suggèrent que les lymphocytes $\gamma\delta$ ne sont pas indispensables à l'induction de l'asthme allergique (Lahn et al., 1999; Wang and HayGlass, 2000). Dans le modèle d'asthme allergique développé dans notre institut, nous avons observé une induction des lymphocytes T $\gamma\delta$ dans les poumons des souris après immunisation et challenge avec l'allergène. Environ 10% de ces cellules produisent de l'IL-17A après restimulation à la PMA/Ionomycine (résultats non publiés).

10. Le poumon, effecteur de la réponse immune

Après avoir longtemps négligé cette population, la communauté scientifique reconnaît aujourd'hui un rôle majeur des cellules structurales dans l'initiation des réponses immunitaires. Dans les poumons, les cellules structurales comprennent les cellules épithéliales bronchiques, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, et participent à l'homéostasie et la genèse de l'inflammation, notamment via la production de médiateurs inflammatoires.

10.1 L'épithélium bronchique

Ces cellules sont au contact direct des antigènes aériens qu'elles reconnaissent par des récepteurs de la famille des TLR ou des PAR.

10.1.1 Rôles des toll like receptors (TLR)

Les cellules épithéliales bronchiques expriment les TLR-1 à 6 qui sont capables de reconnaître de nombreux PAMP exprimés par les micro-organismes de l'environnement (Tableau 2).

Récepteur	Ligand	Source
TLR1	Triacyl, lipoprotéines	Bactéries et mycobactéries
TLR2	Acide lipotechoïque, zymosan, lipopeptides, lipoarabinomannan, LPS, peptidoglycan	Levures, mycobactéries, bactéries Gram $^-$ ou $^+$
TLR3	ARN simple brin viral	Virus
TLR4	Fibrinogène HSP 60 HSP 70, LPS, taxol, mannan	Bactéries Gram $^-$ endogènes, plantes, levures
TLR5	Flagelline	Bactéries
TLR6	Diacyl lipopeptides, acide lipoteichoic, zymosan	Mycoplasme et bactéries Gram $^+$, levures
TLR7/8	ARN simple brin, Imidazoquinoline	Virus
TLR9	ADN contenant des motifs CpG	Bactérie et virus

Tableau 2: Toll-like récepteurs, ligands et sources (D'après Vroiling AB, 2008)

L'interaction ligand-TLR active une voie de signalisation relativement bien conservée entre les différents TLRs, mettant en jeu la molécule adaptatrice MYD88 et les facteurs de transcription NFκB et AP-1 conduisant à la transcription de molécules pro-inflammatoires.

Des études ont montré un rôle crucial de l'axe TLR4/LPS dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire allergique. En effet, l'inhalation concomitante d'allergènes avec de faibles quantités de LPS favorise une réponse de type Th2, alors qu'en présence de fortes doses, le LPS induit une réponse Th1 (Eisenbarth et al., 2002). De même, dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique à HDM, la contamination de HDM par de faibles quantités de LPS est nécessaire à l'activation des cellules épithéliales qui produisent alors de l'IL-25, de l'IL-33, du TSLP, et du GM-CSF ainsi que la chimiokine CCL20 (Hammad et al., 2009). Ces molécules favorisent la survie et le recrutement des cellules inflammatoires (cellules dendritiques, basophiles et lymphocytes) et peuvent initier ou amplifier la réponse immunitaire innée et adaptatrice (Figure 11).

10.1.2 Rôle des protease activated receptor (PAR)

Les récepteurs de la famille PAR sont impliqués dans la reconnaissance des antigènes à activité enzymatique. Ces récepteurs peuvent être activés par des protéases inflammatoires comme les trypsines ou les chymases produites par les mastocytes, ou bien par des enzymes exogènes telles que la gingipaïne-R d'origine bactérienne, les protéases Der P1, Der P3 et Der P9 issues des acariens (HDM) ou bien Pen c 13 provenant des moisissures. Après activation, les PAR entraînent une cascade d'événements aboutissant à la production de molécules chimioattractantes pour les neutrophiles, les monocytes ou les cellules dendritiques (Hammad and Lambrecht, 2008; Vroiling et al., 2008).

Les protéases exercent également leur activité allergénique en dégradant les protéines de jonctions serrées de type claudine ou ZO-1, ce qui augmente la perméabilité de la barrière épithéliale, facilitant l'accès des cellules dendritiques vers la lumière bronchique et la capture de l'allergène (Asokanathan et al., 2002; Wan et al., 1999).

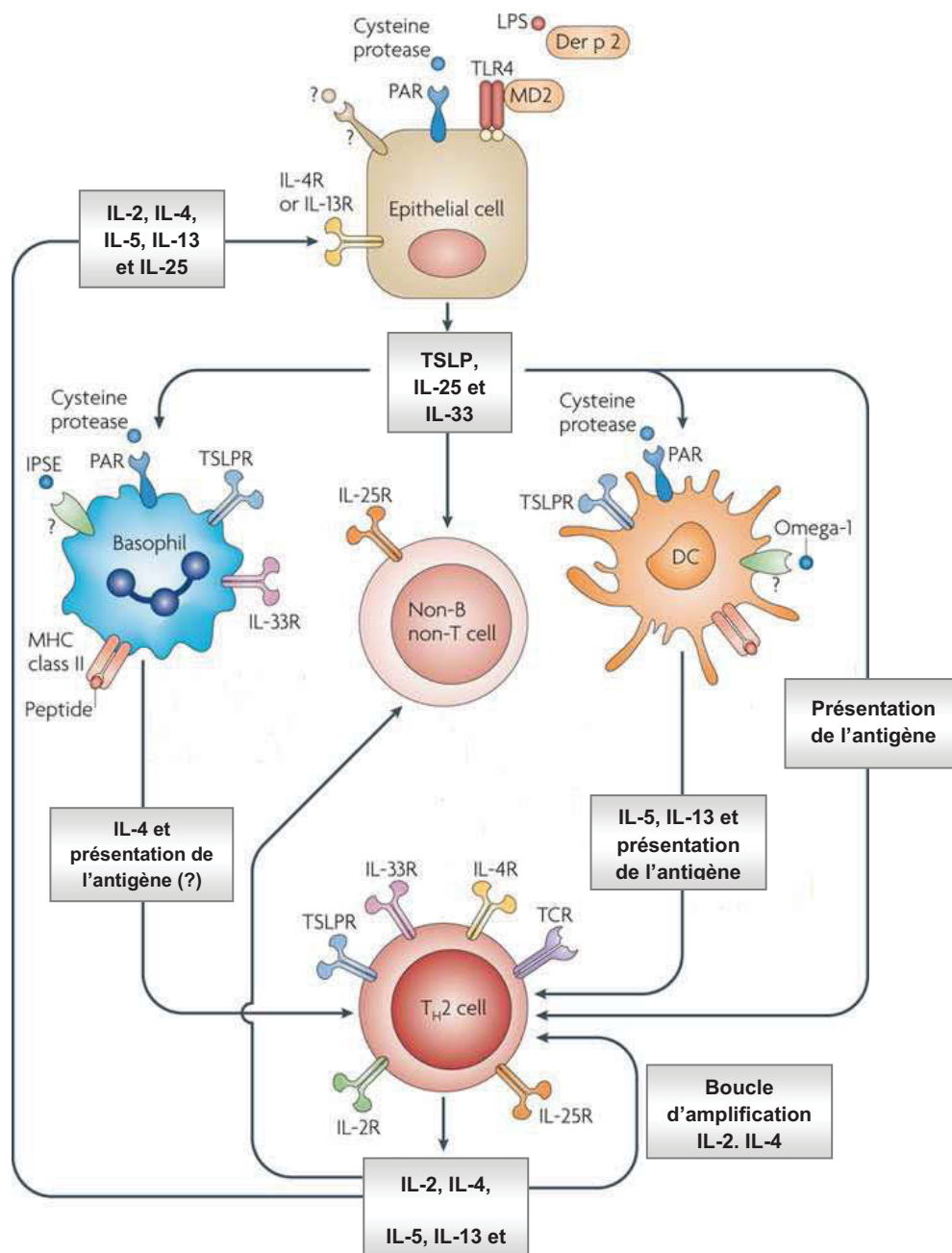


Figure 11 : Fonctions des cellules épithéliales dans l'induction de l'inflammation allergique pulmonaire. Les protéases à cystéine et/ou le LPS co-inhalés avec l'allergène peuvent activer la production de TSLP, d'IL-25 et d'IL-33 par les cellules épithéliales pulmonaires, et participer au recrutement et à l'activation des cellules dendritiques, des basophiles ou des lymphocytes Th2. (D'après Paul WE, 2010)

10.2 L'endothélium vasculaire

Les cellules endothéliales contribuent au recrutement et à l'activation des basophiles, éosinophiles et des lymphocytes dans les voies aériennes par l'expression de molécules d'adhésion (ICAM et VCAM) et la sécrétion de molécules chimioattractantes (Smit and Lukacs, 2006).

10.3 Les cellules musculaires lisses bronchiques

En plus de leur rôle direct dans la pathogénèse de l'asthme (bronchoconstriction et obstruction des voies aériennes par hyperplasie et hypertrophie), les cellules musculaires lisses secrètent de nombreux médiateurs chimiques responsables de l'inflammation bronchique et du dysfonctionnement des voies aériennes comme les protéines de matrice : fibronectines, elastines, laminines, thrombospondines, collagen I, III, IV et V (Black and Johnson, 2002; Johnson and Knox, 1997).

10.4 Les fibroblastes

Ils ont pour fonction la maintenance de l'intégrité tissulaire et sont impliqués dans les processus de réparation. Ils contribuent ainsi au remodelage bronchique observé dans l'asthme chronique (Sidhu et al., 2010).

LES MEDiateurs SOLUBLES DE L'ASTHME ALLERGIQUE

1. Les cytokines Th2

Les fonctions des cytokines dérivées des lymphocytes Th2 dans l'asthme allergique, telles l'IL-4, IL-5 et l'IL-13, ont été intensivement décrites dans la littérature scientifique. Les implications de ces trois cytokines dans la pathogenèse de l'asthme ayant été mentionnées plus haut dans le texte, je ne m'étendrai pas d'avantage sur ces dernières, concentrant mon attention sur les autres cytokines Th2 telles l'IL-9, l'IL-25, l'IL-33 et le TSLP.

1.1 L'interleukine-9

Parmi ces quatre cytokines, l'IL-9 est la plus anciennement découverte et la mieux caractérisée. Il s'agit d'une cytokine multifactorielle sécrétée par de nombreux types cellulaires dont les lymphocytes T (Th2, mais surtout Th9), les éosinophiles, les neutrophiles et les mastocytes (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008b). Au niveau génomique, le gène de l'IL-9 se situe sur la même portion de chromosome que les gènes de l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et du GM-CSF (5q31-35 chez l'Homme). Ce qui explique que l'IL-9 fut rapidement associée à l'allergie et à l'asthme.

Le récepteur à l'IL-9 se compose d'une sous-unité α spécifique de l'IL-9 (IL-9R α) et d'une sous-unité γ partagée avec les récepteurs à l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15, et est exprimé par de nombreux types cellulaires incluant les cellules T et B, les mastocytes, les éosinophiles, les neutrophiles et les cellules musculaires lisses (Demoulin and Renault, 1998).

In vitro, l'IL-9 augmente la production d'IgE par les cellules B humaines et murines par un mécanisme dépendant de l'IL-4, et potentialise l'expression du récepteur Fc ϵ RI par les mastocytes (Dugas et al., 1993). L'IL-9 pourrait également contribuer à l'inflammation éosinophilique en induisant la production de CCL11 par les cellules musculaires lisses pulmonaires (Yamasaki et al., 2010).

Tout comme les cytokines Th2 classiques, les niveaux d'expression de l'IL-9 dans le BAL sont augmentés après provocations allergéniques chez les patients asthmatiques (Erpenbeck et al., 2003). Chez la souris, la surexpression sélective au niveau pulmonaire de l'IL-9 induit une HRB, un recrutement éosinophilique et une augmentation des IgE sériques, accompagnée de modifications morphologiques des voies aériennes après provocation avec l'allergène (McLane et al., 1998).

De même, dans un modèle d'asthme à l'ovalbumine (2 immunisations OVA/adjuvant + 1 provocation à l'OVA) l'utilisation d'anticorps dirigés contre l'IL-9 au moment des provocations permet d'atténuer significativement l'HRB et l'éosinophilie (Cheng et al., 2002).

Etonnamment, le rôle pro-inflammatoire de l'IL-9 n'a pu être confirmé chez des souris déficientes en IL-9. En effet, aucune différence n'a été constatée au niveau de l'HRB, du recrutement cellulaire ou de l'inflammation pulmonaire après immunisation et provocations (2 immunisations OVA/Alum + 6 provocations à l'OVA) chez ces souris par rapport aux souris sauvages (McMillan et al., 2002). Cette absence de phénotype peut s'expliquer par le protocole expérimental trop puissant ou bien par les limites intrinsèques des animaux génétiquement modifiés.

Cependant, les observations chez l'Homme et la souris tendent à conférer un rôle pro-allergisant à l'IL-9. De récents travaux chez la souris montrent que la production d'IL-9 par les cellules T est sous la dépendance du récepteur à l'IL-25 (IL-17RB) et que la quantité d'IL-9 corrèle avec l'intensité de l'inflammation après immunisation et provocation à l'OVA (Angkasekwinai et al., 2010).

1.2 L'interleukine-25

Egalement connue sous le nom d'IL-17E, l'IL-25 est une cytokine membre de la famille de l'IL-17, impliquée dans les réponses immunes Th2. Elle est principalement produite par les cellules Th2 activées et les mastocytes (Fort et al., 2001; Ikeda et al., 2003; Wang et al., 2007), mais également par les cellules épithéliales pulmonaires en réponse aux allergènes (Hammad et al., 2009). Son expression est augmentée dans les voies aériennes de sujets asthmatiques (Letuve et al., 2006), ainsi que dans les poumons de souris après immunisation et provocation allergénique (Tamachi et al., 2006).

In vitro et *in vivo*, l'IL-25 aide à la prolifération et à la polarisation des lymphocytes Th2 mémoires et stimule leur production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Fort et al., 2001; Tamachi et al., 2006). L'IL-25 favorise la survie et l'expression des chimiokines chimioattractantes des monocytes et macrophages (CCL2, CCL3 et CXCL8) (Cheung et al., 2006; Wang et al., 2005). L'IL-25 stimule également la production de GM-CSF et d'IL-8 par les fibroblastes, contribuant ainsi à l'éosinophilie observée dans l'asthme (Letuve et al., 2006). L'ensemble de ces données suggère donc un rôle clé pour l'IL-25 dans l'amplification de la réponse Th2.

1.3 L'interleukine-33

1.3.1 Généralités

Mise en évidence en 2005 par Schmitz, l'IL-33 appartient à la famille cytokinique de l'IL-1, et est impliquée dans de nombreuses pathologies allergiques incluant l'asthme, la dermatite atopique et la

rhinite allergique, mais aussi les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, et de façon plus surprenante dans les maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et l'infarctus du myocarde. (Liew et al., 2010; Schmitz et al., 2005; Smith, 2005).

L'IL-33 est exprimée par de nombreux types cellulaires tels les cellules épithéliales, les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules musculaires lisses (Schmitz et al., 2005). Le récepteur de l'IL-33 se compose d'une sous-unité ST2 et du récepteur IL-1R1AcP (Ali et al., 2007; Chackerian et al., 2007), et est exprimé par les cellules liées à l'inflammation allergique (mastocytes, basophiles, éosinophiles, cellules NK et NKT, lymphocytes Th2.) Il existe une isoforme soluble du récepteur ST2 (sST2) pouvant séquestrer l'IL-33, inhibant ainsi la voie de signalisation induite par la forme membranaire (Hayakawa et al., 2007). Lorsqu'elle est sécrétée dans le milieu, l'IL-33 exerce une activité pro inflammatoire via son récepteur ST2. Par ailleurs, des études récentes ont révélé que l'IL-33 était présente au niveau nucléaire où elle interagit avec la chromatine (Carriere et al., 2007).

1.3.2 Une nouvelle alarmine ?

L'IL-33 est produite sous la forme d'un précurseur de 30 kDa comprenant dans sa partie N-terminale un domaine de signalisation nucléaire (NLS) et un site de liaison à la chromatine (Figure 12) En absence de stimuli pro-inflammatoires, l'IL-33 est intranucléaire et pourrait jouer le rôle de répresseur de la transcription en se liant aux protéines histone H2A et H2B (Carriere et al., 2007). En cas de dommages ou de nécrose tissulaire, l'IL-33 est libérée dans le milieu sous forme active (Cayrol and Girard, 2009) permettant l'initiation d'une réponse inflammatoire. En revanche, lors d'une mort cellulaire programmée l'IL-33 est inactivée par les caspases apoptotiques (caspase 1, 3, 7 ou la calpaïne) et n'induit pas de réponse immune (Cayrol and Girard, 2009; Luthi et al., 2009; Talabot-Ayer et al., 2009).

Sa localisation nucléaire et sa sécrétion par les cellules nécrotiques suggèrent que l'IL-33 serait une alarmine, au même titre que l'IL-1 α et HMGB1 (Moussion et al., 2008).

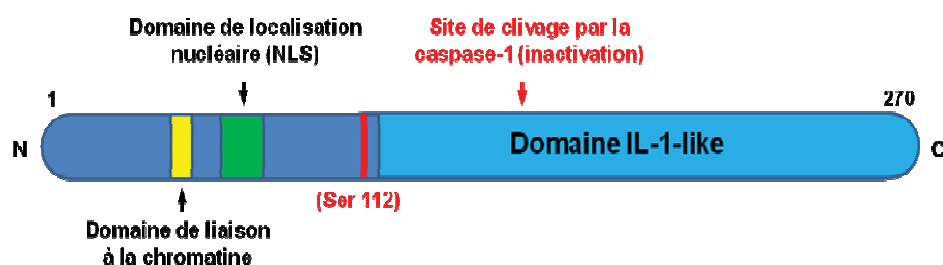


Figure 12 : Représentation schématique de l'IL-33. Il s'agit d'une protéine de 270 acides-aminés contenant un domaine proche de l'IL-1 dans la partie C-terminale. *In vitro*, l'IL-33 est clivée par la caspase-1 au niveau de la Serine 112, laissant intact le domaine proche de l'IL-1. *In vivo*, l'IL-33 serait clivée par la calpaïne, une caspase apoptotique, au niveau de l'acide aspartique 178, ce qui a pour conséquence l'inactivation de la protéine. (D'après Smith D.E. 2010)

1.3.3 L'IL 33 dans l'inflammation pulmonaire allergique

Les évidences de l'implication de l'IL-33 dans l'initiation, la maintenance et la résolution de l'asthme allergique sont nombreuses. Par exemple, les taux d'IL-33 sont augmentés dans le BAL et le sérum de patients asthmatiques (Kurowska-Stolarska et al., 2009; Prefontaine et al., 2009) ou dans les modèles expérimentaux d'inflammation allergique pulmonaire chez la souris (Kearley et al., 2009). Administrée directement dans les poumons de souris, l'IL-33 induit des symptômes comparables à ceux observés dans l'asthme, à savoir, l'HRB, l'inflammation éosinophilique et l'hyperplasie des cellules de Goblet (Kondo et al., 2008). Dans des modèles d'asthme induit par l'ovalbumine, l'administration d'anticorps anti-IL-33 ou anti-ST2 au moment des provocations allergéniques atténue significativement l'inflammation pulmonaire et l'HRB (Coyle et al., 1999; Liu et al., 2009; Lohning et al., 1998). De même, les souris déficientes pour le récepteur ST2 ou l'IL-33 développent moins d'inflammation après immunisation et provocation à l'ovalbumine (Kurowska-Stolarska et al., 2008; Liew et al., 2010; Oboki et al., 2010). Il est important de noter que ce phénotype n'est observable que dans le cas des protocoles de sensibilisation courts (2 immunisations 10 µg OVA/adjuvant puis 3 provocations ou le même protocole sans adjuvant).

In vitro, les lymphocytes Th2 répondent à l'IL-33 en produisant de l'IL-5 et de l'IL-13, mais pas d'IL-4 (Kondo et al., 2008; Schmitz et al., 2005). Cette réponse Th2 atypique a été également observée *in vivo* après immunisation et provocation à l'ovalbumine en présence d'IL-33 (Kurowska-Stolarska et al., 2008). Les effets de l'IL-33 sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles sont présentés figure 13. De récentes études montrent que l'IL-33 peut activer directement les éosinophiles *in vitro* (Suzukawa et al., 2008), et peut induire l'inflammation des voies aériennes en absence de lymphocytes Th2, par un mécanisme dépendant de l'IL-13 (Kondo et al., 2008; Stolarski et al., 2010). De plus, il a été montré que l'IL-33 pouvait amplifier la polarisation des macrophages vers le type M2a ou alternatively activated macrophages (AAM) par un mécanisme impliquant l'IL-13. Ces macrophages produisent alors de grandes quantités de CCL17 et CCL24 nécessaires à l'initiation de l'inflammation et au recrutement des éosinophiles (Kurowska-Stolarska et al., 2009).

L'ensemble de ces observations *in vivo* et *in vitro* démontre que l'IL-33 est un effecteur puissant de la réponse inflammatoire allergique par action directe sur les lymphocytes Th2 et les cellules de l'immunité innée.

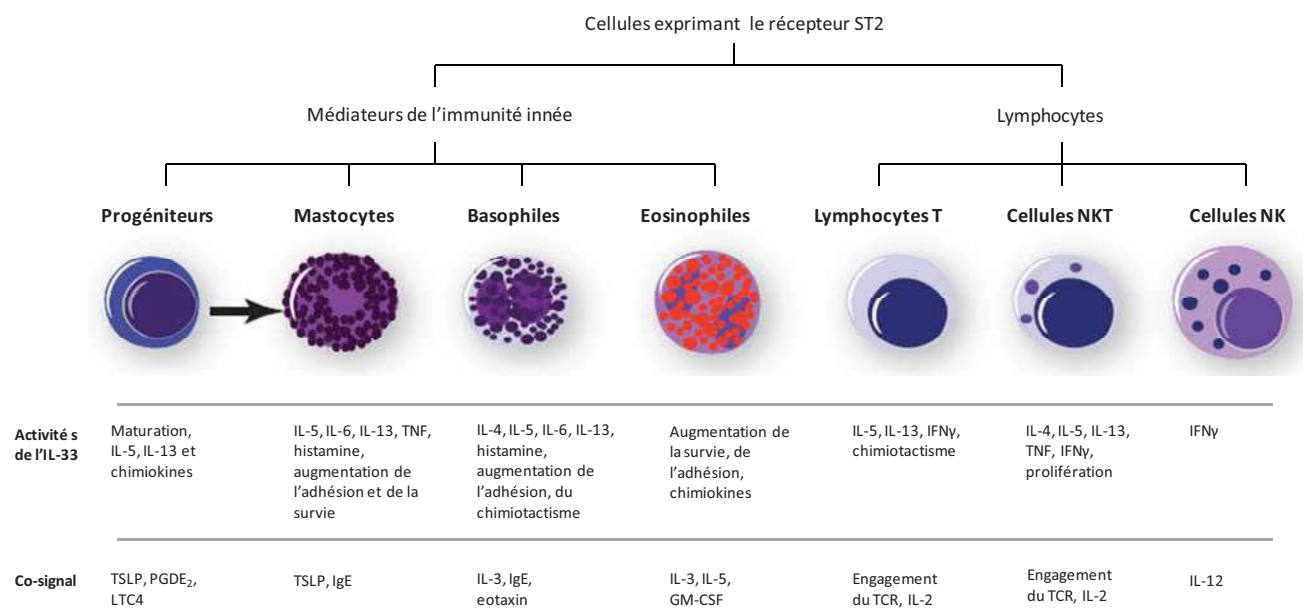


Figure 13: Activités cellulaires de l'IL-33 dans l'asthme allergique. Les principales cytokines produites en réponse à l'IL-33 sont indiquées sous chaque type cellulaire, ainsi que les molécules qui agissent en synergie ou en coopération avec l'IL-33. (D'après Smith DE, 2010)

1.4 Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP)

Le TSLP est une cytokine structurellement proche de l'IL-7, qui participe à la génération, au maintien et à l'amplification de la réponse inflammatoire allergique en agissant sur différentes cellules cibles. Cette cytokine est libérée par des cellules épithéliales bronchiques humaines en réponse à certains produits microbiens comme le peptidoglycane, le LPS ou l'ARN double-brin, mais aussi en réponse à des dommages tissulaires ou à des cytokines inflammatoires (IL-1 β ou TNF α) (Allakhverdi et al., 2007; Bogiatzi et al., 2007; Kato et al., 2007). Chez la souris, l'exposition intra-trachéale d'extrait d'HDM induit une libération de TSLP par les cellules structurales (Hammad et al., 2009). Les mastocytes murins produisent également le TSLP en réponse à la liaison d'IgE à leur surface (Sokol et al., 2008). Les patients asthmatiques présentent des quantités supérieures d'ARNm de TSLP par rapport aux sujets sains. Les niveaux de transcrits TSLP corréleraient avec l'intensité de la pathologie (Ying et al., 2005).

Soumelis et collègues ont montré que le TSLP agissait sur les cellules dendritiques humaines en augmentant l'expression de HLA-DR et les molécules de costimulation CD40, CD80, CD86 et CD83 et en générant la chimiokine attractante des cellules Th2, CCL17 (Soumelis et al., 2002). Les cellules dendritiques traitées au TSLP activent la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et de TNF α par les cellules T naïves. L'expression d'OX40L par les cellules dendritiques traitées avec TSLP joue un rôle central dans la différenciation Th2 des lymphocytes T naïfs (Ito et al., 2005). En outre, le TSLP peut agir directement sur les cellules T en augmentant leur production en cytokines Th2 (He et al., 2008).

L'importance de TSLP dans l'établissement de la réponse Th2 est confirmée par la réduction importante de l'inflammation pulmonaire et de l'HRB chez les souris déficientes pour le récepteur TSLPR dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine (Zhou et al., 2005).

2. Les cytokines Th17

2.1 L'interleukine-17

La famille des cytokines IL-17 comprend cinq membres : L'IL-17A (IL-17), l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (IL-25) et l'IL-17F. Les lymphocytes Th17 sont la principale source d'IL-17A et F, bien que les lymphocytes CD8⁺ ou $\gamma\delta$, les cellules NK et NKT, les neutrophiles et les éosinophiles sont aussi capables d'en produire. L'IL-17A reste la plus étudiée de ces cytokines. Elle agit sous la forme d'homodimère A/A, ou sous la forme d'hétérodimère avec l'IL-17F (Wright et al., 2008). Sa liaison à son récepteur, IL-17RA exprimé par les cellules hématopoïétiques, endothéliales et épithéliales, induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6, GM-CSF), de chimiokines (CXCL1, CXCL8, CXCL10) et de metalloprotéinases (Korn et al., 2009).

Les évidences quant à l'implication de l'IL-17 dans l'asthme allergique sont nombreuses. On retrouve par exemple des taux élevés d'IL-17 et d'ARNm IL-17 dans le BAL et le sang périphérique des patients asthmatiques. Ces taux corrélaient avec la sévérité de la maladie (Hashimoto et al., 2005; Molet et al., 2001). Chez la souris, les niveaux d'IL-17, d'IL-17F et l'IL-23 sont augmentés après immunisation et provocation à l'ovalbumine (Doe et al., 2010; Hellings et al., 2003; Schnyder-Candrian et al., 2006; Suzuki et al., 2007; Wakashin et al., 2008).

Grâce à sa capacité à induire l'expression de molécules chimioattractantes et des facteurs d'activation, l'IL-17 est à l'origine du recrutement des neutrophiles dans l'asthme sévère. Des études réalisées chez la souris ont révélé qu'en plus de son rôle dans le recrutement neutrophilique, l'IL-17 participait à la mise en place de la réponse Th2 et à l'inflammation éosinophilique (Wakashin et al., 2008). Une étude réalisée à l'IEM en 2006 par Schnyder-Candrian a montré que les souris déficientes pour le récepteur IL-17RA développaient moins d'HRB et d'inflammation pulmonaire allergique dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine (Schnyder-Candrian et al., 2006), suggérant que l'IL-17 est requis pour l'induction de l'asthme. Ces résultats sont en relation avec ceux obtenus chez les souris déficientes en IL-17 qui présentent moins d'inflammation pulmonaire allergique que des souris sauvages (Nakae et al., 2002). De plus, la neutralisation de l'IL-17 au cours des provocations à l'ovalbumine exacerbe l'HRB et l'infiltration éosinophilique, et qu'au contraire l'ajout d'IL-17 exogène atténue la réponse allergique (Schnyder-Candrian et al., 2006) suggérant que l'IL-17 serait un régulateur négatif de l'asthme établi. Mécanistiquement, l'IL-17 pourrait agir négativement sur les

cellules dendritiques en réduisant leur capacité à internaliser l'antigène puis à produire la chimiokine CCL17.

Plus récemment, dans un modèle expérimental de maladie auto-immune utilisant des souris BXD2, Hsu et collègues ont montré que la neutralisation de l'IL-17 inhibe l'interaction entre les cellules T CD4+ et les lymphocytes B au niveau des centres germinatifs entraînant une forte diminution de la réponse humorale (Hsu et al., 2008). Cette découverte pourrait expliquer la réduction des IgE spécifiques de l'antigène et la diminution de l'HRB au cours de l'asthme allergique chez les souris déficientes pour l'IL-17 ou son récepteur.

Néanmoins, le rôle régulateur de l'IL-17 dans l'asthme allergique est controversé. Certaines études avancent que l'administration d'IL-17 exogène immédiatement après les provocations allergéniques augmenterait au contraire la pathologie (Wilson et al., 2009) et que le transfert de Th17 spécifiques de l'antigène potentialiserait l'HRB et l'éosinophilie (Wakashin et al., 2008). Une fois de plus, ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par les différences expérimentales comme la voie d'immunisation (sous-cutanée versus intrapéritonéale), les doses, le type d'antigène ou la souche de souris utilisée.

Malgré ces divergences, il paraît clair que l'IL-17 contribue directement à l'inflammation neutrophilique retrouvée dans certains types d'asthmes sévères, mais également à l'inflammation éosinophilique et l'HRB dans l'asthme allergique.

2.2 L'interleukine-23

L'IL-23 appartient à la famille de l'IL-12 et se compose d'une sous-unité p19 associée avec une sous-unité p40 commune à l'IL-12. Elle se lie à un récepteur hétérodimérique, composé de la chaîne $\beta 1$ du récepteur à l'IL-12 et du récepteur IL-23R (Watford et al., 2004). Comme l'IL-12, l'IL-23 est sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques activés. Elle joue un rôle important dans de nombreuses pathologies inflammatoires, telles que l'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE), l'arthrite induite par le collagène (CIA), les maladies inflammatoires intestinales ou le psoriasis (Cua et al., 2003; Hue et al., 2006; Murphy et al., 2003). L'effet pro-inflammatoire de l'IL-23 est inhérent aux lymphocytes Th17. En effet, l'IL-23 est responsable de l'expansion et du maintien des Th17, mais aussi de l'expression des récepteurs aux chimiokines par ces cellules (McGeachy et al., 2009).

L'IL-23 étant produite par les cellules présentatrices d'antigènes après activation par différents stimuli comme, le TNF α , le LPS, CD40L ou les motifs CpG, il a été proposé que l'axe IL-23-Th17 était impliqué dans l'exacerbation de l'asthme lors d'infections virales ou bactériennes (Nakajima and Hirose).

Récemment, Wakashin et collègues ont montré que des souris transgéniques sur-exprimant l'IL-23 spécifiquement dans les poumons présentaient une éosinophilie accompagnée d'une hyperplasie des cellules de Goblet, d'HRB et d'une augmentation des cytokines Th2, et ceci indépendamment de l'IL-17 (Wakashin et al., 2008). Cependant, les mécanismes par lesquels l'IL-23 agit sur les réponses Th2 restent à définir.

2.3 L'interleukine-21

Peu d'études sont disponibles sur le rôle de l'IL-21 dans les maladies allergiques. Appartenant à la famille de l'IL-2, l'IL-21 est produite en grande quantité par les lymphocytes Th17 et exerce un effet autocrine en amplifiant la fréquence des précurseurs Th17 (Korn et al., 2009).

En plus de son rôle dans le développement des Th17, l'IL-21 pourrait moduler l'asthme allergique et l'inflammation pulmonaire en réduisant la production d'IgE par les cellules B (Ozaki et al., 2002).

2.4 L'interleukine-22

Découverte en 2000 par Dumoutier et collègues, l'IL-22 est un membre de la famille de l'IL-10 dont les fonctions restent encore mal connues. Bien que partageant 22% d'homologie avec l'IL-10 au niveau protéique, l'IL-22 possède des fonctions bien distinctes. Cette divergence provient en grande partie du profil d'expression de son récepteur. L'IL-22 interagit avec la chaîne IL-22R1 exprimée exclusivement par les cellules non immunes. Cette interaction recrute la chaîne accessoire IL-10R2 et active alors la voie STAT3, et à des degrés moindres les voies STAT1 et STAT5 (Lejeune et al., 2002). A l'inverse, le récepteur à l'IL-10, composé des sous-unités IL-10R1 et IL-10R2, n'est exprimé que sur les cellules hématopoïétiques. Il existe également une forme soluble du récepteur à l'IL-22, l'IL-22BP, pouvant agir comme un antagoniste naturel de l'IL-22 (Wolk et al., 2010).

L'IL-22 est produite par les lymphocytes CD4⁺ et Th17, les cellules NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes $\gamma\delta$ (Cella et al., 2009 ; Liang et al., 2006; Simonian et al., 2010; Zheng et al., 2007) et agit sur les cellules épithéliales et parenchymales de l'intestin, des poumons, de la peau et du foie (Wolk et al., 2004).

L'IL-22 peut avoir un rôle protectif ou pro-inflammatoire en fonction du microenvironnement inflammatoire. Dans un modèle murin d'inflammation de la peau (acanthose) induit par l'IL-23, Zheng et collègues ont montré que IL-22 produit par les cellules CD4⁺ était indispensable à l'inflammation cutanée, puisque les souris déficientes en IL-22 développent moins de lésions et produisent moins de molécules pro-inflammatoires en comparaison avec des souris sauvages contrôles (Ma et al., 2008; Zheng et al., 2007). *In vitro*, l'IL-22 agit en partenariat avec l'IL-17 pour

induire la production des protéines S100A7, A8 et A9, et de MMP-3 par les kératinocytes humains en culture (Boniface et al., 2005; Liang et al., 2006). Les quantités importantes d'IL-23 et d'IL-22 retrouvées dans les biopsies issues de patients psoriatiques laissent à penser que ces deux cytokines sont impliquées dans la pathologie chez l'Homme (Wolk et al., 2006).

D'autres études ont révélé un rôle protectif de l'IL-22 dans les maladies inflammatoires intestinales. Les patients atteints de la maladie de Crohn présentent des niveaux élevés d'IL-22 dans le sérum (Brand et al., 2006; Wolk et al., 2007). Dans un modèle de colite induite par DSS (Dextran sodium salt) chez la souris, le développement de l'inflammation du colon corrèle avec l'expression d'IL-22 (Brand et al., 2006; Wolk et al., 2007). Dans ce modèle, la neutralisation de l'IL-22 aggrave les symptômes de la maladie suggérant un rôle protecteur de l'IL-22. De même, en cas d'infection intestinale à *Citrobacter rodentium*, les souris déficientes en IL-22 sont plus susceptibles à l'infection (Zheng et al., 2008). L'IL-22 induit la sécrétion précoce de peptides anti-microbiens de la famille Reg III qui favorisent l'élimination des bactéries et les processus de réparation tissulaire. Un article récent suggère que la source majeur d'IL-22 dans l'intestin serait les cellules NK, et plus particulièrement les cellules NKp46 de la muqueuse intestinale (Sanos et al., 2009).

Assez peu d'études sont disponibles sur les effets de l'IL-22 dans l'inflammation pulmonaire. *In vitro*, on sait que l'IL-22 induit la phosphorylation de STAT3 chez des lignée de cellules épithéliales bronchique (Whittington et al., 2004). La neutralisation de l'IL-22 dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *Klebsiella pneumoniae* augmente la mortalité comparativement à des souris sauvages ou déficiente en IL-17, avec une dissémination rapide de la bactérie du poumon vers la rate (Aujla et al., 2008). Ces résultats suggèrent une perte de la fonction de barrière de l'épithélium pulmonaire lorsque l'IL-22 est neutralisée.

Récemment, l'équipe d'Artis s'est intéressée aux fonctions de l'IL-22 dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine (Sonnenberg et al., 2010). Les souris traitées avec un anticorps anti IL-22, tout comme les souris déficientes en IL-22 présentent une inflammation réduite après administration de bléomycine, indiquant un rôle pro-inflammatoire de l'IL-22. Une augmentation de l'expression de l'IL-22 est observée chez les souris déficientes en IL-17, mais ces souris ne sont pas pour autant plus sensibles à la bléomycine, ce qui laisse à penser que l'effet pro-inflammatoire de l'IL-22 est dépendant de l'IL-17. La balance entre l'IL-22 et l'IL-17 dans l'inflammation pulmonaire allergique sera longuement discutée dans ce mémoire.

3. *Autres cytokines pro-inflammatoires*

3.1 *Les interleukines-1 α et β*

L'IL-1 fut découverte dans les années 1980 et s'est rapidement imposée comme une molécule clé dans la régulation des processus inflammatoires. Le terme IL-1 comprend deux cytokines, l'IL-1 α et l'IL-1 β , encodées par deux gènes distincts. Les effets de l'IL-1 sont naturellement régulés par la présence d'antagonistes tels l'IL-1Ra (receptor antagonist), l'IL-1R2 (decoy receptor) ou bien par des récepteurs solubles (Dinarello, 2009).

Les sources principales d'IL-1 β sont les monocytes circulants, les macrophages et les cellules dendritiques présents dans les tissus. La stimulation de ces cellules par des ligands des TLR entraîne la synthèse de pro-IL-1 β et son accumulation dans le cytoplasme jusqu'à l'activation de la caspase-1 qui permet sa maturation avant sa sécrétion vers le milieu extra cellulaire. L'activation de la caspase-1 nécessite l'assemblage préalable d'un complexe multiprotéique nommé inflammasome. Ce complexe s'organise autour du récepteur intracellulaire NLRP3, et comprend les protéines CARD, ASC et CARDINAL (Figure 14). L'oligomérisation de l'inflammasome requiert une deuxième stimulation qui consiste le plus souvent en des signaux de danger libérés par les cellules mortes (ATP, cristaux d'acide urique), ou des molécules circulantes anormales (cristaux de cholestérol, peptides β -amyloïde) (Düwell et al., 2010; Halle et al., 2008; Martinon et al., 2009). Après clivage par la caspase-1, l'IL-1 β mature est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle stimule la réponse immune innée et adaptative en up-régulant l'expression de gènes pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines, protéines de la phase aigue ou des enzymes de remodelage des tissus (Dinarello, 1996). L'IL-1 β agit comme co-stimulateur des cellules T et peut orienter leur polarisation en fonction de l'environnement inflammatoire. Ainsi, dans des modèles d'allergies, l'IL-1 β participe à la réponse Th2, alors qu'elle favorise la génération de lymphocytes Th17 dans des modèles de maladies auto-immunes (Sims and Smith, 2010).

Contrairement à la forme β , l'IL-1 α est exprimée constitutivement par de nombreux types cellulaires et ne nécessite pas de clivage enzymatique pour être active. Elle est présente sous forme immature dans le cytoplasme des cellules et peut servir d'alarmine en cas de rupture de la membrane cytoplasmique ou de nécrose. La présence d'un domaine de localisation nucléaire dans son pro-domaine lui confère un rôle de facteur de transcription (Sims and Smith, 2010).

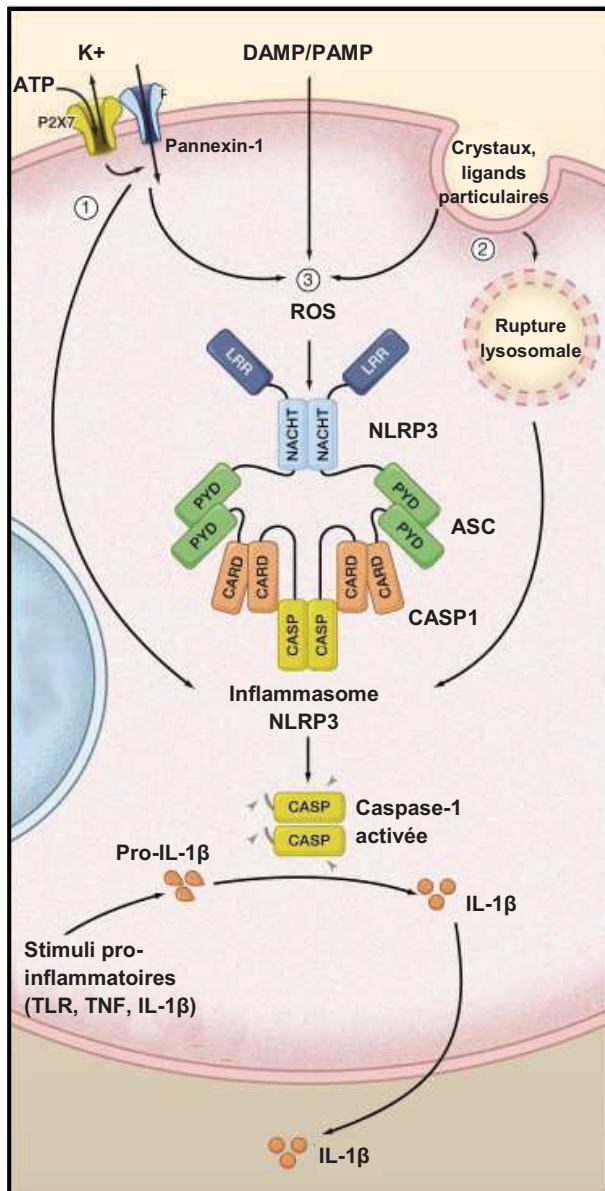


Figure 14: Activation de l'inflammasome NLRP3.

Ce schéma représente les différentes voies d'activation de l'inflammasome NLRP3. (1) La liaison d'ATP extracellulaire au récepteur P2X7 entraîne la formation de pores permettant l'entrée dans le cytosol d'agonistes du récepteurs NLRP3 (PAMP et DAMP) via la pannexin-1. (2) Des ligands cristallins ou particulaires de NLRP3 peuvent être internalisés puis libérés dans le cytosol après rupture des lysosomes. Ces ligands sont alors reconnus par la cathepsin-B ou directement par NLRP3. (3) Tous les signaux de danger, tels les PAMP/DAMP, l'ATP ou les ligands cristallins ou particulaires, entraînent la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) pouvant également contribuer à l'activation de l'inflammasome. L'assemblage de l'inflammasome permet l'activation de la caspase-1 et la maturation de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β ou l'IL-18. (D'après Tschopp J, 2010)

Relativement peu d'études mentionnent le rôle de la voie IL-1/IL-1R1 dans l'asthme allergique. L'expression de l'IL-1 β est pourtant augmentée dans le BAL de patients asthmatiques en conditions basales ou après provocation avec l'allergène (Borish et al., 1992; Sousa et al., 1996; Virchow et al., 1995). Dans un modèle d'asthme allergique induit par l'ovalbumine, l'inflammation éosinophilique pulmonaire, l'hyperplasie des cellules de Goblet, l'activation des cellules T et leur recrutement vers les poumons ainsi que la réponse humorale IgE sont fortement réduits chez les souris déficientes pour l'IL-1R1 comparativement à la réponse observée chez des souris sauvages BALB/c. Il est important de noter que ce phénotype n'est observé que dans un modèle d'asthme allergique modéré sans adjuvant (Schmitz et al., 2003). Dans ce même modèle, une seconde équipe a démontré que les souris déficientes en IL-1 α ou IL-1 β présentaient une HRB et une production de cytokines Th2 par les cellules T réduites par rapport aux souris sauvages, alors que des souris déficientes en IL-1Ra,

l'antagoniste naturel du récepteur IL-1R1, développaient une réponse exacerbée (Nakae et al., 2003a). Ces observations suggèrent l'implication de la voie IL-1/IL-1R1 dans le développement de l'asthme allergique, mais les mécanismes d'action exacts de l'IL-1 α et IL-1 β restent à éclaircir.

3.2 L'interleukine-18

Alors que l'IL-1 β requière un stimulus, l'IL-18 est constitutivement exprimée par les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales. Comme pour l'IL-1 β , l'IL-18 est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif qui nécessite l'activation de l'inflammasome et le clivage par la caspase-1 (Martinon et al., 2009).

Souvent associée aux réponses Th1, l'IL-18 peut également participer à l'amplification des réponses Th2. Cette ambivalence est liée à la disponibilité de l'IL-12. En effet, en présence d'IL-12, l'IL-18 contribue à la production d'IFN γ par les lymphocytes Th1 et les cellules NK, alors qu'en absence d'IL-12, l'IL-18 favorise la production d'IL-4 et la polarisation Th2 (Nakanishi et al., 2001).

Chez l'humain, des polymorphismes des gènes de l'IL-18 ou de son récepteur sont associés avec l'atopie et l'asthme. De plus, les taux circulants d'IL-18 sont élevés chez les patients asthmatiques (Tanaka et al., 2001). Dans un modèle d'asthme chronique chez la souris, la déficience en IL-18 entraîne une réduction de la pathologie pulmonaire après immunisation et provocation à l'ovalbumine (Yamagata et al., 2008).

4. Les cytokines immunorégulatrices

4.1 L'interleukine-10

D'innombrables travaux ont mis en lumière les fonctions immunosuppressives de l'IL-10 et son rôle dans le contrôle des processus inflammatoires. Cette cytokine est produite par les lymphocytes Th0, Th1, Th2 et Treg, mais aussi par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Hamid and Tulic, 2009). Après homodimérisation, l'IL-10 se lie à son récepteur constitué de l'IL-10R1 et de l'IL-10R2, et active une cascade de signalisation impliquant les protéines JAK/STAT3 qui inhibe la transcription de gènes pro-inflammatoires par la cellule cible (Commins et al., 2008; Taylor et al., 2007).

En 2001, l'équipe d'Umetsu a mis en évidence le rôle de l'IL-10 dans la tolérance antigénique. Après exposition à un allergène respiratoire, les cellules dendritiques pulmonaires produisent de l'IL-10 et favorisent la polarisation des cellules T naïves en cellules T régulatrices, qui elles-mêmes produisent de l'IL-10. Ce processus implique l'expression de la molécule de co-stimulation inductible (ICOS) par

les cellules dendritiques (Akbari et al., 2001). L'IL-10 régule alors la réponse allergique en inhibant la production d'IL-8 et de CCL5 par les cellules musculaires lisses, réduisant ainsi le recrutement et la survie des éosinophiles. De même, l'IL-10 inhibe la synthèse d'IgE par les lymphocytes B et la production des cytokines IL-4 et IL-5 par les Th2 (Del Prete et al., 1993) (Figure 15).

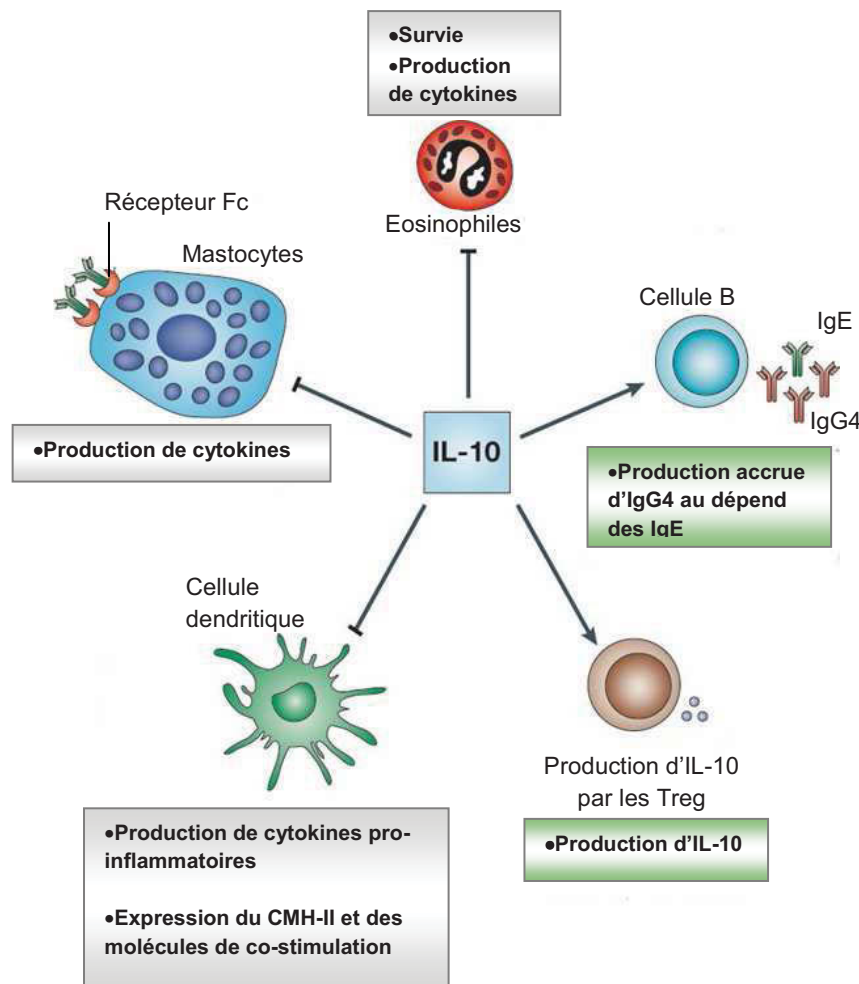


Figure 15: Fonctions de l'IL-10 dans l'asthme allergique. L'IL-10 est une cytokine pleiotropique pouvant inhiber l'activation et la production de cytokines par les mastocytes, ainsi que la survie et la production d'IL-5 par les éosinophiles. L'IL-10 exerce un effet inhibiteur sur la maturation et l'expression des molécules de surface des cellules dendritiques ou des lymphocytes Th2. Au contraire, l'IL-10 pourrait moduler négativement la production des IgE par les lymphocytes B en favorisant l'isotype IgG4. De plus, il existe une boucle de régulation positive chez les Treg, puisque l'IL-10 stimule sa propre production. (D'après O'Garra A, 2005)

Dans le poumon sain, l'IL-10 est constitutivement exprimé par les macrophages alvéolaires permettant ainsi de maintenir la tolérance vis-à-vis des antigènes aériens non pathogènes. Chez les individus asthmatiques, la quantité d'IL-10 est inversement proportionnelle à la sévérité de la maladie (Borish et al., 1996).

4.2 L'interferon- γ

Produit par les lymphocytes Th1 et les cellules NK, l'IFN γ est un puissant inhibiteur de la réponse Th2. Il peut par exemple inhiber la polarisation Th2 et supprimer la production des cytokines Th2 par les cellules T activées (Tang et al., 2001). L'IFN γ inhibe aussi la production d'IgE par les lymphocytes B (Lack et al., 1996). Le rôle inhibiteur de l'IFN γ a été confirmé dans différents modèles expérimentaux d'asthme chez la souris. La nébulisation d'IFN γ chez des souris préalablement immunisées et provoquées à l'ovalbumine a révélé un rôle protecteur de l'IFN γ (Lack et al., 1996). De même, l'administration d'un adénovirus exprimant l'IFN γ protège les souris de l'inflammation pulmonaire allergique (Behera et al., 2002). Les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN γ présentent une éosinophilie et une production de cytokines Th2 prolongées comparativement aux souris sauvages, suggérant un rôle important de l'IFN γ dans la résolution de la pathologie (Coyle et al., 1996).

Les études réalisées chez la souris semblent indiquer que l'IFN γ pourrait constituer une molécule de choix dans le traitement de l'asthme allergique. Néanmoins, toutes les études réalisées dans ce sens se sont révélées décevantes (Boguniewicz et al., 1995; Gao et al., 2002; Gratzl et al., 2000). En effet, les niveaux d'IFN γ retrouvés chez les patients asthmatiques sont très variables, et ne corrélient pas forcément avec le degré de la maladie, mais sont plutôt associés à la présence de neutrophiles dans les poumons (Walsh, 2008).

4.3 L'interleukine-12

L'IL-12 est produite principalement par les macrophages et les cellules dendritiques et se constitue d'une sous-unité spécifique, l'IL-12p70, et d'une sous-unité commune avec l'IL-23, l'IL-12p40 (Trinchieri, 2003). Grâce à sa capacité à polariser les cellules T naïves vers le type 1, tout en inhibant la différenciation des Th2, l'IL-12 est un régulateur potentiel de la réponse allergique. Les taux d'IL-12 sont plus faibles dans les biopsies issues de patients allergiques que chez des individus contrôles (Naseer et al., 1997). Chez la souris, l'administration d'IL-12 exogène au moment de l'immunisation à l'allergène, supprime le développement de l'inflammation pulmonaire allergique (Kips et al., 1996). De même, l'administration d'IL-12 au moment des provocations permet de réduire l'HRB et l'inflammation allergique (Gavett et al., 1995; Kips et al., 1996). L'IL-12 inhibe la réponse inflammatoire Th2 en augmentant la production d'IFN γ par les cellules Th1, CD8+ ou les cellules NK co-existantes localement.

Une étude récente a montré qu'en absence d'IFN γ , la réponse inflammatoire allergique serait associée à un recrutement de neutrophiles induit par les lymphocytes Th17 (Durrant and Metzger, 2010). De même, l'administration d'IL-12 exogène supprime l'infiltration neutrophilique et diminue les niveaux d'IL-17, d'IL-23 et d'IL-23R ainsi que l'expression de ROR γ T, mais augmente l'expression

d'IL-10. Ces résultats montrent que l'IL-12 pourrait avoir un effet bénéfique sur certains types d'asthme d'origine neutrophilique, ceci par inhibition de la différenciation Th17.

Une équipe coréenne a proposé dernièrement un nouveau modèle décrivant un rôle inattendu de l'IL-13 dans l'induction de l'HRB et du recrutement des neutrophiles au cours de l'asthme allergique induit par l'ovalbumine (Kim et al., 2010). Dans ce modèle, l'IL-13 produite par les Th2 après immunisation et challenge antigénique, pourrait activer la production d'IL-12 par les cellules dendritiques. Cet IL-12 pourrait alors stimuler la réponse Th1 via l'axe IL-12/STAT4/IFN γ et induire le recrutement de cellules non-éosinophiles comme les neutrophiles ou les macrophages de type 1 qui potentialiseraient l'HRB (Figure 16). Ces résultats suggèrent que l'IL-13 favoriserait l'HRB et l'inflammation non-éosinophilique via l'axe IL-12/STAT4/IFN γ .

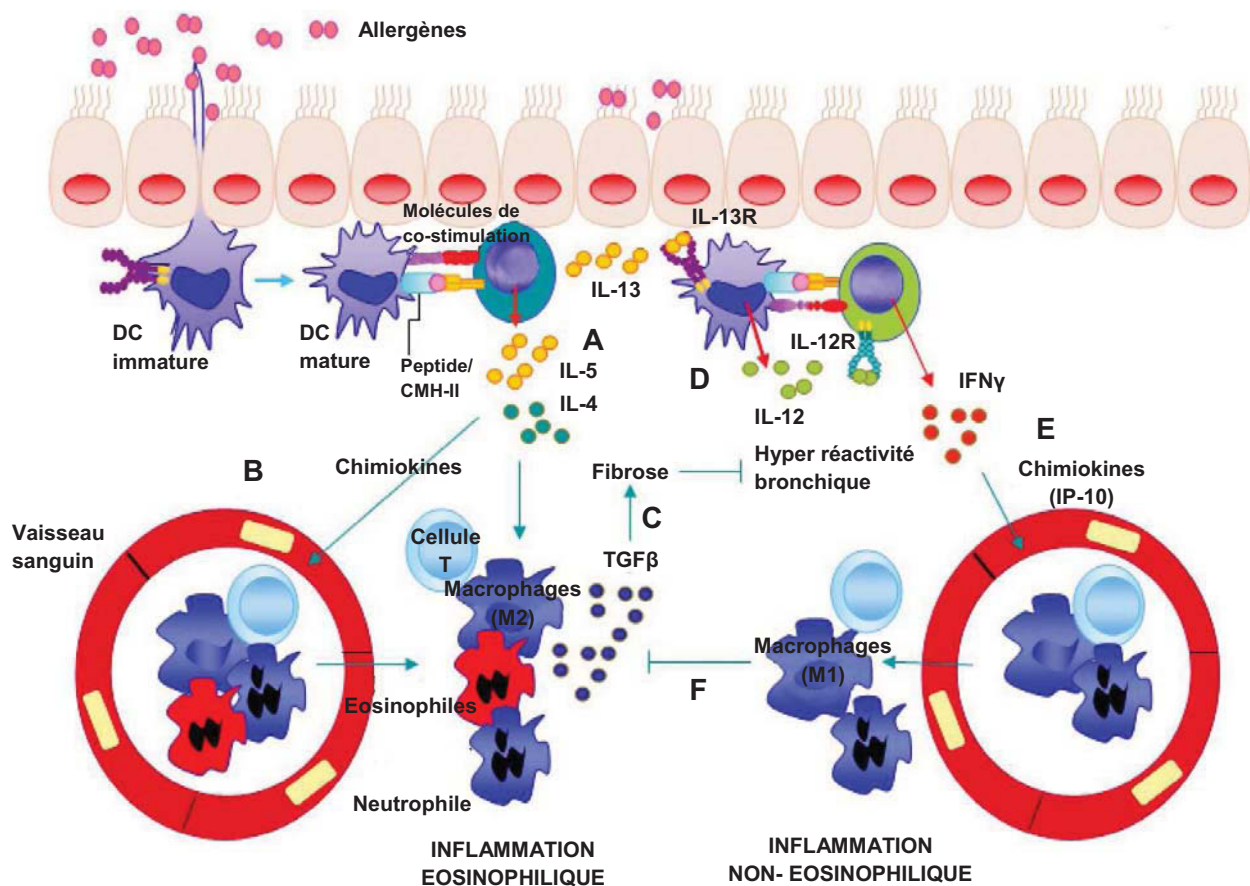


Figure 16: Modèle hypothétique d'exacerbation de la réponse Th2 par l'IL-13 et l'axe IL-12/STAT4/IFN γ .

Après inhalation de l'allergène, les cellules dendritiques pulmonaires présentent les peptides antigéniques aux cellules effectrices Th2 qui produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (A). Ces cytokines induisent le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons, telles les éosinophiles, via l'induction de chimiokines (B). Les macrophages (de type M2) et les éosinophiles produisent alors du TGF β à l'origine du remodelage bronchique et de la réduction de l'HRB (C). L'IL-13 induit la production d'IL-12 par les cellules dendritiques, favorisant la polarisation des Th1 via l'axe IL-12/STAT4/IFN γ . La production locale d'IFN γ active alors le recrutement de cellules inflammatoires non-éosinophiles comme les neutrophiles et les macrophages de type M1 via la production de chimiokines (IP-10) (E). Ces cellules peuvent alors inhiber l'action du TGF β favorisant ainsi l'HRB (F). (D'après Kim YS, 2010)

5. Les chimiokines importantes dans l'asthme allergique

Les chimiokines forment une grande famille de cytokines chimioattractantes qui sont réparties dans quatre groupes désignés CXC, CC, C et CX3C, en fonction du nombre d'acide-aminés entre les deux Cystéines conservées. Les chimiokines CXC ciblent majoritairement les neutrophiles et les lymphocytes, alors que les chimiokines CC ciblent un large panel de cellules incluant les macrophages, les éosinophiles, les basophiles et les cellules dendritiques.

Les chimiokines sont sécrétées par les cellules structurales ou les cellules inflammatoires après stimulation par un allergène, un pathogène ou d'autres molécules pro-inflammatoires (cytokines ou chimiokines) (Zimmermann et al., 2003). Elles participent à de nombreux processus physiologiques (maintien de l'homéostasie par exemple) ou pathologiques (inflammation, allergies, auto-immunité...) (Figure 17). De nombreuses chimiokines sont sur-exprimées chez les patients asthmatiques (Borish et al., 1996) où elles contribuent à la réaction inflammatoire locale en recrutant et activant les leucocytes, et en induisant la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les basophiles, les mastocytes, les neutrophiles et les éosinophiles.

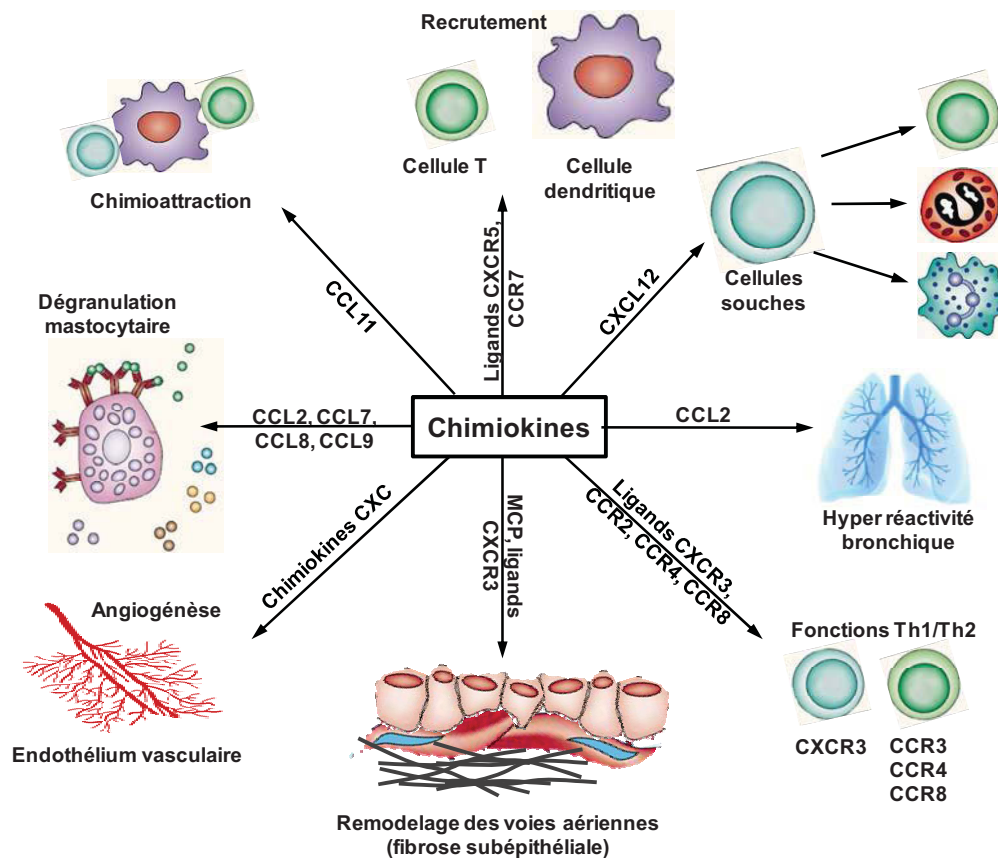


Figure 17: Implication des chimiokines dans les différents processus de l'asthme allergique. Les principales chimiokines ou leurs récepteurs sont indiqués au dessus des flèches à titre d'exemple. (D'après Zimmermann E, 2003)

CCL17 (éotaxine) et CCL5 (RANTES) sont les chimiokines les plus importantes dans l'inflammation pulmonaire allergique (Romagnani, 2002). CCL17 se lie exclusivement au récepteur CCR3 présent sur les éosinophiles, alors que CCL5 peut interagir avec plusieurs récepteurs tels CCR1, CCR3 et CCR5. Ces chimiokines participent au recrutement des éosinophiles au niveau pulmonaire via l'expression des intégrines $\alpha 4$ et $\beta 1$ qui facilitent leur transmigration vers les tissus (Ponath et al., 1996).

Des études utilisant des animaux déficients pour ces récepteurs ont prouvé l'importance de ces molécules dans différents modèles d'asthme allergique (Zimmermann et al., 2003). De même, l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre les chimiokines CCL11, CCL17, CCL3, CCL6 et CCL12 ont mis en évidence leur l'importance dans l'HRB ou dans le recrutement des différents effecteurs cellulaires de l'inflammation pulmonaire (Gonzalo et al., 1998; Rothenberg et al., 1997).

Les chimiokines jouent un rôle fondamental dans le recrutement des cellules inflammatoires et sont de ce fait la cible de nouveaux essais thérapeutiques chez l'Homme (Walsh, 2008).

RESULTATS ET DISCUSSIONS

ARTICLE 1 : ETUDE DE LA FONCTION DE L'INTERLEUKINE-22 DANS UN MODELE D'ASTHME ALLERGIQUE CHEZ LA SOURIS

La découverte d'un nouveau sous-type lymphocytaire en 2005, les Th17, a permis de mieux comprendre les mécanismes immunologiques mis en jeu au cours des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires chroniques ou de la lutte contre les bactéries extracellulaires (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005a). Longtemps considéré comme une pathologie exclusivement Th2, on sait aujourd'hui que l'asthme allergique est une maladie hétérogène dépendante des lymphocytes Th2, Th9, Th17 et Treg.

Les lymphocytes Th17 exercent leurs effets pro-inflammatoires par l'intermédiaire des cytokines qu'ils sécrètent, principalement l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22, et sont impliqués dans la pathogénèse de nombreuses maladies inflammatoires. Parmi les cytokines produites par les Th17, l'IL-17 est la mieux caractérisée. Différentes études ont mis en lumière le rôle de l'IL-17 dans l'asthme allergique (He et al., 2009 ; Park et al., 2009; Wong et al., 2009). En effet, il a été montré que l'IL-17 contribuait à l'induction de la réponse Th2 et au recrutement éosinophilique au cours de l'asthme allergique chez la souris (Song et al., 2008 ; Wakashin et al., 2009) En revanche, relativement peu d'études se sont intéressées au rôle de l'IL-22 dans les maladies inflammatoires allergiques. C'est pourquoi, nous avons entrepris l'étude de cette cytokine dans notre modèle d'asthme allergique.

L'IL-22 peut exercer des fonctions diverses en fonction de l'environnement inflammatoire. En effet, l'IL-22 peut avoir une action protectrice, comme dans certaines infections bactériennes intestinales ou pulmonaires (Liang et al., 2006 ; Zheng et al., 2008) A l'inverse, dans les pathologies inflammatoires de la peau, l'IL-22 est pro-inflammatoire (Sutton et al., 2009 ; Zheng et al., 2007).

Dans un premier temps, notre étude a montré une surexpression de l'IL-22 dans le sérum de patients asthmatiques, ainsi que dans les poumons des souris après immunisation et provocation allergénique. Par la suite, l'utilisation d'animaux déficients pour l'IL-22 a permis de mettre en évidence la participation de l'IL-22 dans l'induction de l'inflammation allergique pulmonaire dans un modèle d'asthme induit par l'ovalbumine. Cependant, la neutralisation de l'IL-22 par un anticorps neutralisant pendant la phase de provocation a révélé une exacerbation de l'inflammation pulmonaire, suggérant que l'IL-22 pourrait avoir un effet protecteur au cours de la phase effectrice. L'administration d'IL-22 recombinante au moment des provocations à l'OVA, a confirmé le rôle anti-inflammatoire de l'IL-22 dans cette phase. L'analyse des poumons par PCR et par cytométrie en flux a révélé une surexpression de l'IL-17A et F chez les souris déficientes en IL-22. Finalement, nous avons mis en lumière que l'effet pro-inflammatoire de l'IL-17 dépendait partiellement de l'IL-22, puisque la

neutralisation de l'IL-17 chez des souris déficientes en IL-22 exacerbe l'inflammation pulmonaire allergique.

Dual role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A

**Article en accepté dans “The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine”
(15 Décembre 2010)**

Anne-Gaelle Besnard¹, Robert Sabat², Laure Dumoutier^{3,4}, Jean Christophe Renaud^{3,4}, Monique Willart⁷, Bart Lambrecht⁷, Mauro M Teixeira⁵, Sabine Charron¹, Lizette Fick⁶, François Erard¹, Kerstin Wolk², Valérie Quesniaux¹, Bernhard Ryffel¹, and Dieudonnée Togbe¹

¹Université d’Orléans and CNRS, UMR 6218 Molecular Immunology and Embryology, 45071 Orléans

²Interdisciplinary Department of Molecular Immunopathology, Dermatology/Medical Immunology, University Hospital Charité, Berlin, Germany

³Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels branch, B-1200 Brussels, Belgium

⁴Experimental Medicine Unit, de Duve Institute, Université de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium

⁵Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Science, Department of biochemistry and Immunology, Pampoulha, Brazil

⁶Institute of Infectious disease and Molecular Medicine, University of Cape Town.

⁷Department of Respiratory Medicine, Laboratory for Translational Research in Obstructive Pulmonary Diseases, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium.

Corresponding author:

Bernard Ryffel, M.D. CNRS-UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex 2, France, Phone: + 33 238 25 7980, e-mail: bryffel@cnrs-orleans.fr

This work was supported by “Agence Nationale pour la Recherche” (ANR 2007 MIME-103-02), “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM allergy DAL 2007 0822007), “Fond européen de développement regional” (FEDER Asthme 1575-32168).

Scientific knowledge on the subject: IL-22 is important for the regulation of tissue responses during inflammation, but its role in allergic lung inflammation is unknown.

What this study adds to the field: IL-22 is required for the onset of ovalbumin-induced model of allergic asthma in mice, but inhibits the effector phase of asthma. IL-22 regulates the expression and the proinflammatory properties of IL-17A in experimental allergic asthma.

This article has an online data supplement which is available from this issue’s table of content online at www.atsjournals.org

ABSTRACT

Rationale: Interleukin-22 (IL-22) has both pro- and anti-inflammatory properties and its role in allergic lung inflammation has not been explored.

Objectives: To investigate the expression and roles of IL-22 in the onset and resolution of experimental allergic asthma and its cross-talk with IL-17A.

Methods: IL-22 expression was assessed in patient samples and in the lung of ovalbumin-immunized and challenged mice. IL-22 functions in allergic airway inflammation were evaluated using IL-22-deficient mice or anti-IL-22 neutralizing antibodies. Moreover, the effects of recombinant IL-22 and IL-17A neutralizing antibodies were investigated.

Measurements and main results: Increased pulmonary IL-22 expression is found in the serum of asthmatic patients and mice immunized and challenged with ovalbumin. Allergic lung inflammation is IL-22 dependent since eosinophil recruitment, Th2 cytokine including IL-13 and IL-33, chemokine production, airway hyperreactivity and mucus production are drastically reduced in IL-22-deficient mice or by IL-22 antibody neutralization during immunization of wild-type mice. By contrast, IL-22 neutralization during antigen challenge enhanced allergic lung inflammation with increased Th2 cytokines. Consistent with this, recombinant IL-22 given with allergen challenge protects mice from lung inflammation. Finally, IL-22 may regulate the expression and proinflammatory properties of IL-17A in allergic lung inflammation.

Conclusions: IL-22 is required for the onset of allergic asthma, but functions as a negative regulator of established allergic inflammation. Our study reveals that IL-22 contributes to the proinflammatory properties of IL-17A in experimental allergic asthma.

Key words: allergy, lung inflammation, Th2 response, IL-22, IL-17A

INTRODUCTION

Allergic asthma has increased dramatically in prevalence and severity over the last three decades. Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13 are involved in allergic response. The role of IL-17A in allergic airway inflammation has been extensively investigated in mice and human patients. IL-17A seems to contribute to Th2-cell-mediated and eosinophilic inflammation in asthma (1-5). Th17 cells co-express IL-17A, IL-17F and IL-22, under the control of IL-23 (6). Apart from Th17 cells, IL-22 is also produced by other cells such as Th22 (7, 8), Th1 (9), CD8⁺ T cells (9), $\gamma\delta$ T cells (10-12), classical and non-classical NK cells (9, 13, 14), and CD11c⁺ cells (15), but it is not produced by tissue cells (7, 8, 16). IL-22 receptor complex is composed of IL-22R and IL-10R β (17, 18), and is only expressed by non-hematopoietic cells such as hepatocytes, keratinocytes, lung and intestinal epithelial cells (19). IL-22 ligation to its receptor activates the STAT3 signaling pathway (20). Biological effects of IL-22 depend on tissue localization and cytokine environment (21-23). IL-22 is protective during acute inflammation in hepatitis model and in *Citrobacter rodentium* intestinal infection (15, 24, 25). In keratinocytes, IL-22 alone induced anti-bacterial proteins like β -defensins and S100A proteins (19). However, in experimental dermal inflammation IL-22 amplified inflammation (26, 27). The reason for this dual nature of IL-22 in the skin is probably the fact that IL-22 alone has only minimal inflammatory properties but it enhances the inflammatory effects of TNF- α , IL-1 β , IL-17 and GM-CSF (28-30).

Increased IL-22 immunoreactive cells and gene transcripts are found in the bronchial mucosa of COPD patients (31). However, IL-22 involvement to allergic lung inflammation has not yet been explored. IL-22 has been proposed to affect dendritic cells functions in an allergic model using IL-4R KO mice (32), which however do not express IL-22R (33). In order to investigate the role of IL-22 in allergic asthma, we compared the susceptibility of wild-type and IL-22-deficient mice to develop airway inflammation following ovalbumin immunization and challenge in the absence of adjuvant. We first found increased level of IL-22 in the serum of asthmatic patients and in the lung during experimental asthma in mice. Second, we showed that lung inflammation is reduced in IL-22-deficient mice or after IL-22 antibody neutralization during the sensitization phase. By contrast, IL-22 antibody blockade during the antigen challenge exacerbated, while exogenous IL-22 inhibited allergic lung inflammation. This indicates that IL-22 is required for the onset of allergic airway inflammation, but have inhibitory functions during the effector phase. Surprisingly, despite higher IL-17A levels, IL-22-deficient mice were protected from the disease. Finally, we demonstrated that IL-17A antibody blockade leads to asthma exacerbation in IL-22-deficient mice, suggesting that IL-22 contributes to the proinflammatory effect of IL-17A in allergic asthma. Some of these results have been previously reported in abstract form (34).

METHODS:

IL-22 levels in patients with allergic asthma

Serum was taken from healthy volunteers and patients with allergic asthma and tested for IL-22 levels by ELISA as described in online supplementary methods.

Mice

C57BL/6 wild-type mice and IL-22 KO were bred in our specific pathogen free animal facility at CNRS (Orléans, France). IL-22 KO mice (on C57BL/6 genetic background) were from Ludwig Institute for Cancer Research (Brussels, Belgium) (35). Mice were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a strict 12 hours light/dark cycle and were given free access to food and water. All protocols were approved by the CNRS institutional animal research committee and complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

Allergic airway inflammation induction

Ovalbumin induced allergic lung inflammation model was performed as described in online supplementary methods.

Bronchoalveolar lavage

Bronchoalveolar lavages (BAL) were performed as previously described (36).

Lung histology

3 µm sections of formalin-fixed, paraffin-embedded lung were stained with hematoxylin and eosin (HE) or with periodic acid Schiff reagent (PAS) and examined with a Leica microscope (x400 magnification) as described previously (37). Peribronchial infiltrates and mucus hypersecretion were assessed by a semi-quantitative score (0-3) by two independent observers.

Pulmonary eosinophil peroxidase (EPO) activity

EPO activity was determined in order to estimate eosinophil recruitment into the lung parenchyma as described (37).

Determination of airway hyper-responsiveness (AHR)

AHR was determined as described in supplementary methods.

Quantification of IL-4, IL-5, IL-1 β , IL-13, IL-17A, IL-22, IL-33, IgE, CCL5, CCL11 and CCL17

Cytokine and chemokine in BAL or lung homogenate were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits from R&D Systems (Abingdon, UK) according to manufacturer's recommendation as described in supplementary methods

Lung mononuclear cell isolation

Lung mononuclear cells were isolated from mice 24 hours after the last challenge as described (38). Lymphoid cells were plated in round-bottom 96-well plates (2×10^6 /ml) and restimulated 4h in vitro with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in complete medium (IMDM supplemented with 5% (vol/vol) FCS, L-glutamine (2 μ M), penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 μ g/ml) and β -Mercaptoethanol (50 nM) all from Invitrogen).

Flow cytometry analysis on lung mononuclear cells and mediastinal lymph nodes

FACS analysis on lung mononuclear cells is described in the online supplementary methods

Gene expression analysis

Lung tissues were processed for gene expression analysis as described in the online supplementary methods.

Mediastinal lymph node restimulation

Isolated mLN cells from OVA and saline-treated WT and IL-22 KO mice were plated in round-bottom 96-well plates at 5×10^6 cells/ml in complete medium and restimulated with OVA (10 μ g/ml) for 5 days.

Statistical analysis

The data are presented as the mean $\pm$ SEM with n = 6-10 animals per condition. The significance of differences between two groups was determined by one way ANOVA (non parametric test), followed by Bonferroni comparison test using Prism software. Statistical significance was reported if $P < 0.05$ was achieved: * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

RESULTS

Increased IL-22 expression upon allergic airway inflammation

We first examined whether IL-22 is modulated in allergic patients. We found increased IL-22 protein levels in serum from asthmatic patients compared to healthy volunteers (Fig. 1A), suggesting that IL-22 might contribute to an allergic response in human. Second, using an ovalbumin (OVA) antigen induced allergic lung inflammation model, we showed a significant induction of IL22 transcript in the lung of OVA sensitized and challenged mice (Fig. 1B). However we were unable to detect IL-22 protein by ELISA in the supernatant of lung homogenates. We then determined IL-22 produced by isolated lung infiltrating mononuclear cells from OVA-treated mice after PMA/ionomycin restimulation. Production of IL-22 was increased in OVA-treated mice compared to saline control 24 hours after ex vivo restimulation (Fig. 1C). No IL-22 was detectable in non-stimulated cells, or after antigen restimulation (data not shown). Therefore, IL-22 upregulation in asthmatic patients as well as in the mice model of asthma suggests a possible involvement of this cytokine in allergic airway inflammation.

IL-22 is required for allergic airway inflammation

To directly test the functional role of IL-22 in allergic lung inflammation model, we immunized wild-type (WT) and IL-22-deficient (IL-22 KO) mice on day 0 and 7 with OVA (subcutaneous injections of 10 µg OVA without alum) followed by three intranasal challenges on days 14, 15 and 16. OVA sensitized and challenged WT mice showed a robust cell infiltration into the lung compared to saline treated mice (Fig. 2A). By contrast, we found a significant reduction of eosinophil recruitment in BAL and in lung (EPO activity) in OVA-challenged IL-22-deficient mice compared to WT mice (Fig. 2A, B). Moreover, infiltrating lymphocytes were also significantly decreased in the airways of IL-22 KO mice (Fig. 2A). The reduced leukocyte infiltration seen in IL-22-deficient mice correlated with diminished Th2 cytokines including IL-5 in BAL (Fig. 2C), IL-13 and IL-33 in lung (Fig. 2D, E), and diminished IL-4 level in the culture supernatants of mediastinal lymph nodes after OVA restimulation (Fig. 2I). The expression of IL-1 β and of chemokines CCL11 (eotaxin), known to play a role in eosinophil influx into the lung, and CCL17 (TARC), which is a Th2 lymphocytes selective chemokine, were also drastically reduced in lung of OVA treated IL-22 KO mice compared to WT mice (Fig. 2F-H). Serum levels of OVA-specific IgE in IL-22-deficient mice were significantly lower than in WT mice, indicating a systemic impairment of the adaptive Th2 response in IL-22 KO mice (Fig. 2J). Airway hyper-responsiveness (AHR), a characteristic feature of allergic asthma, was assessed in WT and IL-22-deficient mice. OVA challenged and sensitized WT mice exhibited a significant change of lung resistance in response to intravenous methacholine, compared to saline treated mice (Fig. 2K). By contrast, lung resistance of

OVA treated IL-22 KO mice was significantly reduced compared to WT mice (Fig. 2K). Microscopically, lung tissue of OVA-challenged WT mice showed peribronchial mononuclear cell recruitment together with mucus overproduction and hyperplasia of the epithelium with hyperplasia of smooth muscle and goblet cells, parameters which were significantly reduced in IL-22 KO mice (Fig. 2L, M). Thus, IL-22 is required to develop a robust allergic response since lung function, inflammatory cell infiltration, cytokines and chemokines production and specific IgE response were impaired in IL-22-deficient mice.

Reduced allergic lung inflammation in IL-22-deficient mice correlates with impaired Th2 cytokine and chemokine expression and upregulation of IL-17A and F expression

To further investigate how IL-22 regulates allergic lung inflammation, we analyzed lung tissues from OVA challenged and sensitized WT and IL-22-deficient mice by quantitative RT-PCR. IL-4, IL-13 and IL-33 expression were significantly reduced in IL-22 KO mice compared to WT control mice after OVA challenge (Fig. 3A). Since adaptive IL-22 is produced by Th17 T cells, we analyzed Th17 related cytokines expression. IL-17A and IL-17F expression, but not IL-23, were significantly increased in the lung of OVA treated IL-22-deficient mice compared to WT mice (Fig. 3B). This indicates an upregulation of IL-17A and IL-17F in the absence of IL-22. The expression of Th1 cytokines IFN γ and IL-12 was not different in allergic WT and IL-22-deficient mice, while IL-6 expression was reduced (Fig. 3C). Further the expression of the regulatory factors IL-10, TGF β and Foxp3 was maintained in immunized IL-22-deficient mice (Fig. 3D). In addition, CCL2, CCL11 and CXCL10 chemokines expression were significantly decreased in IL-22-deficient mice (Fig. 3E). Taken together, our data suggest that the Th2 response is reduced, while the Th17 response is augmented in the absence of IL-22.

Reduced pulmonary T cells recruitment in the absence of IL-22

We then asked whether the number of T lymphocytes in lung was altered in IL-22-deficient mice. T lymphocyte recruitment in the lung was increased upon OVA sensitization and challenge in WT mice, but was reduced in IL-22-deficient mice (Fig. 4A). The frequency and absolute number of TCR β ⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells recruited in the lung upon OVA challenge were diminished in IL-22 KO mice as compared with WT mice (Fig. 4B-E). These results together with the reduced Th2 cytokines and chemokine levels might suggest that in the absence of IL-22, effector T cells are not efficiently recruited into the lung to mount a full adaptive response to OVA antigen during allergic inflammation.

IL-22 neutralization during the sensitization phase reduces allergic lung inflammation

To further ascertain that IL-22 produced during antigen immunization was required for the allergic response, and to exclude an unrelated effect in IL-22 KO mice, we tested the effects of IL-22 antibody neutralization during the sensitization phase. First we confirmed that the IL-22 antibody has neutralizing property. In fact IL-22 antibody injection (100 µg i.p.) inhibited rmIL-22 induced STAT3 phosphorylation in the lung (data not shown). Blocking endogenous IL-22 by the neutralizing IL-22 antibody during antigen sensitization decreased significantly eosinophil recruitment both into the airways and lungs (Fig. 5A, B), which was not found with the isotype control antibody (data not shown). Furthermore, IL-5, CCL11, CCL17 and IL-1 β levels (Fig. 5C-F) were reduced in the lung after IL-22 antibody neutralization. However, as expected the extent of inhibition by injection of IL-22 neutralizing antibodies is less than that observed in IL-22 gene-deficient mice. Thus, antibody blockade during sensitization confirms the data that IL-22 is required during immunization for the onset of allergic inflammation.

IL-22 neutralization during antigen challenge phase augments allergic lung inflammation

We then asked whether IL-22 neutralization during antigen challenge would have a comparable inhibitory effect. Surprisingly, IL-22 antibody blockade during the antigen challenge enhanced airway inflammation with increased accumulation of eosinophils and neutrophils (Fig. 6A) and augmented lung EPO activity (Fig. 6B). IL-22 antibody administration augmented significantly IL-17A in lung homogenate of immunized control mice (Fig. 6C). IL-5 in BAL, IL-13, IL-33 and IL-1 β in lung were increased in IL-22 antibody-treated mice as compared to untreated mice and isotype control antibody-treated mice (Fig. 6D-G). Further, the levels of the chemokine CCL11 and CCL17 in the lung were also increased by IL-22 neutralization (Fig. 6H, I). Histological lung sections showed that the robust pulmonary cellular infiltration and mucus production seen after OVA challenge were exacerbated by IL-22 antibody neutralization (Fig. S1). Therefore, IL-22 antibody neutralization during the challenge phase enhanced the allergic response, Th2 cytokines and IL-17A production suggesting that endogenous IL-22 produced in the challenge phase regulate negatively allergic asthma.

Exogenous IL-22 during antigen challenge reduces allergic inflammation

We therefore asked whether addition of exogenous recombinant murine IL-22 (rmIL-22) during the antigen challenge might inhibit experimental asthma. Consistent with the hypothesis that IL-22 may function as a negative regulator in the effector phase, exogenous IL-22 given with the antigen challenge significantly reduced eosinophil recruitment in BAL and lung (Fig. 7A, B). Further, the concentrations of IL-5 in BAL, IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL11 and CCL17 in lung and OVA-specific IgE in serum were reduced upon rmIL-22 administration (Fig. 7C-I). Interestingly, exogenous IL-22

treatment reduced IL-17A production in lung of OVA challenged mice (Fig. 7J). Microscopically, the peribronchial eosinophil and lymphocyte recruitment and hyperplasia of goblet cell and of smooth muscle were reduced after treatment with exogenous IL-22 protein (Fig. S2).

The fact that IL-22 antibody neutralization augments, and exogenous IL-22 treatment inhibits eosinophil influx into the lung and the airways, chemokines and cytokines production during the antigen challenge phase, indicates that IL-22 may function as a negative regulator, which contributes to the resolution of established allergic asthma.

IL-17A neutralization during antigen challenge restores allergic asthma in the absence of IL-22

To further address the contribution of IL-22 and its relation to IL-17A response in allergic lung inflammation, we analyzed the frequency of the different T lymphocyte populations including Th17 cell populations in WT and IL-22-deficient mice. Similar numbers of TCR β +CD4+, TCR β +CD8 α + and TCR $\gamma\delta$ + expressing IL-17A cells were observed in saline treated WT and IL-22-deficient mice (data not shown). We found an increased expression of IL-17A in TCR β + cells, which were mostly CD4+ cells (Fig. 8A-C, E, F), and to a lesser extent in TCR $\gamma\delta$ + cells (Fig. 8A, D, G) in IL-22 KO mice as compared to WT mice after OVA sensitization and challenge. However TCR $\gamma\delta$ + T cells do not appear to play a major role since TCR $\gamma\delta$ -deficient mice had the same phenotype as WT mice in our model of OVA induced allergic lung inflammation (data not shown).

IL-17A was described to exacerbate airway inflammation (1, 3, 4, 39), but we observed that despite IL-17A upregulation in the lung of IL-22-deficient mice, these mice are protected from allergic airway inflammation. We next asked whether IL-22 may contribute to the proinflammatory effect of IL-17A in allergic airway inflammation.

IL-17A antibody neutralization in WT mice during antigen challenge decreased allergic airway inflammation included eosinophil recruitment in BAL and lung (Fig. 9A, B), IL-5 level in BAL and IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL5 and CCL11 levels in lung (Fig. 9 C-H). By contrast, in the absence of IL-22, IL-17A antibody blockade during the antigen challenges partially restored eosinophil recruitment, IL-5 level in BAL and Th2 cytokine and chemokine levels in the lung (Fig. 9A-H). Histologically, cell infiltration and mucus overproduction that were seen in WT mice, were largely absent in IL-22-deficient mice upon OVA challenge, but were fully restored after IL-17A neutralizing antibody treatment in IL-22 KO mice (Fig. S3).

Therefore, the proinflammatory function of IL-17A during the challenge phase is partially dependent of IL-22, since IL-17A upregulation in IL-22-deficient mice is not sufficient to induce allergic airway inflammation. These data collectively indicate that the proinflammatory function of IL-17A depends on IL-22 availability.

DISCUSSION

IL-22 is known to have different functions depending on the nature of the affected tissue and the local cytokine milieu. We examined here the role of IL-22 in a mouse model of allergic asthma and report distinct roles in the onset and resolution of allergic asthma. First, we found augmented pulmonary expression of IL-22 in OVA sensitized and challenged mice, which may be relevant since we also found increased IL-22 levels in the serum of human patients with allergic asthma. Functionally, IL-22 expressed in allergic asthma may play a proinflammatory role as we report a significant reduction of allergic airway inflammation in IL-22-deficient mice with an important decrease in eosinophil recruitment and in inflammatory cytokine levels compared to WT mice. Quantitative PCR analysis confirmed a reduction of the Th2 cytokines including IL-13 and IL-33 and chemoattractant chemokines in the lung of sensitized and challenged IL-22-deficient mice. Importantly, no significant difference was observed in IL-12, IFN γ , IL-10, TGF β and Foxp3 gene expression, suggesting that the decrease in airway inflammation in IL-22 KO mice is likely not due to reduction of Th1 response and augmented regulatory factors. In addition, IL-22 antibody neutralization in WT mice during the sensitization phase diminished allergic inflammation. These data indicate that IL-22 is required to develop allergic airway inflammation in mice. Reduced allergic inflammation is associated further with diminished IL-33 production and T cell recruitment into the lung as well as Th2 polarization and specific IgE production. Furthermore, we also found a decrease of IL-13 levels in the lung of IL-22-deficient mice, which correlates with diminished airway hyper-responsiveness. Our data suggest that IL-22/IL-22R signaling is critical for allergic airway inflammation. In the lung, the major source of IL-22 seems to be T cells, likely Th17 or $\gamma\delta$ T cells (23, 40). Furthermore, a distinct NK cell population, which expresses IL-22 but not IL-17, was newly discovered in human and mice in the mucosa-associated lymphoid tissues (13, 14, 41). These cells, called NK-22, provide protection and regulate the mucosal homeostasis (41, 42). However, we could not detect NK-22 cells in the allergic lung response.

Despite the lack of its receptor expression on immune cells, IL-22 could have considerable indirect effects on immunity and leukocyte functions. Intraperitoneal injection of IL-22 in mice leads to hepatic gene expression of acute-phase protein such as serum-amyloid protein A (SAA) (43). SAA increases bacteria and virus opsonization, cell trafficking and chemotaxis, and cytokine and chemokine expression (44). On respiratory epithelial cells, IL-22 upregulates G-CSF, anti-microbial proteins (β -defensin, S100 protein family and lipocalin), the neutrophilic granulocyte-attracting chemokines CXCL1 and CXCL5, and the mucus associated protein MUC1 (45). Therefore, these data indicate that IL-22 can contribute to airway inflammation by inducing chemoattractant chemokine

and SAA, recruiting and activating lymphocytes and enhancing the effect of the Th2 cytokines including IL-13 and IL-33.

We investigated the role of IL-22 during established allergic inflammation and we showed that IL-22 antibody neutralization during the challenge phase exacerbates the disease indicating a tissue protective role for IL-22. Consistent with this hypothesis, we found that recombinant IL-22 given with the OVA challenge protects from lung inflammation. These results demonstrate that IL-22 functions as a negative regulator in established allergic inflammation. Our data are consistent with a recent report suggested that IL-22 antibody neutralization in IL-4R KO mice during established asthma enhanced eosinophils recruitment and allergic lung inflammation (32). However, the authors ascribe the negative regulatory function of IL-22 to a direct effect of this cytokine on dendritic cells, although IL-22 receptor expression has never been reported on these cells (19, 33, 46). To address the possibility that IL-22 may affect dendritic cells functions, we investigated OVA uptake and processing by myeloid dendritic cells and OVA-induced upregulation of co-stimulatory molecules, but we were unable to show any effects of IL-22 on these cells. In line with our assumption, IL-22 may likely acts on the respiratory epithelium modulating chemokine expression and epithelial repair (19, 45, 47). Importantly, it has been recently shown that IL-22 may protect mouse pulmonary epithelial cells from bleomycin-induced apoptosis, and that IL-22-mediated protection was associated with increased expression of the anti apoptotic genes Bcl2 and Bcl2l1 (23). In the context of allergic asthma, “danger signals” released by cellular stress or cell death contribute to airway inflammation through inflammasome activation and IL-1 β production (48). Therefore, IL-22 may exert its protective effect during the effector phase by reducing airway epithelial cell death.

Our study also highlights a role of IL-22 in IL-17A expression. First, we observed an increase of IL-17A and IL-17F gene expression in IL-22-deficient mice after allergen sensitization and challenge. Flow cytometric analysis revealed that IL-17A is mainly produced by TCR β +CD4+ and to a lesser extent by TCR $\gamma\delta$ + cells in the lung of allergic mice. Second, antibody blockade of IL-22 during OVA challenge upregulates IL-17A expression in the lung leading to exacerbation of allergic airway inflammation. Finally, we showed that IL-17A production is abolished in the lung by exogenous IL-22 treatment during antigen challenge, which protects mice from lung inflammation. These data suggest that the regulation of IL-17A production by IL-22 is critical during effector phase of allergic asthma. Previous studies had already shown a cross-talk between IL-17A and IL-22 production (49, 50). Sonnenberg et al. showed in vitro that IL-17A could suppress IL-22 expression from Th17 cells in a dose dependent manner (23). In vivo, they found an increase of IL-22 in the lung of IL-17A-deficient mice after bleomycin injury. Collectively, these observations suggest a reciprocal regulation of IL-17A and IL-22. However, the underlying molecular mechanisms are unknown.

Surprisingly, despite increased IL-17A production, IL-22-deficient mice were protected from allergic lung inflammation, indicating that IL-17A acts in synergy with IL-22 to promote airway inflammation. Consistent with this, we observed a partial loss of protection after IL-17A antibody treatment in IL-22-deficient mice. These data indicate that IL-22 is required for IL-17A proinflammatory properties. Other studies suggest that IL-17A and IL-22 act synergistically in the airways, and that IL-22 requires the presence of IL-17A to promote expression of inflammatory cytokines and chemokines leading to the recruitment of neutrophils (23, 43).

In conclusion, we report distinct functions of IL-22 in murine allergic asthma. OVA-induced airway inflammation was diminished in IL-22-deficient mice or by anti-IL-22 antibody treatment during the sensitization of WT mice, indicating a proinflammatory role for IL-22 in the onset of the disease. In contrast, IL-22 plays a regulatory role in established asthma and participates to the resolution of inflammation. Our study also revealed that IL-22 may regulate the expression of the proinflammatory IL-17A in allergic mice. A better understanding of IL-22 effect on pulmonary epithelial cells and its cross-talk with IL-17A in allergic airway inflammation may lead to novel targets to treat allergic asthma.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Catherine Uyttenhove, for providing neutralizing IL-17A antibodies, critical reading and comments.

REFERENCES

1. He R, Kim HY, Yoon J, Oyoshi MK, MacGinnitie A, Goya S, Freyschmidt EJ, Bryce P, McKenzie AN, Umetsu DT, et al. Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:761-770 e761.
2. Park SJ, Lee KS, Kim SR, Min KH, Choe YH, Moon H, Chae HJ, Yoo WH, Lee YC. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009;183:3259-3267.
3. Song C, Luo L, Lei Z, Li B, Liang Z, Liu G, Li D, Zhang G, Huang B, Feng ZH. IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 2008;181:6117-6124.
4. Wakashin H, Hirose K, Iwamoto I, Nakajima H. Role of IL-23-Th17 cell axis in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2009;149 Suppl 1:108-112.
5. Wong CK, Lun SW, Ko FW, Wong PT, Hu SQ, Chan IH, Hui DS, Lam CW. Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma. *Immunol Invest* 2009;38:652-664.
6. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-2279.
7. 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;123:1244-1252 e1242.
8. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(h)-17, T(h)1 and T(h)2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864-871.
9. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: Immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002;168:5397-5402.
10. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 2009;31:321-330.
11. Siegemund S, Schutze N, Schulz S, Wolk K, Nasilowska K, Straubinger RK, Sabat R, Alber G. Differential IL-23 requirement for IL-22 and IL-17A production during innate immunity against salmonella enterica serovar enteritidis. *Int Immunol* 2009;21:555-565.
12. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009;31:331-341.
13. Satoh-Takayama N, Vosschenrich CA, Lesjean-Pottier S, Sawa S, Lochner M, Rattis F, Mention JJ, Thiam K, Cerf-Bensussan N, Mandelboim O, et al. Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* 2008;29:958-970.
14. Colonna M. Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 2009;31:15-23.
15. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282-289.
16. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, Carbone T, Nasorri F, Pallotta S, Cianfarani F, Odorisio T, Traidl-Hoffmann C, Behrendt H, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119:3573-3585.
17. Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renauld JC. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: Molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10144-10149.

18. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL. Interleukin (il)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins crf2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275:31335-31339.
19. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004;21:241-254.
20. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the jak/stat, erk, jnk, and p38 map kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from il-10. *J Biol Chem* 2002;277:33676-33682.
21. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK, Blumberg RS, Xavier RJ, Mizoguchi A. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2008;118:534-544.
22. Munoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R, Bereswill S, Fischer A, Dunay IR, Wolk K, et al. Interleukin (IL)-23 mediates toxoplasma gondii-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 2009;206:3047-3059.
23. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010.
24. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 2004;39:1332-1342.
25. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27:647-659.
26. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, Ouyang W. Interleukin-22, a T(h)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445:648-651.
27. Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, Senices M, Gill D, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:597-607.
28. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006;36:1309-1323.
29. Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med* 2009;87:523-536.
30. Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Docke WD, Asadullah K, Volk HD, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009;39:3570-3581.
31. Di Stefano A, Caramori G, Gnemmi I, Contoli M, Vicari C, Capelli A, Magno F, D'Anna SE, Zanini A, Brun P, et al. T helper type 17-related cytokine expression is increased in the bronchial mucosa of stable chronic obstructive pulmonary disease patients. *Clin Exp Immunol* 2009;157:316-324.
32. Schnyder B, Lima C, Schnyder-Candrian S. Interleukin-22 is a negative regulator of the allergic response. *Cytokine* 2010;50:220-227.
33. Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, Thilo J, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, et al. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* 2008;83:1181-1193.
34. Besnard Anne-Gaelle RS, Laure Dumoutier, Jean Christophe Renaud, Monique Willart, Bart Lambrecht, Mauro M Teixeira, Sabine Charon, Lizette Fick, François Erard, Kerstin Wolk, Valérie Quesniaux, Bernhard Ryffel, and Dieudonné Togbe. IL-22 as a dual regulator of allergic lung

inflammation [abstract]. Presented at the international conference on Innate and Adaptive Immunoregulatory Mechanisms, WIRM-IV, Davos, Switzerland, 29 march-01 April 2010; 2010.

35. Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renauld JC, Becher B. IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007;179:8098-8104.

36. Gasse P, Riteau N, Charron S, Girre S, Fick L, Petrilli V, Tschopp J, Lagente V, Quesniaux VF, Ryffel B, et al. Uric acid is a danger signal activating NALP3 inflammasome in lung injury inflammation and fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:903-913.

37. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, Fossiez F, Ryffel B, Schnyder B. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006;203:2715-2725.

38. Hachem P, Lisbonne M, Michel ML, Diem S, Roongapinun S, Lefort J, Marchal G, Herbelin A, Askenase PW, Dy M, et al. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: Role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2005;35:2793-2802.

39. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-1141. Epub 2005 Oct 1132.

40. Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Gammadelta T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 2007;207:2239-2253.

41. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK, Doherty JM, Mills JC, Colonna M. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009;457:722-725.

42. Luci C, Reynders A, Ivanov II, Cognet C, Chiche L, Chasson L, Hardwigsen J, Anguiano E, Banchereau J, Chaussabel D, et al. Influence of the transcription factor RORgammaT on the development of Nkp46+ cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 2009;10:75-82.

43. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, Goldman SJ, Dunussi-Joannopoulos K, Williams CM, Wright JF, et al. An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment. *J Immunol* 2007;179:7791-7799.

44. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid a, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-523.

45. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, Reinhart TA, McAllister F, Edeal J, Gaus K, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 2008;14:275-281.

46. Dumoutier L, Van Roost E, Ameye G, Michaux L, Renauld JC. IL-TIF/IL-22: Genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 2000;1:488-494.

47. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, Zheng Y, Wittkopf N, Warntjen M, Lehr HA, Hirth S, Weigmann B, Wirtz S, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 2009;206:1465-1472.

48. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, Hoogsteden HC, Luttmann W, Ferrari D, Di Virgilio F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007;13:913-919.

49. Smith E, Stark MA, Zarbock A, Burcin TL, Bruce AC, Vaswani D, Foley P, Ley K. IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "Short-loop" Inhibition via IL-17 receptor. *J Immunol* 2008;181:1357-1364.

50. Von Vietinghoff S, Ley K. IL-17A controls IL-17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. *J Immunol* 2009;183:865-873.

51. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol*. 2007; 178(9): 5973-81

FIGURE LEGENDS

Figure 1: IL-22 is induced during allergic asthma.

IL-22 concentration was quantified by ELISA in serum from asthmatic patients versus healthy individuals (A). Mice were sensitized with OVA on days 0 and 7 and challenged three times with saline or OVA on days 14-16. 24 hours after the last challenge lung are analyzed for *IL22* gene transcript by qPCR (B). IL-22 protein quantification was performed by ELISA on lung mononuclear cells culture supernatants after 24 hours PMA/ionomycin stimulation (C). These experiments were performed twice. One representative experiment is shown. Individual values and mean are indicated for human samples; mean $\pm$ SEM of 6 mice per group are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$.

Figure 2: Reduced allergic asthma in IL-22-deficient mice.

OVA sensitized WT and IL-22 KO mice were challenged three times with OVA instillation. 24 hours after the third challenge, eosinophil numbers were determined in the bronchoalveolar lavage (BAL) (A). EPO activity, IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL11 and CCL17 in the lung homogenate (B, D-H) and BAL IL-5 level (C) were measured by ELISA. IL-4 levels in the cell culture supernatants of mediastinal lymph nodes restimulated in vitro for 5 days with OVA were accessed by ELISA (I). OVA-specific IgE concentrations were assayed in serum from OVA treated WT and IL-22 KO mice by ELISA (J). Airway hyper-responsiveness to increasing doses of metacholine (Mch) was measured 24 hours after the last saline or OVA challenge on WT and IL-22 KO mice by recording changes in lung resistance (K). The formalin-fixed lung sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to visualize cell recruitment and with periodic acid Schiff reagent (PAS) to visualize mucus (L). Representative sections from saline control and OVA treated WT and IL-22 KO mice are shown. Magnification is x400, B and V mean bronchus and vessel respectively. A semi-quantitative histological assessment of cell infiltration and mucus hypersecretion was performed by two independent observers (M). A scale from 0 to 3 is given on the axis. These experiments were performed four times (n = 6 mice per group). Values are the mean $\pm$ SEM. of 6-11 mice per group. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 3: IL-22-deficient mice develop impaired Th2 response but upregulate IL-17A and F.

OVA sensitized WT and IL-22 KO mice were challenged three times with saline or OVA. 24 hours after the third challenge, RNA was extracted from lung tissue and analyzed for mRNA transcripts. IL-4, IL-13, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-23(p19), IFN γ , IL-12(p35), IL-6, IL-10, TGF β , Foxp3, CCL2, CCL11, and CXCL10 transcript levels were quantified by real time quantitative PCR (A-E). These experiments were performed twice (n = 6 mice per group). Mean values $\pm$ SEM are shown. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant.

Figure 4: Reduced pulmonary recruitment of T cells in the absence of IL-22.

Lung mononuclear cells from OVA sensitized and challenged WT and IL-22 KO mice were isolated and restimulated for 4 hours with PMA and ionomycin followed by TCR $\alpha\beta$ and TCR $\gamma\delta$ antibody staining. The frequency and the absolute numbers of TCR $\alpha\beta$ ⁺ and TCR $\gamma\delta$ ⁺ cells (A-E) are shown. These experiments were performed three times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group (B-E). *P $\leq$ 0.05; *** P $\leq$ 0.001.

Figure 5: IL-22 neutralization during sensitization phase reduces airway allergic inflammation.

WT mice were sensitized with OVA on days 0 and 7 with or without neutralizing IL-22 antibody or isotype control treatment (100 μ g by i.p. injection). Then mice were challenged three times with OVA instillation. 24 hours after the third challenge, eosinophil numbers and EPO activity were determined in the BAL and in the lung respectively (A, B). IL-5, IL-1 β , CCL11 and CCL17 were measured by ELISA in the lung homogenates (C-F). These experiments were performed three times. One representative experiment is shown. Values are the mean $\pm$ SEM. of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ns, not significant.

Figure 6: IL-22 neutralization during effector phase increases airway allergic inflammation.

OVA sensitized WT mice were challenged three times with OVA instillation with or without neutralizing IL-22 antibody or isotype control treatment (100 μ g by intranasal route on days 14-16) during challenge phase. 24 hours after the third challenge, eosinophil, lymphocyte, neutrophil counts and IL-5 concentration were determined in the BAL (A, D). EPO activity, IL-17A, IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL11 and CCL17 concentrations were measured in the lung homogenates by ELISA (B, C, E-I). These experiments were performed three times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6-10 mice per group.*P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001; ns, not significant.

Figure 7: Exogenous IL-22 prevents established allergic airway inflammation.

OVA sensitized WT mice were challenged three times with OVA instillation with and without recombinant murine IL-22 treatment (1 μ g i.n. on days 14, 15 and 16) during the effector phase. 24 hours after the third challenge, eosinophil counts and IL-5 levels were determined in the BAL (A, C). EPO activity, IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL11, CCL17 and IL-17A concentrations were measured by ELISA in the lung homogenates (B, D-H, J). OVA-specific IgE concentrations were assayed in serum from OVA rmIL-22 treated WT mice by ELISA (I). These experiments were performed three times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001; ns, not significant.

Figure 8: IL-17A is upregulated in T lymphocytes of IL-22-deficient mice

OVA sensitized WT and IL-22 KO mice were challenged three times with OVA. 24 hours after the third challenge, lung mononuclear cells were isolated and restimulated with PMA and ionomycin in presence of brefeldin A followed by extracellular staining of TCR β , TCR $\gamma\delta$, CD4 and CD8 α , and intracellular staining of IL-17A. Representative dot plots (A), the frequency and cell number of TCR β + CD4+ IL-17A+ (B, E), TCR β + CD8 α + IL-17A+ (C, F), and TCR $\gamma\delta$ + IL-17A+ (D, G) cell populations are given. These experiments were performed three times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01.

Figure 9: IL-17A neutralization restores allergic airway inflammation in IL-22-deficient mice.

OVA sensitized WT or IL-22-deficient mice were OVA challenged three times with or without treatment with neutralizing IL-17A antibody. 24 hours after the last challenge, eosinophil counts and IL-5 concentrations were determined in the BAL (A, C). EPO activity, IL-13, IL-33, IL-1 β , CCL5 and CCL11 concentrations were measured by ELISA in the lung homogenates (B, D-H). These experiments were performed three times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001; ns, not significant.

ONLINE SUPPLEMENTARY METHODS

Material

O-phenylenediamine, 3-amino-1,2,4-triazole, horseradish peroxidase, OVA grade V, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). The antibodies used for FACS analysis, FITC-anti-CD3e (clone 145-2C11), FITC-anti-TCR $\gamma\delta$ (clone GL3), PE-anti-IL-17A (clone TC11-18H10), PerCP-anti-CD4 (clone RMA-5), biotin-anti-CD8 α (clone 53-6.7), biotin-anti-TCR β (clone H57-597) and isotype-matched controls were purchased from Pharmingen (San Diego, CA). Anti-IL-22, anti-IL-17A neutralizing monoclonal antibodies and recombinant IL-22 protein were from Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium.

IL-22 in serum of human patients

For measurement of IL-22 serum levels, venous blood was obtained from eighteen healthy controls [without allergy and smoking; 24 to 62 years old (mean $\pm$ SD: 38.5 $\pm$ 13 years), 6 male and 12 female] and fourteen patients with active allergic asthma [without smoking; 20 to 64 years old (mean $\pm$ SD: 38.6 $\pm$ 13 years), 7 male and 7 female]. All blood samples were approved by the clinical institutional review board of the Charité University Hospital, Berlin. Human IL-22 ELISA from R&D Systems (clone 142906, mouse IgG1) was used.

Allergic airway inflammation induction

All mice were sensitized subcutaneously twice at days 0 and 7 with 10 μ g Ovalbumin (OVA, grade V, Sigma) without hydroxide aluminium (alum) adjuvant. Mice were challenged three times by intranasal routes on days 14, 15 and 16 with 10 μ g of OVA. Control mice were challenged with saline alone. IL-22 antibody treatment was given 1h before the sensitization (100 μ g i.p. injection) or during OVA challenge (100 μ g intranasally). Recombinant murin IL-22 treatment (1 μ g/i.n.) and neutralizing IL-17A antibody treatment (5 μ g/i.n.) were done three times on days 14, 15 and 16 during antigen challenges. Mice were killed with a high dose of Ketamine/Xylazine i.p. 24h after the last challenge. After bronchoalveolar lavage (BAL), lungs were perfused with an acid free balanced electrolyte solution (Beckman Coulter, Krefeld, Germany). Half of the lung was stored at -80°C for EPO enzyme, cytokines and chemokines quantification and the other half was fixed overnight in buffered 4% formaldehyde solution for histology analysis. Mediastinal lymph nodes (mLN) were removed for OVA antigen specific restimulation. BAL fluid was analyzed for cell composition and cytokine concentrations.

Quantification of IL-4, IL-5, IL-1 β , IL-13, IL-17A, IL-22, IL-33, IgE, CCL5, CCL11 and CCL17

Cytokine and chemokine concentrations in BAL or lung homogenate supernatants and OVA-specific IgE in sera were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using rat monoclonal antibody kits from R&D Systems (Abingdon, UK) according to manufacturer's recommendation (IL-4, clone 30340; IL-5, clone TRFK5; IL-1 β , clone 30311; IL-13, clone 38213; IL-17A, clone 50101; IL-22, clone 140301; IL-33, clone 396118; CCL5, clone 53405; CCL11, clone 42285; CCL17, clone 110946). To validate the assays pure BAL and lung homogenate were spiked with relevant levels of recombinant cytokines, and the expected amounts of cytokines were detected in the biological fluid.

Gene expression analysis

Lung tissues were isolated from mice 24 hours after the last challenge and stored at -80°C after snap-freezing. Tissue samples were homogenized during thawing in lysing solution from the Invisorb® RNA kit II (Invitex Berlin, Germany) by means of the Omni labor homogenizer (Südlabor, Gauting, Germany). Isolation of total cellular RNA was performed using Invisorb® RNA kit II (Invitex). Messenger RNA was reverse transcribed as described previously (51), and analyzed in triplicate assays by TaqMan™ qPCR using TaqMan™ universal master mix and either the ABI Prism™ 7700 Sequence Detection System or the Step one plus (all from Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The detection systems for mouse IL-4, IL-13, IL-33, IL-17A, IL-17F, IL-23(p19), IL-12(p35), IL-6, TGF β , Foxp3, CCL2, CCL11, CXCL10 were purchased from Applied Biosystems. For the detection of mouse IL-10, IL-22, INF γ and matching house-keeping gene hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (HPRT), previously established detection systems with amplification efficiencies of nearly equal to 1 using exon-exon boundary spanning double-labeled (FAM/BQR) probes. For the detection of all other expressions, systems purchased from Applied Biosystems were used together with the respective matching system for HPRT. All expression levels were analyzed in parallel and calculated relative to those of HPRT obtained with an every matching analysis system.

Flow cytometry analysis on lung mononuclear cells

Cell suspensions from lung were restimulated in vitro for 4h in complete medium with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in presence of brefeldine A (GolgiPlug, BD Biosciences, France). To prevent a specific binding to FcR, 2.4.G2 blocking purified antibody was used. After 4h, cells were stained with the following monoclonal antibodies, FITC-labeled TCR $\gamma\delta$, biotin-labeled TCR β , V450-labeled CD4, and APC-Cy7-labeled CD8 α and isotype-matched controls were purchased from Pharmingen (San Diego, CA). Cells were permeabilized for 20 min with cytofix/cytoperm kit (BD Biosciences, France) and stained with PE-labeled IL-17A antibody. Samples were analyzed on a BD

CANTO II flow cytometer. Data were acquired by using DIVA software (BD Bioscience, France) and analyzed using FlowJO software (Treestar).

Determination of AHR

For invasive measurement of lung resistance, 24 hour after the last OVA challenge, mice were anesthetized with urethane, paralyzed using D-tubocurarine (Sigma), tracheotomised with an PE10 trachea catheter, followed by mechanical ventilation with flexivent apparatus (SCIREQ, Montreal, Canada). Increasing concentrations of metacholine (Mch) (2,3-150 mg/ml) were administrated via the jugular vein. Dynamic resistance was recorded after and baseline resistance was restored before administering the subsequent doses.

Supplemental Figure legends

SUPPLEMENTARY LEGEND

Figure S1: IL-22 neutralization during effector phase increases airway allergic inflammation.

OVA sensitized WT mice were challenged three times with OVA instillation with or without neutralizing IL-22 antibody or isotype control treatment (100 µg by intranasal route on days 14-16) during challenge phase. 24 hours after the third challenge histological sections of lungs from untreated and anti-IL-22 treated mice were stained for hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid Schiff reagent (PAS). One representative experiment is shown. Magnification is x400, B and V mean bronchus and vessel respectively (A). A semi-quantitative histological score of cell infiltration and mucus hypersecretion was performed by two independent observers (B). A scale from 0 to 3 is given on the axis. These experiments were performed three times. Values are the mean ± SEM of 6-10 mice per group. *P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001; ns, not significant.

Figure S2: Exogenous IL-22 prevents established allergic airway inflammation.

OVA sensitized WT mice were challenged three times with OVA instillation with and without recombinant murine IL-22 treatment (1 µg i.n. on days 14, 15 and 16) during the effector phase. 24 hours after the third challenge histological sections of lung from untreated and IL-22 treated mice were stained for hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid Schiff reagent (PAS). One representative experiment is shown. Magnification is x400, B and V mean bronchus and vessel respectively (A). A semi-quantitative histological score of cell infiltration and mucus hypersecretion was performed by two independent observers (B). These experiments were performed three times. Values are the mean ± SEM of 6 mice per group. *P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001; ns, not significant.

Figure S3: IL-17A neutralization restores allergic airway inflammation in IL-22-deficient mice.

OVA sensitized WT and IL-22 KO mice were challenged three times with OVA. 24 hours after the third challenge lung histological sections at this time point were stained for hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid Schiff reagent (PAS). One representative experiment is shown. Magnification is x400, B and V means bronchus and vessel respectively (A). A semi-quantitative histological score of cell infiltration and mucus hypersecretion was performed by two independent observers (B). These experiments were performed three times. Values are the mean ± SEM of 6 mice per group. *P ≤ 0.05; ** P ≤ 0.01; *** P ≤ 0.001; ns, not significant.

Figure 1

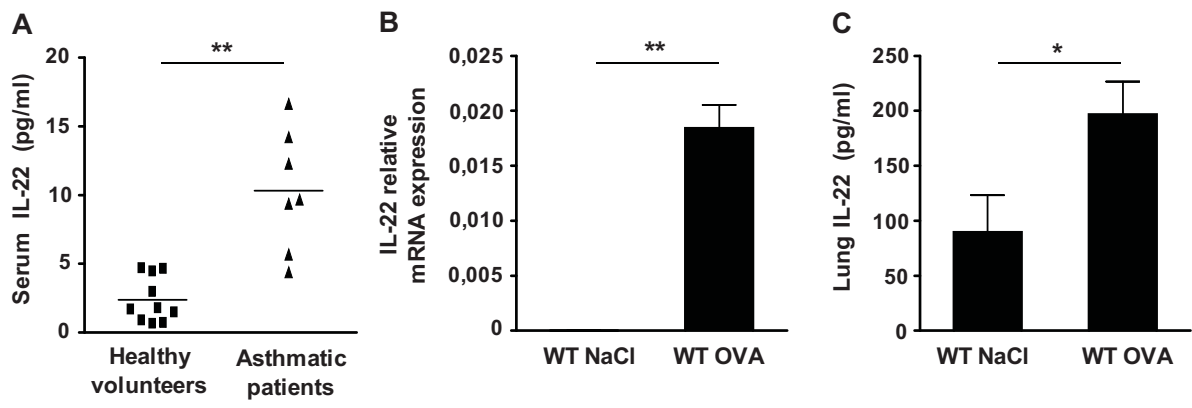


Figure 2

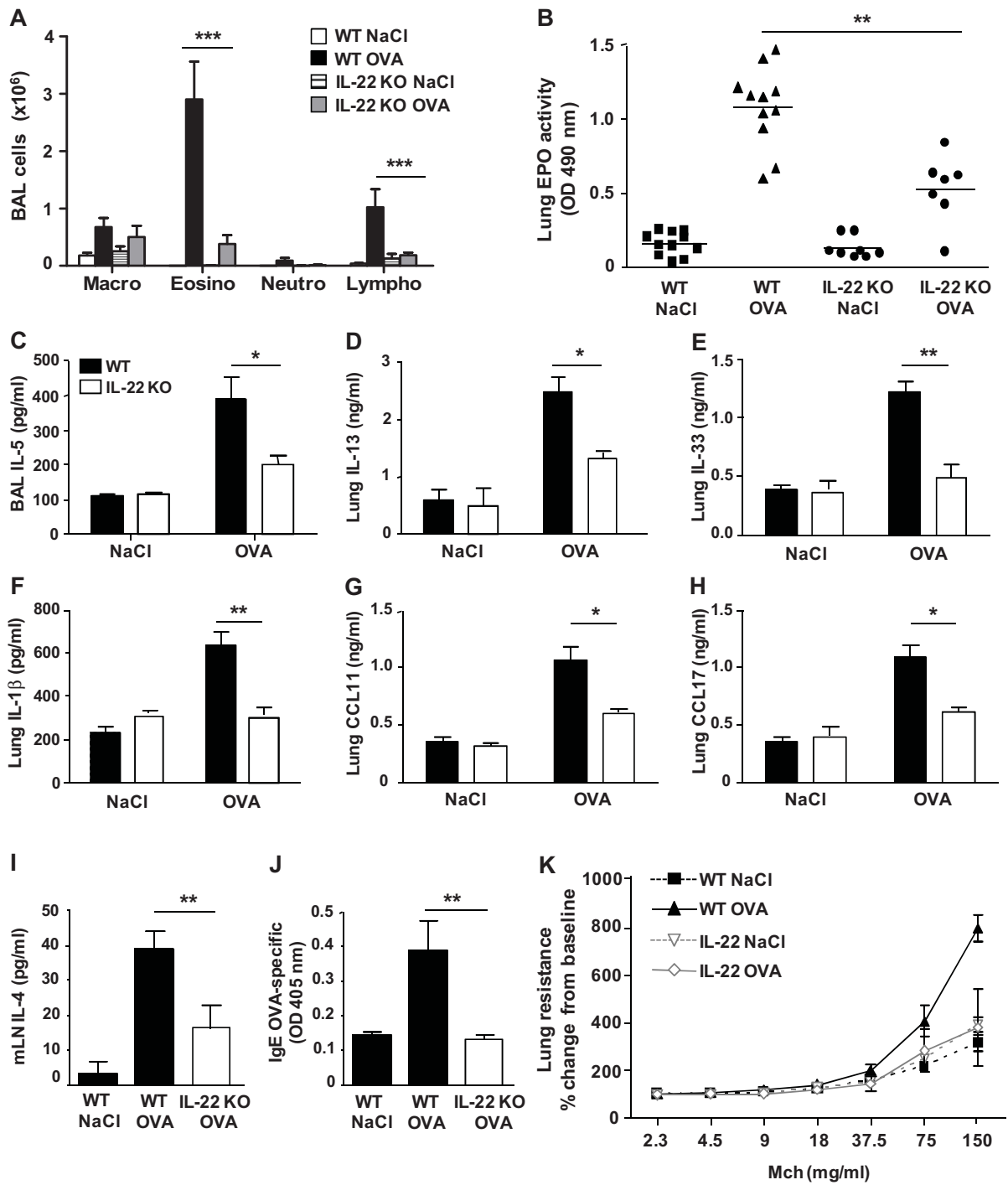


Figure 2

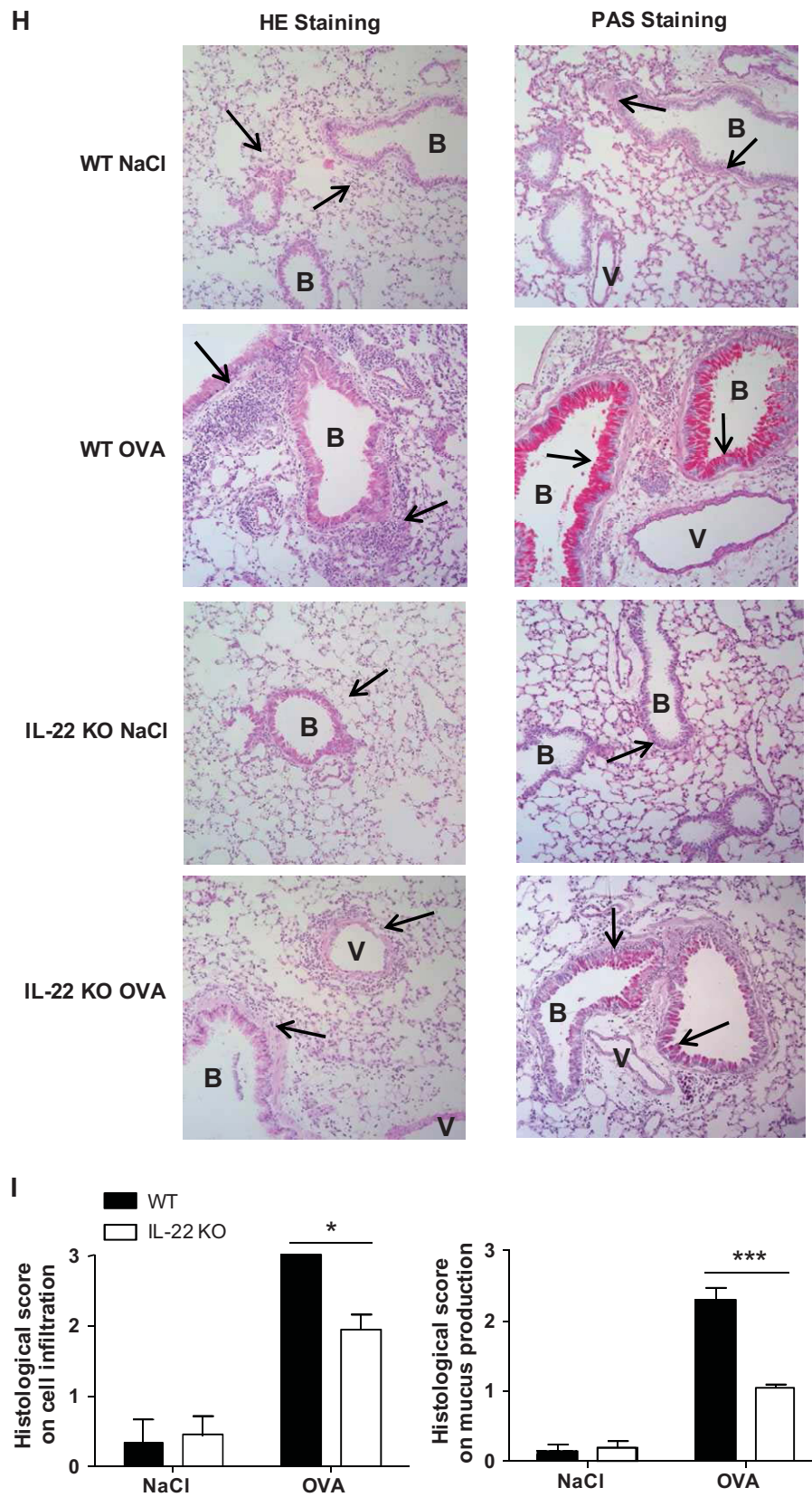


Figure 3

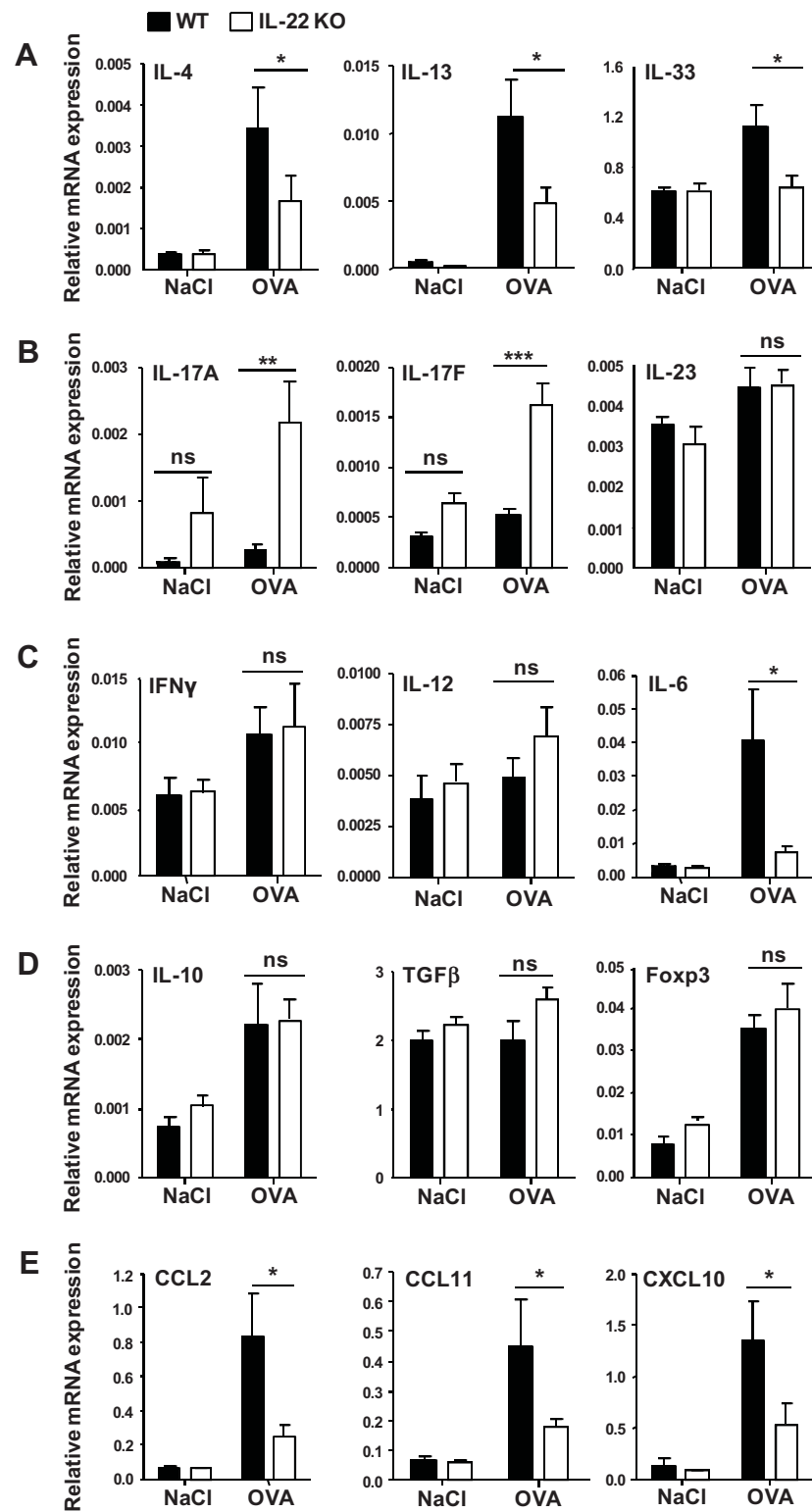


Figure 4

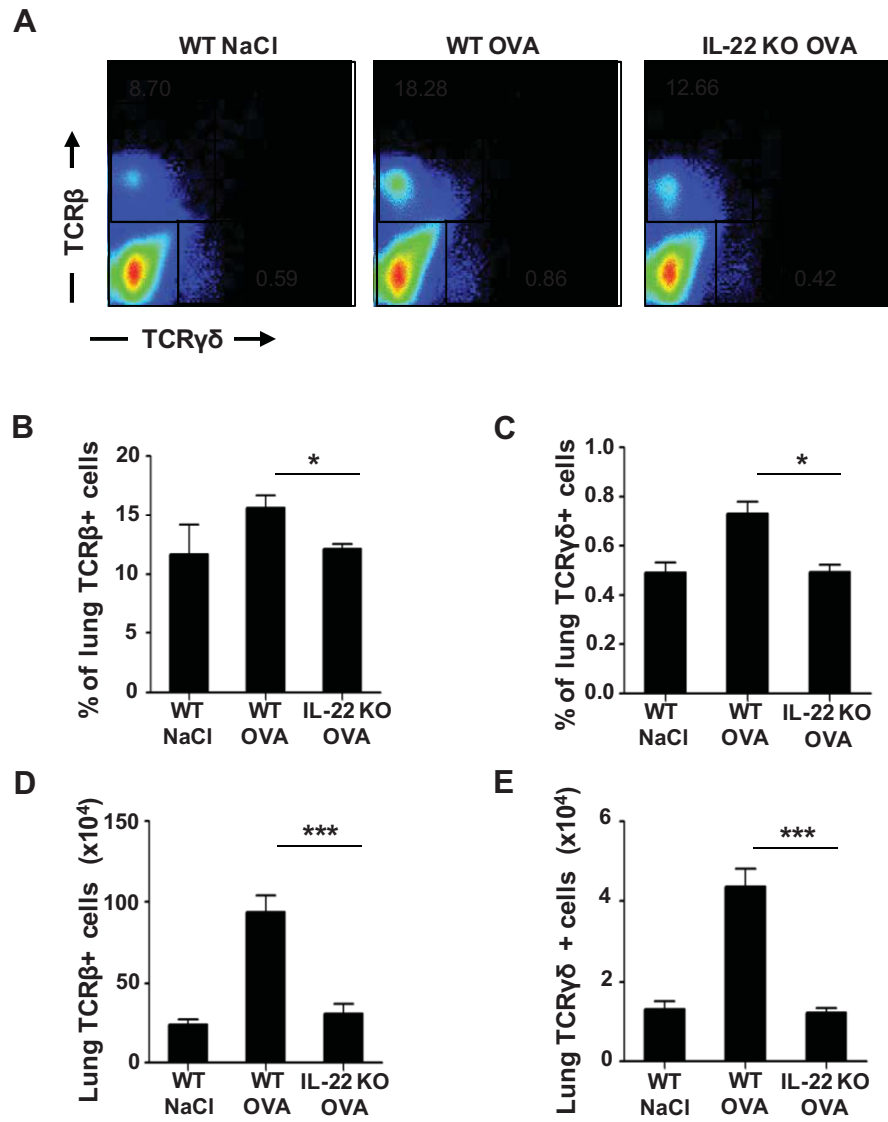


Figure 5

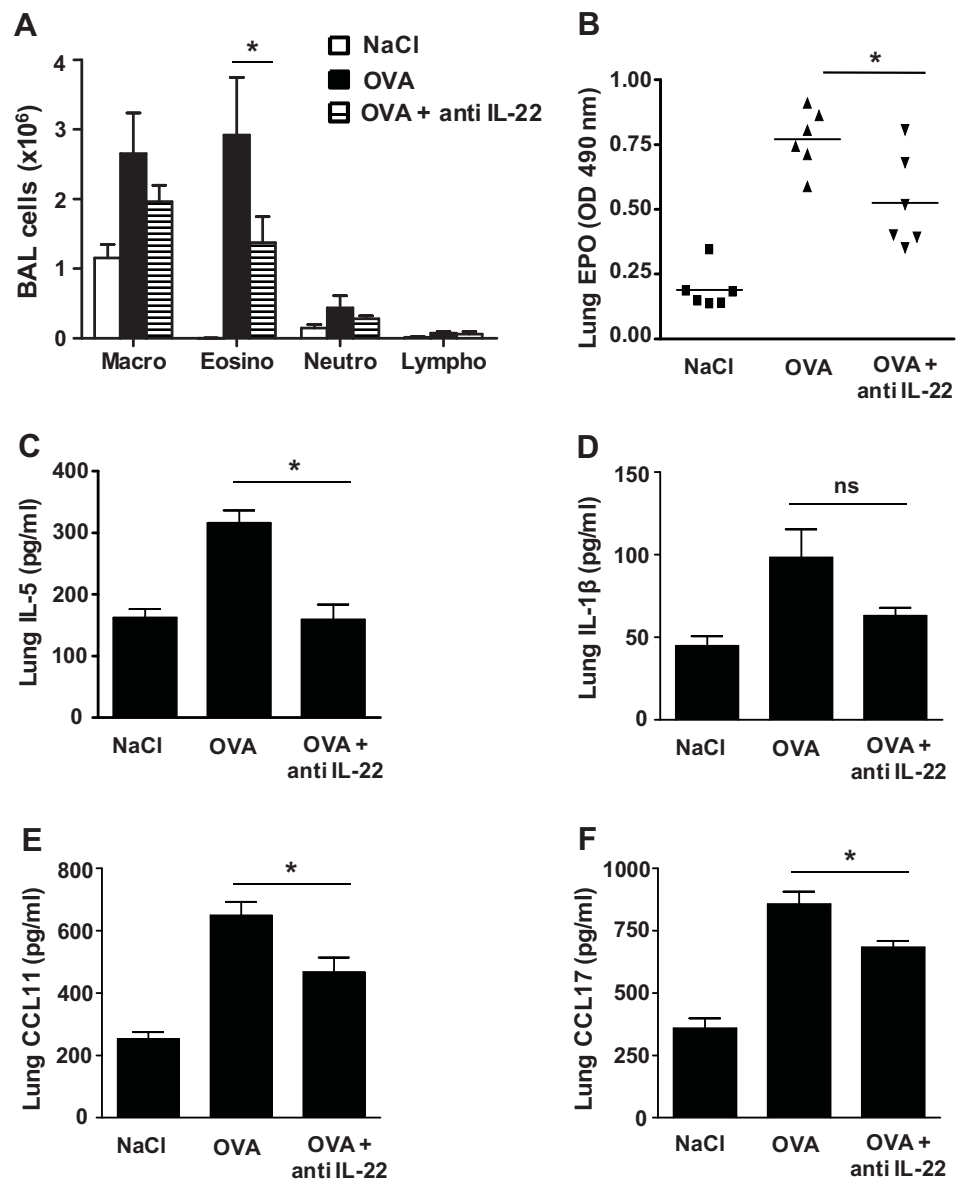


Figure 6

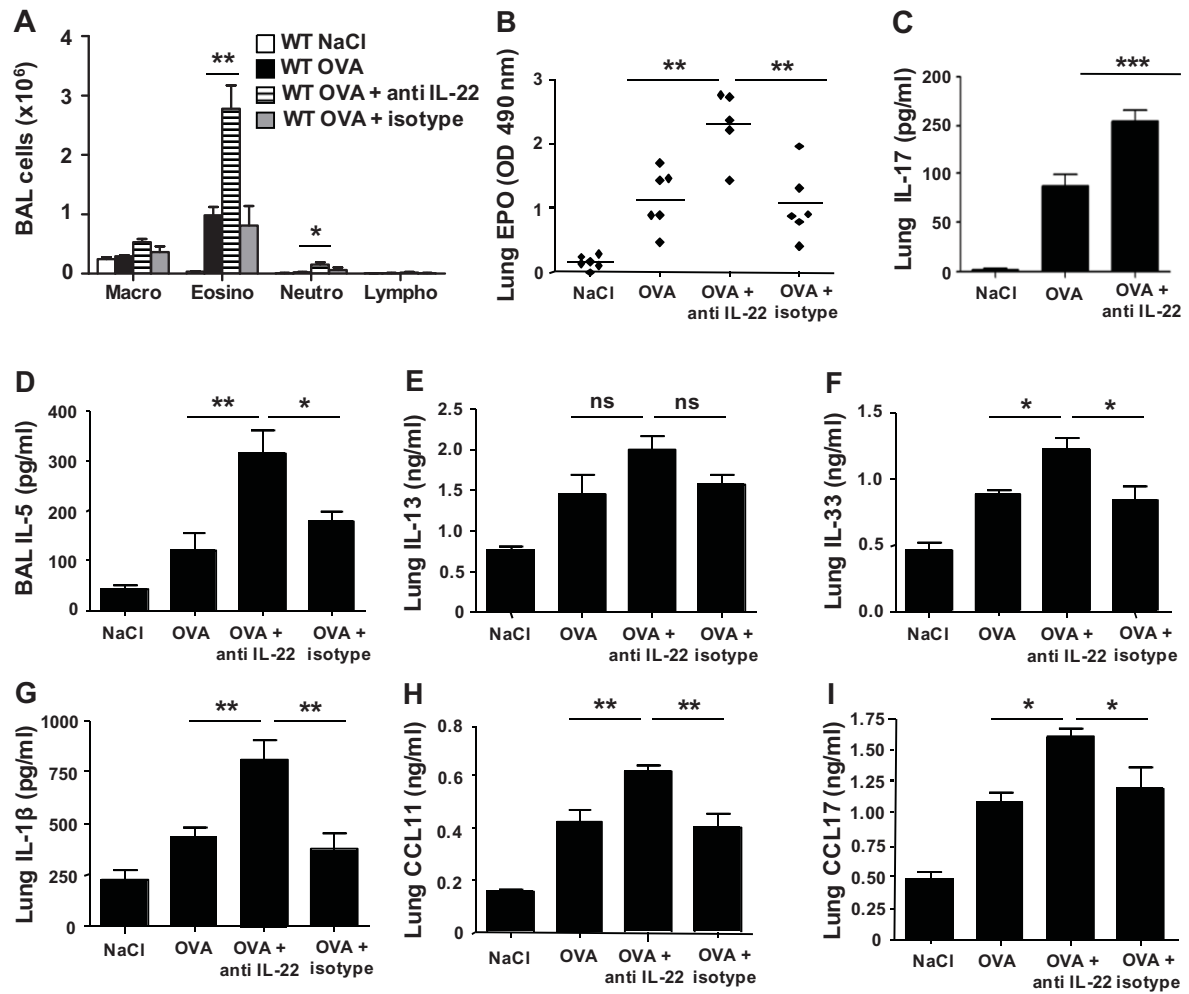


Figure 7

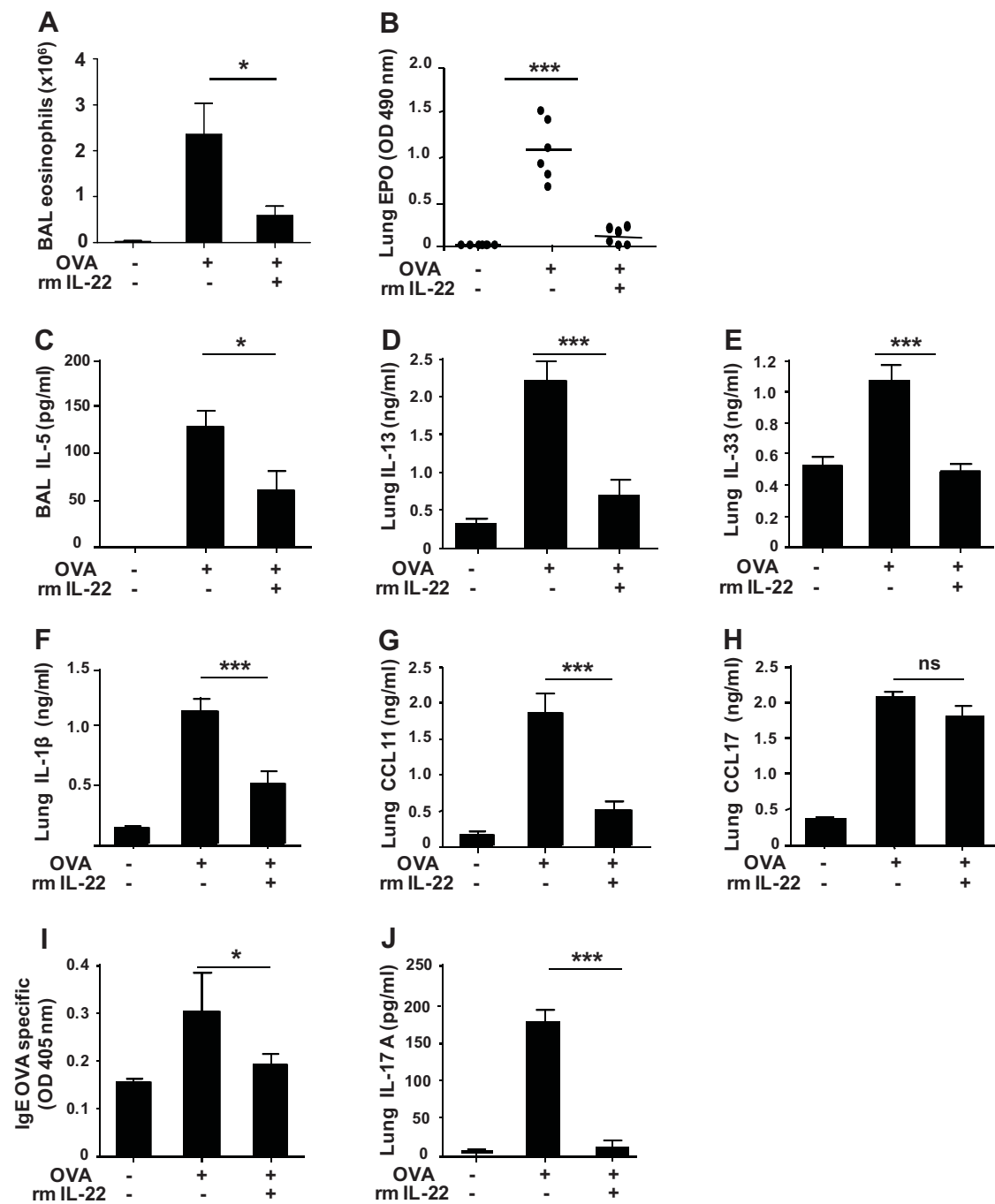


Figure 8

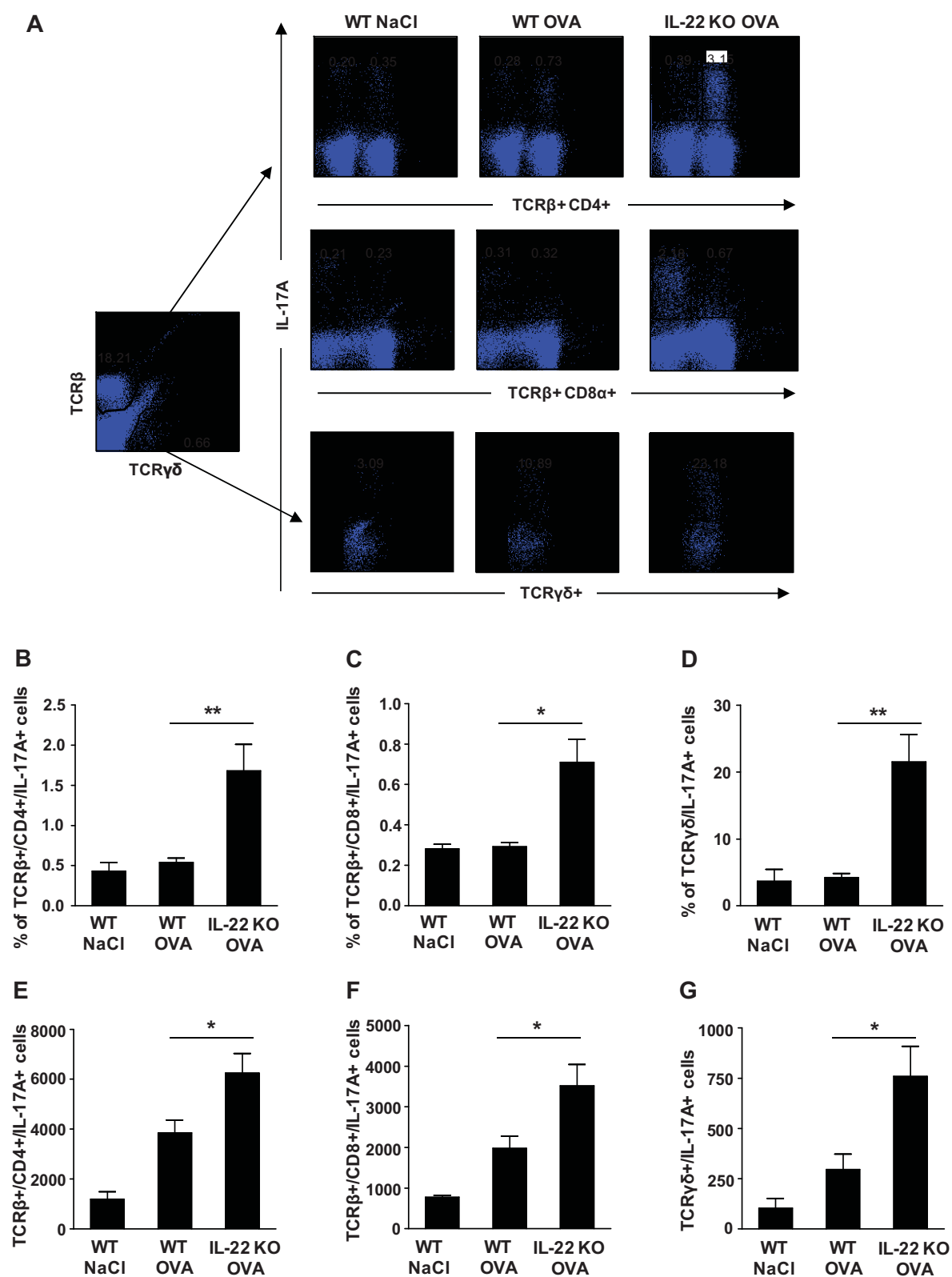
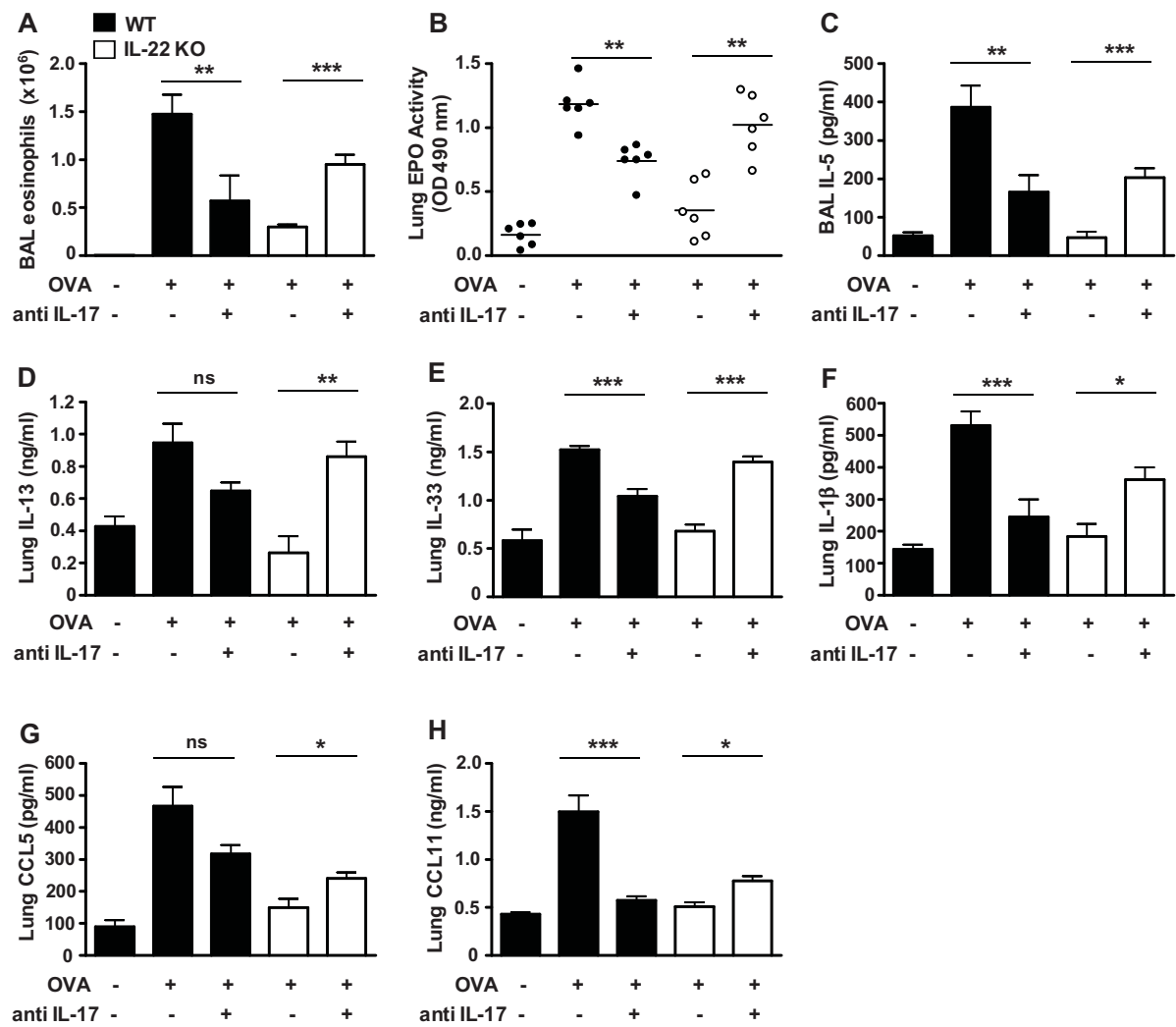
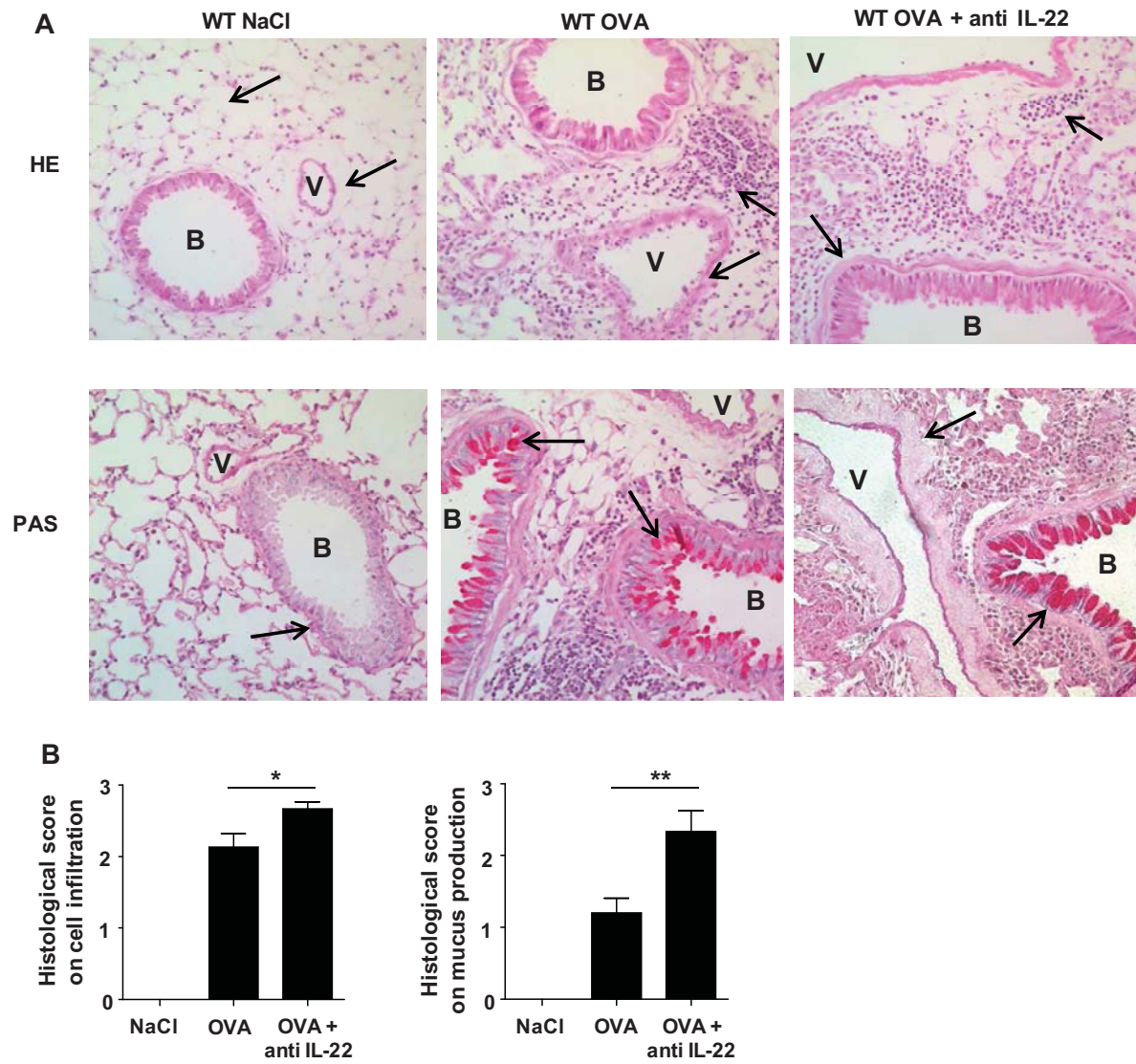


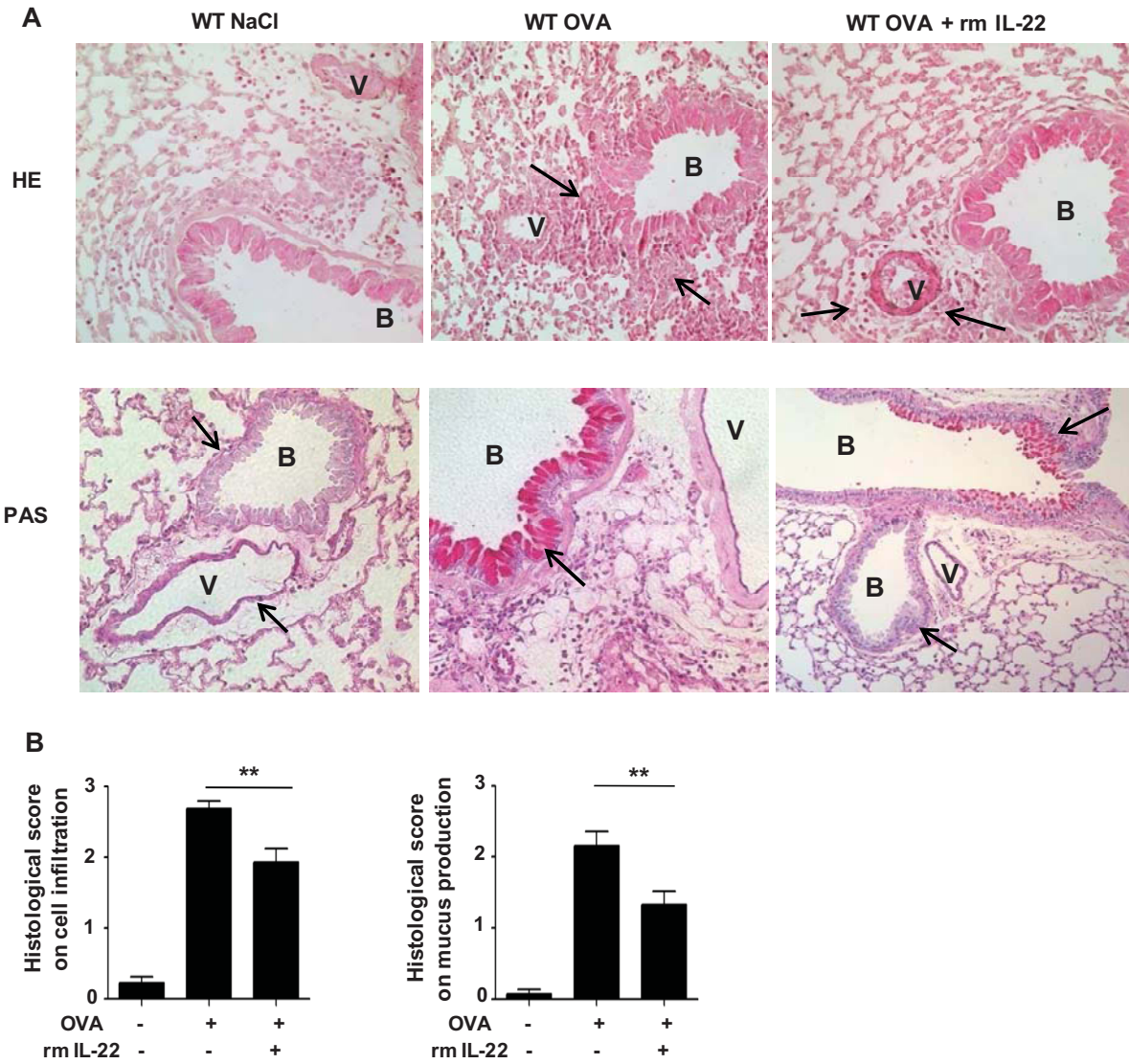
Figure 9



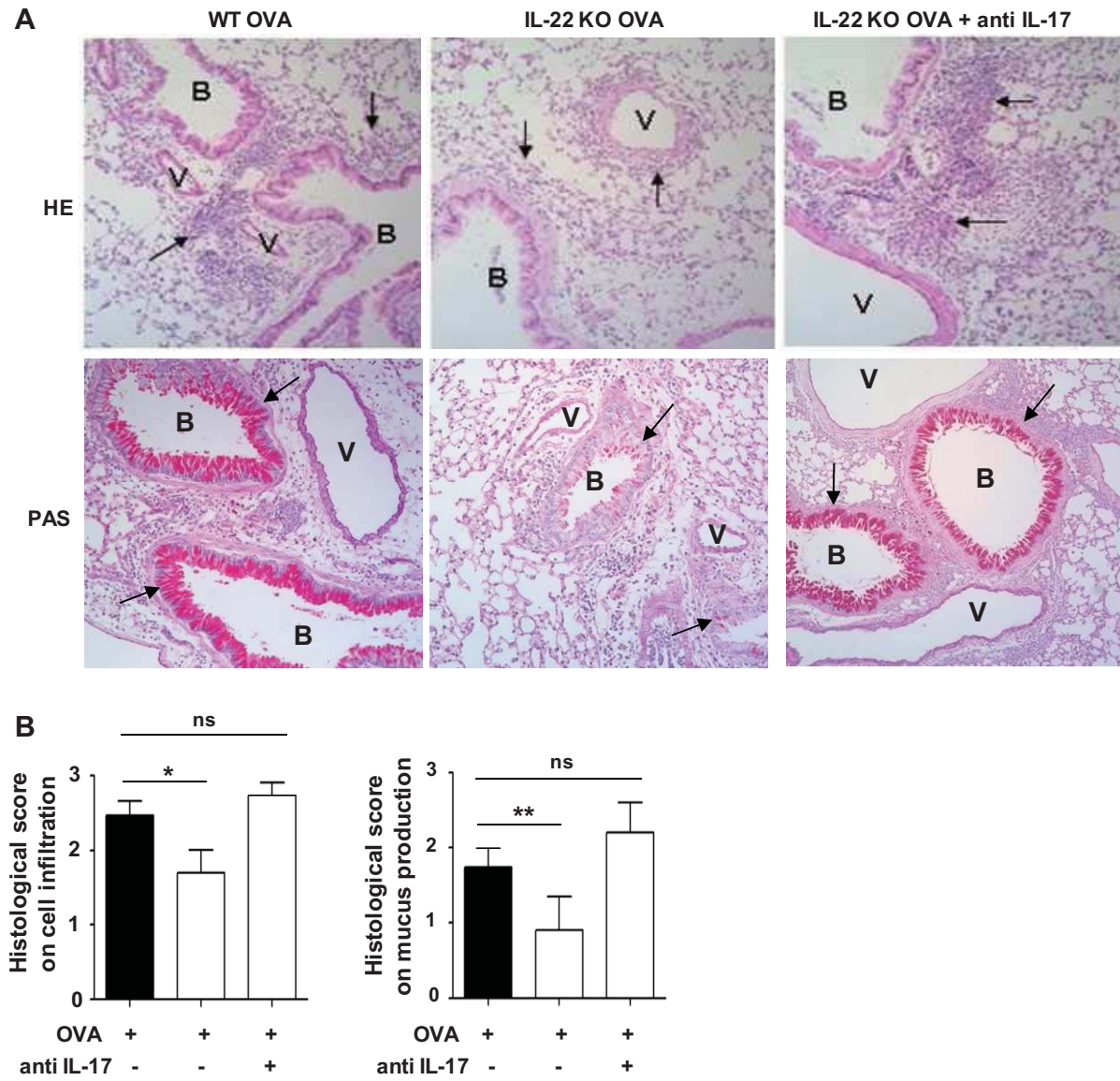
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Discussion article 1

L'étude du rôle de l'IL-22 réalisée au cours de ma thèse a permis d'apporter de nouveaux éléments d'explication sur le rôle des cytokines Th17 au cours de l'inflammation pulmonaire allergique induite par l'ovalbumine.

La présente étude met en lumière deux rôles distincts de cette cytokine dans cette pathologie. D'un côté, nous avons montré que l'IL-22 était nécessaire à l'établissement de la réponse Th2 puisque des souris déficientes en IL-22 ou bien des souris traitées par un anticorps neutralisant de l'IL-22 développent moins d'inflammation pulmonaire que des souris sauvages ou non traitées. De l'autre côté, nous avons démontré, grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants pour l'IL-22 ou d'IL-22 recombinante, un rôle régulateur de l'IL-22 au cours de l'asthme établi. Ce double rôle était déjà connu dans d'autres modèles d'inflammations, mais nous montrons ici pour la première fois que l'IL-22 peut exercer deux fonctions distinctes dans la même pathologie, en fonction de la phase étudiée.

1. Rôle pro-inflammatoire de l'IL-22

Au moment de l'immunisation avec l'allergène, l'IL-22 apparaît essentielle au bon développement de la réponse Th2, puisque des souris déficientes en IL-22 présentent une infiltration de granulocytes éosinophiles réduite dans les poumons après immunisation et provocation avec l'allergène. Cette réduction de l'infiltration cellulaire s'accompagne d'une diminution des cytokines Th2 au niveau pulmonaire et dans le surnageant de ganglions lymphatiques drainants restimulés avec l'ovalbumine. De plus, on observe une réduction des résistances pulmonaires en réponse à la métacholine ainsi qu'une baisse des IgE spécifiques de l'allergène chez les souris déficientes en IL-22 comparativement aux souris sauvages. Ces résultats illustrent clairement l'importance de l'IL-22 dans la mise en place de la réponse Th2 et dans l'activation des différents effecteurs cellulaires participant à la réponse asthmatique. Cependant, la source cellulaire d'IL-22 et les mécanismes par lesquels l'IL-22 active la réponse allergique ne sont à ce jour pas définis.

Une précédente étude montrait qu'une immunisation par voie épicutanée induirait une réponse Th17 locale et systémique supérieure à une immunisation par voie intrapéritonéale (He et al., 2007). Cet effet est largement réduit chez des souris déficientes pour la protéine adaptatrice MyD88, ce qui suggère l'implication des voies TLR. En effet, l'immunisation par de l'ovalbumine impure (contenant des traces de LPS) entrainerait l'activation de la voie TLR4 et une production d'IL-1 β et d'IL-23 favorisant ainsi le développement des Th17.

Dans notre modèle, les animaux sont immunisés par voie sous-cutanée avec de l'ovalbumine impure (Sigma, grade V). Or, cette voie favorise l'activation des cellules de Langherans et des cellules

dendritiques présentes en grand nombre sous la peau. On peut donc imaginer que ce type d'immunisation contribue au développement des Th17 qui produiraient alors l'IL-17 et l'IL-22.

Le récepteur de l'IL-22 n'étant présent que sur les cellules non immunes, la modulation de la réponse allergique par l'IL-22 passe forcément par les cellules stromales. Dans un modèle murin de psoriasis induit par l'IL-23, l'IL-22 sécrétée par les Th17 exerce son effet sur les kératinocytes qui produisent alors des molécules inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β et TNF) suite à l'activation de la voie STAT3 (Ma et al., 2008). Ces cytokines recrutent ensuite d'autres cellules immunitaires telles les lymphocytes, les neutrophiles, les macrophages ou les cellules dendritiques.

Un rôle pro-inflammatoire de l'IL-22 a également été décrit dans des modèles d'arthrite rhumatoïde (Ikeuchi et al., 2005) et de sclérose en plaque (Kreymborg et al., 2007). En plus de ses fonctions délétères dans la mise en place des maladies auto-immunes, nos travaux suggèrent que l'IL-22 serait aussi impliquée dans l'induction des réponses allergiques.

2. Rôle régulateur de l'IL-22

Au cours de notre étude, c'est avec étonnement que nous avons constaté que la neutralisation de l'IL-22 par des anticorps au moment des provocations allergéniques, exacerbait de façon significative l'inflammation pulmonaire allergique. De plus, l'administration d'IL-22 exogène au moment des challenges à l'ovalbumine a confirmé le rôle protecteur de l'IL-22 au cours de la phase effectrice.

De façon surprenante, malgré une surproduction d'IL-17 (pro-inflammatoire) chez les souris déficientes en IL-22, ces dernières développent une forme atténuée de la maladie. Nous nous sommes alors demandé quels seraient les effets de l'inhibition de l'IL-17 chez des souris sauvages ou déficientes en IL-22 au cours de la phase effectrice. L'inhibition de l'IL-17 chez des souris sauvages entraîne une diminution significative de l'inflammation pulmonaire allergique par rapport à des souris sauvages non traitées, confirmant ainsi les effets pro-inflammatoires de l'IL-17 au cours de la phase effectrice. En revanche, l'inhibition de l'IL-17 chez des souris déficientes en IL-22 entraîne une aggravation de la pathologie par rapport aux souris déficientes en IL-22 non traitées. Ceci indique que l'effet pro-inflammatoire de l'IL-17 serait dépendant de la disponibilité en IL-22.

Ces résultats sont à mettre en relation avec ceux obtenus dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par l'instillation de bléomycine. Dans cette étude, l'IL-17 et l'IL-22 sont co-exprimés par les Th17 et la neutralisation de l'une ou l'autre de ces cytokines par des anticorps neutralisants protège partiellement les souris de l'inflammation induite par la bléomycine (Sonnenberg et al., 2010). Dans ce même article, les auteurs décrivent une surexpression de l'IL-22 chez les souris déficientes en IL-17 après traitement par la bléomycine. Puisque l'IL-22 semblait pro-inflammatoire dans leur modèle, les mêmes auteurs se sont demandés pourquoi les souris

déficientes en IL-17, qui expriment pourtant de grandes quantités d'IL-22, étaient protégées de l'inflammation pulmonaire. C'est pourquoi ils ont tenté de neutraliser l'IL-22 chez ces souris. Avec surprise, ils observèrent une exacerbation de la pathologie en absence d'IL-17 et d'IL-22. De plus, l'administration d'IL-22 exogène à des souris déficientes en IL-17 réduit l'inflammation, alors que la co-administration d'IL-17 et d'IL-22 exacerbe la maladie. Ceci prouve donc que l'IL-22 est protectrice seulement en absence d'IL-17. Les conclusions de cet intéressant travail sont que l'IL-17 et l'IL-22 ensemble jouent un rôle pro-inflammatoire dans ce modèle d'inflammation pulmonaire induite par la bléomycine. En revanche, en absence d'IL-17, l'IL-22 exerce alors un rôle protecteur. Ces résultats témoignent de la complexité de la régulation de l'inflammation et nous fournit quelques éléments de réponses quant aux rôles divergents de l'IL-22 en fonctions des modèles expérimentaux étudiés.

Il est important de noter que ce modèle d'inflammation pulmonaire induit par la bléomycine met en jeu des mécanismes et des réponses immunitaires très différents de ceux observés dans l'asthme allergique. La bléomycine induit une réponse neutrophilique à forte composante Th17 due à l'expression importante d'IL-6, d'IL-12/23p40 et de TGF β (Huaux et al., 2003; Wilson et al.). Au contraire, dans notre modèle d'inflammation pulmonaire allergique induite par l'ovalbumine, la réponse est majoritairement Th2 et met en jeu les éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes. La composante Th17, bien qu'indispensable à l'induction de l'asthme, semble avoir un rôle inhibiteur au cours de la phase effectrice.

Par ailleurs, notre étude a permis de révéler des fonctions différentes de l'IL-17 en fonction de la disponibilité de l'IL-22. En présence d'IL-22, l'IL-17 est proinflammatoire dans l'asthme établi. Au contraire, en absence d'IL-22, l'IL-17 semble perdre partiellement ses propriétés proinflammatoires. Ceci indique que ces deux cytokines pourraient agir en synergie pour réguler l'inflammation allergique. Cependant, une étude plus approfondie permettra de mieux comprendre les rôles respectifs de ces deux cytokines au cours de l'inflammation.

Par ailleurs, notre étude a également montré une "balance" dans la production pulmonaire d'IL-17 et d'IL-22. L'existence de processus de compensation entre ces deux cytokines reste à confirmer.

Dans un autre modèle de fibrose pulmonaire, induite par administration répétée de *Bacillus subtilis*, Simonian et collègues montrent que la production d'IL-22 par les lymphocytes $\gamma\delta$ a un effet protecteur (Simonian, JEM 2010). Dans cette étude, les auteurs ont identifié les lymphocytes $\gamma\delta$ comme étant la principale source d'IL-22. La neutralisation de l'IL-22 entraîne une accélération du dépôt de collagène dans les poumons. Auparavant, les auteurs avaient montré que l'IL-17, produite par les cellules Th17 et les cellules $\gamma\delta$, jouait un rôle bénéfique dans ce modèle en favorisant l'élimination de la bactérie. Ainsi, dans ce modèle, l'IL-22 et l'IL-17 agiraient en collaboration pour réduire l'inflammation pulmonaire, éliminer le pathogène et réduire la fibrose pulmonaire associée.

En conclusion de ces trois études, il semble que les fonctions de l'IL-22 et de l'IL-17 soient liées. L'expression différentielle de ces deux cytokines dans les différents modèles d'infections ou d'inflammations publiés jusqu'à ce jour pourrait expliquer les fonctions pro-inflammatoires ou protectrices de l'IL-22. Notre étude montre la subtilité du système cytokinique, puisqu'une même cytokine peut exercer des fonctions opposées en fonction du micro-environnement inflammatoire. Les mécanismes par lesquels une même molécule, signalant par le même récepteur, peut activer des réponses différentes, restent à élucider.

3. Le lien avec le récepteur AhR (Aryl hydrocarbon Receptor)

L'incidence des maladies auto-immunes et des maladies allergiques est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Les molécules chimiques présentes dans notre environnement moderne pourraient dans bien des cas en être la cause.

Les composés aromatiques polycycliques, obtenus par combustion de matériaux organiques (fumées de cigarette, de feux de cheminées ou de gaz d'échappement), et les composés chimiques de faibles poids moléculaires retrouvés dans la nourriture, les cosmétiques ou les polluants de l'environnement peuvent influencer la physiologie cellulaire et le système immunitaire.

Le facteur de transcription AhR est un récepteur cytosolique pouvant être activé par une multitude de ligands synthétiques d'origine exogène (appelés xénobiotiques) ou de ligands d'origine endogène. Parmi les ligands endogènes, on retrouve notamment certains métabolites du tryptophane (FICZ), la bilirubine et la lipoxin A4. La liaison de ces ligands avec le récepteur AhR induit son changement de conformation, suivi de sa translocation vers le noyau où il interagit avec les régions DRE ou XRE (Dioxin ou Xenobiotic response element) pour activer la transcription de gènes cibles.

Les souris déficientes pour le récepteur AhR présentent entre autres une espérance de vie réduite, des problèmes de fécondité, une insuffisance hépatique et des inflammations cutanées spontanées. Ce qui démontre l'implication de ce récepteur dans de nombreuses fonctions physiologiques (Matsumura et al., 2009).

Le récepteur AhR est exprimé dans de nombreux types cellulaires y compris les cellules immunes telles les cellules dendritiques, les cellules de Langherans, les lymphocytes Th17 et Treg, mais pas par les Th1 ou Th2.

L'équipe de Veldhoen en Belgique a étudié spécifiquement le rôle de ce récepteur dans la différenciation Th17, puis dans un modèle de maladie auto-immune chez la souris (Veldhoen et al., 2008a). *In vitro*, l'activation de AhR par un agoniste (FICZ) amplifie la polarisation Th17 et augmente l'expression de l'IL-17, de l'IL-17F et de l'IL-22. Chez les Th17, l'activation du récepteur AhR semble

indispensable à la production d'IL-22, puisque les Th17 issus de souris déficientes en AhR n'en produisent pas.

Dans un modèle expérimental murin d'encephalomyélite auto-immune (EAE) dans lequel les Th17 sont importants, l'administration d'agonistes AhR entraîne une augmentation et une accélération de l'apparition de la maladie et une augmentation des signes cliniques (Veldhoen et al., 2008a). Ces résultats montrent pour la première fois *in vivo* que le traitement par des agonistes AhR pouvait exacerber une pathologie auto-immune en stimulant les Th17, suggérant une potentielle participation des polluants de l'environnement.

Nous avons montré que l'IL-17 et l'IL-22 étaient impliqués dans l'induction de la réponse allergique chez la souris. On peut donc imaginer une relation entre la recrudescence de l'asthme dans les pays industrialisés et la multiplication des composés chimiques néfastes dans notre environnement.

En 2005, une équipe japonaise avait montré chez la souris dans un modèle d'allergie induit par administration répétée d'extrait d'ascaris par voie intrapéritonéale, que l'activation par un agoniste synthétique du récepteur AhR favorisait une réponse de type 1 au dépend de la réponse Th2, avec pour conséquence une réduction de la production des IgE et de l'infiltration éosinophilique sur le site d'inflammation (Negishi et al., 2005). Dans ce modèle, l'activation de la voie AhR supprime l'expression du facteur de transcription GATA3 et réduit la réponse allergénique. Au vu des connaissances actuelles, ces résultats apparaissent étranges puisque les cellules T naïves, Th1 ou Th2 n'expriment pas le récepteur AhR. On peut cependant envisager que la modulation de la réponse intervient indirectement par un effet sur les cellules structurales ou sur les cellules dendritiques.

Cette étude suggère que la voie de signalisation AhR pourrait contrôler les réponses immunitaires et fait de ce récepteur une cible potentielle pour de nouveaux traitements des allergies.

ARTICLE 2 : ETUDE DU ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3 ET DE LA VOIE DE SIGNALISATION IL-1/IL-1R1 DANS UN MODELE EXPERIMENTAL D'ASTHME ALLERGIQUE SANS ADJUVANT

Classiquement, les modèles expérimentaux d'asthme allergique chez la souris consistent en une ou plusieurs immunisations avec un allergène, le plus souvent par voie intra-péritonéale, suivie de provocations répétées au niveau des voies aériennes permettant l'induction d'une réponse inflammatoire similaire à celle observée chez l'humain. La plupart du temps, l'immunisation avec l'allergène est faite en présence d'un adjuvant, l'hydroxyde d'aluminium, afin d'augmenter l'immunogénicité de l'antigène et de favoriser une réponse Th2 (Kool et al., 2008b).

Plusieurs cytokines de la famille de l'IL-1, telles l'IL-1 β , l'IL-1 α , l'IL-18 ou l'IL-33, sont impliquées dans la réponse inflammatoire induite par administrations répétées d'un même allergène. L'IL-1 α et l'IL-1 β exercent leurs effets biologiques après liaison au récepteur IL-1R1 qui recrute alors la protéine accessoire IL-1RAcP. Ceci active une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation des facteurs de transcription NF κ B et AP-1 (Sims et al., 1994).

Bien que l'IL-1 α et β possèdent des propriétés biologiques semblables, ces deux cytokines diffèrent au niveau de leur localisation cellulaire, de leur niveau d'expression et de leur type de sécrétion.

L'IL-1 β est majoritairement produite par les macrophages et les monocytes activés alors que l'IL-1 α est exprimée constitutivement par un large panel de cellules, y compris les cellules structurales. De plus, la pro-IL-1 α possède un domaine de localisation nucléaire qui lui confère une activité de facteur de transcription pouvant influencer l'expression de certains gènes ou bien la survie cellulaire (Sims and Smith, 2010).

Peu d'études se sont intéressées au rôle de la voie IL-1 dans l'asthme allergique. Une première étude avait montré en 2003 que des souris déficientes pour le récepteur IL-1R1 développaient moins d'inflammation pulmonaire allergique que des souris sauvages après immunisation et provocation avec de faibles doses d'antigène. En revanche, dans un modèle d'asthme induit par de fortes doses d'antigène en présence d'adjuvant, les souris déficientes en IL-1R1 et les souris sauvages répondent de façon identique (Schmitz et al., 2003).

Une seconde étude avait révélée une réduction de l'HRB, de la prolifération des cellules Th2, ainsi que des IgE spécifiques de l'allergène dans le sérum chez les souris déficientes pour l'IL-1 α , l'IL-1 β ou les souris double déficientes (Nakae et al., 2003a).

Différents groupes ont montré que l'hydroxyde d'aluminium activait la caspase-1 et la production d'IL-1 β via l'inflammasome (Kool et al., 2008b; Lindblad, 2004). Il s'agit d'un complexe multiprotéique

activé par des molécules comme l'ATP, le contact d'allergènes, ou des produits libérés par les cellules mortes comme l'acide urique (Martinon and Tschopp, 2007), et dont l'activation aboutit à l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 matures. Il existe différents types d'inflammasomes qui se distinguent par leur récepteur NLR et leur assemblage. Le mieux décrit est l'inflammasome NLRP3.

Des souris déficientes en NLRP3 ou en caspase-1 développent une inflammation pulmonaire atténuée comparativement aux souris sauvages après immunisation et provocation à l'ovalbumine (Eisenbarth et al., 2008). Néanmoins, dans ce modèle, les auteurs ont immunisé les souris en présence d'hydroxyde d'aluminium. Or, on sait que cet adjuvant active l'inflammasome via la libération d'acide urique (Kool et al., 2008a; Kool et al., 2008b). On peut alors s'interroger sur le rôle de l'inflammasome dans la mise en place de l'inflammation pulmonaire allergique dans un modèle plus proche de la pathophysiologie humaine, n'utilisant pas d'adjuvant.

C'est pourquoi, au cours de notre étude, nous nous sommes appliqués à caractériser la réponse pulmonaire allergique chez des souris déficientes pour l'inflammasome NLRP3, ou le récepteur IL-1R1 ou les cytokines IL-1 α ou β dans un modèle expérimental d'asthme allergique dépourvu d'adjuvant, afin de savoir si l'inflammasome ou la voie de l'IL-1 participent à l'inflammation allergique pulmonaire en absence des signaux de dangers induit par l'administration d'adjuvant.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'inflammasome NLRP3 est impliqué dans la réponse inflammatoire allergique, y compris en absence d'adjuvant. De plus, nous confirmons que la voie de signalisation de l'IL-1 est primordiale pour l'induction de cette réponse. L'utilisation d'animaux spécifiquement déficients pour la forme α ou β de l'IL-1 a permis de montrer clairement l'importance de ces deux cytokines, puisque l'absence de l'une ou l'autre de ces cytokines suffit à inhiber l'inflammation pulmonaire allergique.

Critical role of NLRP3 inflammasome in allergic lung inflammation in absence of aluminium adjuvant

Article soumis au journal “Allergy” le 29 septembre 2010

Anne-Gaëlle Besnard¹, Noëlline Guillou¹, Jurg Tschopp², François Erard¹, Isabelle Couillin¹, Yoichiro Iwakura³, Valerie Quesniaux¹, Bernhard Ryffel¹ and Dieudonnée Togbe^{1,4}

¹Université d'Orléans and CNRS, Molecular Immunology and Embryology (IEM), 45071 Orléans, France

²University of Lausanne, department of biochemistry, chemin des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges, Switzerland

³Center for Experimental medicine, Institute of Medical Science, university of Tokyo, 4-6-1 Shirokanedai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan

⁴Artimmune SAS Centre d'Innovation, 16 rue Léonard de Vinci, 45100 Orléans, France

Corresponding author :

Bernhard Ryffel, MD.UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, 3B rue de la Férollerie, 45071 Orléans Cedex 2, France, Phone: + 33 238 25 5439, e-mail: bryffel@cnrs-orleans.fr

ABSTRACT

Background: Inflammasome activation with the production of IL-1 β received substantial attention recently in inflammatory disease. However the role of inflammasome in the pathogenesis of asthma is not clear. Using an adjuvant-free model of allergic lung inflammation induced by ovalbumin, we investigated the role of NLRP3 inflammasome and related it to IL-1R1 signalling pathway.

Methods: Allergic lung inflammation induced by ovalbumin was evaluated in vivo using NLRP3 inflammasome, IL-1R1, IL-1 β and IL-1 α deficient mice. Eosinophil recruitment, Th2 cytokine and chemokine levels were determined in bronchoalveolar lavage fluid, lung homogenates and cell culture supernatants from mediastinal lymph nodes.

Results: Allergic airway inflammation depends on NLRP3 inflammasome activation. Dendritic cell recruitment into lymph nodes, activation of Th2 lymphocytes in the lung and secretion of Th2 cytokines and chemokines including IL-33 and TSLP are reduced in the absence of NLRP3 and contribute to a dramatic reduction of allergic inflammation. Absence of NLRP3 and IL-1 β is associated with reduced expression of other proinflammatory cytokines such as IL-13, IL-33, TSLP and IL-6. Furthermore, the critical role of IL-1R1 signaling in allergic inflammation is confirmed in IL-1R1, IL-1 β and IL-1 α deficient mice.

Conclusion: NLRP3 inflammasome activation leading to IL-1 production is critical for the induction of a Th2 inflammatory allergic response.

Keywords: Asthma, NLRP3 inflammasome, allergic inflammation, IL-1R1

Abbreviations used: BAL: bronchoalveolar lavage; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; DC: dendritic cell; EPO: eosinophil peroxidase; OVA: ovalbumin; mLN: mediastinal lymph nodes; TSLP: thymic stromal lymphopoietin

INTRODUCTION

Allergic inflammatory response is characterized by activation of Th2 pathway, which is initiated by the uptake and processing of allergens by professional antigen presenting cells (APCs). APCs present selected peptides on MHC class II molecules to naive T cells, followed by B cells activation to generate IgE antibodies specific for common environmental allergens. Cytokines attributed to a Th2 immune response are IL-4, IL-5 and IL-13 (1, 2).

The inflammasome is a protein complex which plays key role in innate immunity by participating in the production of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 (3). NLRP3 is activated by endogenous danger signals such as adenosine triphosphate (ATP), and uric acid crystals which are released from dying cells or by hypotonic stress (3-7). Recent evidence on NLRP3 inflammasome highlighted its crucial role in experimental allergic asthma induced in presence of aluminum hydroxide (alum) adjuvant (8). Likewise, NLRP3 inflammasome activation by alum was shown to be responsible of the adjuvant effect of alum leading to IL-1 β maturation and humoral adaptive immune response (8, 9). Mice deficient for NLRP3, ASC and caspase-1 failed to mount a significant antibody response to antigen administration with alum adjuvant (8). Extracellular ATP is an important mediator in the pathogenesis of allergic asthma. Elevated ATP levels are found in the airways of patients with asthma and COPD and in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from ovalbumin (OVA)-sensitized and challenged mice (10, 11). In addition, neutralizing extracellular ATP or blocking airway P2 receptors inhibited allergic lung inflammation in mice (10).

IL-1 is a pro-inflammatory cytokine that regulates multiple aspects of immune and inflammatory responses (12). It is known that IL-1 can promote mast cell activation and production of Th2 cytokines, suggesting a function of IL-1 in the development of allergic diseases (13-15). IL-1R1 plays a critical role for the development of Th2 allergic lung inflammation induced with low doses of ovalbumin in absence of alum adjuvant (16). IL-1 α and IL-1 β , both bind to IL-1R composed of two chains, IL-1R1 and IL-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) (17). The primary sources of IL-1 β are the blood monocytes, tissue macrophages, and dendritic cells (DCs), while fibroblasts and epithelial cells generally do not produce IL-1 β . The IL-1 α precursor is expressed constitutively in epithelial cells where large amounts of the intracellular form of the IL-1R antagonist (icIL-1Ra) are also present (18). Importantly, elevated concentrations of IL-1 β have been found in the BALF from asthmatic patients (19).

However the role of NLRP3 inflammasome in allergic asthma in absence of aluminium adjuvant which correspond to the natural occurring disease remains unclear. In this study, we demonstrate that NLRP3 inflammasome is required for allergen-specific Th2 cell activation in absence of alum adjuvant

and confirm that IL-1R1 signalling is critical for the development of mouse model of allergic airway inflammation.

RESULTS

NLRP3 inflammasome drives allergic airway inflammation

The role of NLRP3 inflammasome in the development of allergic lung inflammation was studied using NLRP3 gene deficient (NLRP3^{-/-}) and wild type (WT) mice. While WT mice which were sensitized and challenged with ovalbumin (OVA) develop a robust inflammatory response in the lung, airway inflammation is dramatically reduced in NLRP3^{-/-} mice. In those mice, eosinophil recruitment into the BAL and the lung is strongly reduced (**Fig. 1A, B**) and IL-1 β in the lung is abrogated (**Fig. 1E**). Diminished cellular inflammation and IL-1 β levels are associated with reduced production of IL-5 and TGF α in the BALF (**Fig. 1C, D**), TSLP, IL-33 and IL-6 in the lung (**Fig. 1F-H**), OVA-specific serum IgE levels (**Fig. 1I**) and the typical Th2 cytokines IL-13 and IL-5 production upon antigen restimulation in lymph nodes (**Fig. 1J, K**) and diminished chemokines CCL17 (TARC), CCL11 (eotaxin) and CCL5 (Rantes) (**Fig. 1L-N**) in the lung. Therefore, the NLRP3 inflammasome is required for the development of Th2 type lung inflammation and antigen specific immune response.

Disruption of NLRP3 diminishes lung inflammation and mucus hypersecretion

Microscopically, the lung tissue of OVA immunized and challenged WT mice showed peribronchial eosinophil and lymphocyte recruitment together with mucus hypersecretion and thickening of the epithelium with hyperplasia of smooth muscle and goblet cells. Consistent with the reduction of lung inflammation, cell recruitment and mucus overproduction are dramatically reduced in the absence of NLRP3 (**Fig. 2A, B**).

Reduced pulmonary CD4⁺ IL-13⁺ producing cells in NLRP3 deficient mice.

IL-13 is produced by activated CD4⁺ T cells and is critical for the promotion of allergic inflammatory responses by mediating airway hyperresponsiveness (AHR) and mucus hypersecretion (20, 21). To decipher the importance of NLRP3 inflammasome in IL-13 producing cells in allergic lung inflammation, we isolated and restimulated lung mononuclear cells from OVA treated WT and NLRP3^{-/-} mice with PMA/ionomycin for 4 hours. Pulmonary CD4⁺IL-13⁺ producing cells were increased in OVA treated WT mice compared to saline controls (**Fig. 3A, C**). By contrast, CD4⁺IL-13⁺ cells were drastically reduced (percentage and absolute numbers) in NLRP3^{-/-} mice (**Fig. 3A, C**). The

majority of IL-13 producing cells are CD4⁺ cells but not CD8 α ⁺ cells as shown by the representative dot plot and the histograms (**Fig. 3B, D**).

Thus, these data suggest that absence of allergic lung inflammation in NLRP3^{-/-} mice is associated with a dramatic reduction of recruitment and activation of CD4⁺IL-13⁺ cells into the lung.

DCs migration into draining lymph nodes is reduced in absence of NLRP3

Airway DCs sample antigen in the lung and migrate to draining LNs to stimulate naive T cells (22, 23). To determine whether absence of NLRP3 could have an effect on DCs migration in vivo, OVA-FITC is administered intranasally to WT and NLRP3 deficient mice and the uptake and transport of OVA-FITC complex were analyzed in the draining mediastinal lymph nodes (mLN). Twenty four hours after OVA-FITC administration, enhanced mean intensity fluorescence (MFI) of OVA-FITC⁺ cells (**Fig. 4A**) and OVA-FITC⁺MHCII⁺ DCs (**Fig. 4B**) were detected in WT mice. Surprisingly, MFI and absolute numbers of OVA-FITC⁺ DCs are significantly reduced in the mLN of NLRP3 deficient mice (**Fig. 4A, B**). Moreover, DCs activation markers CD40 and CD80 were reduced in NLRP3^{-/-} mice compared to WT mice (**Fig. 4C, D**). Importantly, OVA uptake and processing were not affected in NLRP3 deficient bone marrow derived DCs (BMDC) *in vitro* (**Fig 4E**). Therefore, these data suggest that reduced DC recruitment and activation in NLRP3 deficient mice may be crucial for a defective Th2 cell response and allergic inflammation.

Both IL-1 α and IL-1 β are critical for the development of pulmonary Th2 response

Since the NLRP3 inflammasome is crucial for IL-1 β production, we investigated the role of IL-1R1 signaling. Furthermore, we explored the contribution of IL-1 α , which is NLRP3 independent in the development of allergic lung inflammation. Airway inflammation was significantly reduced in OVA-sensitized and challenged IL-1R1 deficient mice, but also in IL-1 α and IL-1 β deficient mice. Eosinophil recruitment in BAL (**Fig. 5A**) and lung (**Fig. 5B**) as well as IL-1 β , TSLP and IL-33 levels in the lung, and IL-5 production in the BALF were significantly diminished (**Fig. 5C-F**). IL-4, IL-5 and IL-13 production in mediastinal lymph nodes (mLN) cell culture supernatants were reduced in all gene deficient mice compared to control mice (**Fig. 5G-I**). Furthermore, the levels of the Th2 specific chemokines, CCL17, CCL11 and CCL5 in the lung (**Fig. 5J-L**) were also diminished.

Therefore, the findings obtained in IL-1R1 and IL-1 β deficient mice are consistent with a role of NLRP3 activation. The fact that absence of IL-1 α abrogates allergic inflammation may be related to the diminished IL-1 β level seen in IL-1 α ^{-/-} mice.

Disruption of IL-1R1 signalling diminishes lung inflammation and mucus hypersecretion

The lung tissue of OVA immunized and challenged WT mice showed peribronchial eosinophil and lymphocyte recruitment together with mucus hypersecretion. These parameters were dramatically reduced in the absence of IL-1R1, IL-1 α and IL-1 β (**Suppl. Fig. 1A, B**). Therefore, both IL-1 α and IL-1 β through IL-1R1 signalling are essential in allergic lung inflammation and mucus overproduction.

Disruption of IL-1R1 and IL-1 β genes reduced IL-13 producing cells and airway inflammation

To elucidate the importance of IL-13 producing cells in IL-1R1 signaling pathway in allergic asthma model, we isolated and stimulated lung mononuclear cells from OVA treated WT, IL-1R1^{-/-} and IL-1 β ^{-/-} mice with PMA/ionomycin for 4 hours followed by intracellular staining of IL-13. Reduced frequency and absolute number of CD4+IL-13+ cells were found in IL-1R1 and IL-1 β deficient mice (**Fig. 6A, B**). Therefore, IL-1R1 signaling is important for IL-13 expression by CD4+ T cells in the lung.

DISCUSSION

Here we investigated the role of NLRP3 inflammasome and IL-1R1 signalling in OVA induced allergic lung inflammation in the absence of alum adjuvant in order to avoid any confounding effect of this strong NLRP3 activator. We report that NLRP3 deficiency causes impaired Th2 response and allergic lung inflammation with lower eosinophil influx in the airways, and pulmonary Th2 cytokine and chemokine productions. These effects were accompanied by diminished migration of DCs and IL-13 producing CD4⁺ T cell recruitment in the lung of NLRP3 deficient mice. We observe similar impaired responses in IL-1 α , IL-1 β and IL-1R1 deficient mice.

The exact mechanism by which NLRP3 and IL-1 α/β signalling deficiencies reduces recruitment of inflammatory cell influx is not well documented. Here we demonstrate that expression of the chemoattractants of eosinophils (CCL11, CCL5) and Th2 lymphocytes (CCL17) were strongly reduced in NLRP3^{-/-}, IL-1 α ^{-/-}, IL-1 β ^{-/-} and IL-1R1^{-/-} mice, suggesting that NLRP3 and IL-1 α/β signalling pathways may participate to the control of chemokine gradients necessary for cell recruitment. Moreover, reduction of inflammation in NLRP3 deficient mice could be related to an alteration of DCs functions. DCs are known to be crucial for allergic lung inflammation because they recruit Th2 lymphocytes to the airways and trigger local Th2 lymphocytes effector cytokine production (23). While antigen uptake and activation of myeloid DCs was not affected *in vitro*, the migration and activation of antigen loaded DCs to mLN was strongly reduced in NLRP3 deficient mice. Therefore, lack of DCs affects Th2 cells accumulation, cytokine and chemokine productions in the lung of NLRP3 deficient mice. Moreover, TSLP level in the lung was reduced in NLRP3, IL-1 α , IL-1 β and IL-1R1 deficient mice. These data could be linked to the defective function of DCs because TSLP is known to induce up regulation of OX40L on DCs which in turn promoted Th2 cell differentiation (24). TSLP can also directly influence CD4⁺ T cells polarization, inducing Th2 cell differentiation and IL-4 synthesis (25, 26). With respect on the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation extracellular ATP has been shown to be increased in allergic asthma in mice and man and signalling through purinergic receptors has been shown to play crucial role in inflammasome activation and pathogenesis of allergic lung responses (10).

IL-33 belongs to IL-1 family cytokines and was known to promote Th2 responses and enhance allergic inflammation (27). IL-33 can be cleaved by caspase-1 after SER 111 residue to its biological active form (28) or after ASP 178 residue to an inactive form and by caspase-3 (29). However IL-33 cleavage was controversial, the exact link between NLRP3 inflammasome and IL-33 remains to be elucidated (28-30). We found here low levels of IL-33 in saline and OVA treated NLRP3 deficient mice compared to saline and OVA treated WT mice suggesting that NLRP3 inflammasome may affect IL-33

production during allergic lung inflammation. In addition, we found reduced IL-33 levels in IL-1 α , IL-1 β and IL-1R1 deficient mice compared to WT mice. These data suggest a correlation between the low level of IL-33 which is known as Th2 cytokine and the inhibition of allergic asthma in IL-1 α , IL-1 β and IL-1R1.

IL-1 α production has been shown to be under the control of IL-1 β since IL-1 α expression were profoundly reduced in the brain of IL-1 β deficient mice treated with turpentine (31). In addition, IL-1 α production was reduced in caspase-1 deficient mice (32). In this study, we showed significant reduction of IL-1 β production in OVA sensitized and challenged IL-1 α deficient mice suggesting that IL-1 β production may be under the control of IL-1 α .

In conclusion, we document a critical role of the NLRP3 inflammasome in driving allergic asthma in the absence of adjuvant. Mechanistically, inhibition of allergic airway inflammation in the absence of NLRP3 and IL-1 leads to reduced Th2 cytokine/chemokine production, TSLP, IL-6 and IL-33 expression resulting in diminished migration of DCs in draining lymph nodes and Th2 lymphocyte activation. Therefore, the NLRP3 containing inflammasome complex and IL-1 are crucial for allergic lung inflammation and the NLRP3/IL-1 pathway may represent an interesting therapeutic target in allergy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM allergy DAL 2007 0822007), and the “Fond européen de développement régional” (FEDER Asthme 1575-32168).

METHODS

Mice

C57BL/6 wild-type mice, IL-1R1^{-/-} (backcross 7) (33), IL-1 α ^{-/-} (backcross 9) (31), IL-1 β ^{-/-} (backcross 9) (31) and NLRP3^{-/-} (generated directly on C57BL/6 genetic background) (3) mice were bred in our specific pathogen free animal facility at CNRS, Orléans, France. All knock-out mice were on the C57BL/6 genetic background. Mice were maintained in a temperature-controlled (23°C) facility with a strict 12 h light/dark cycle and were given free access to food and water. The experiments were performed with gender-matched mice aged 8-10 weeks. All protocols were approved by the CNRS institutional animal research committee and complied with the French Government's ethical and animal experiment regulations.

OVA model of allergic airway inflammation

Mice were sensitized subcutaneously twice at days 0 and 7 with 10 μ g ovalbumin (OVA, grade V, Sigma) without adjuvant and were challenged on days 14-16 with 10 μ g of OVA by intranasal route. Control mice were challenged with saline alone. Twenty four hours after the last challenge, mice were killed and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed. Half of the lung was stored at -80°C for EPO enzyme, cytokines and chemokines analysis and the other half was fixed overnight in buffered 4% formaldehyde solution for histology analysis.

Bronchoalveolar lavage (BAL) and flow cytometry of lung mononuclear cells

BAL was performed by washing the lungs four times with 0.5 ml of saline solution at room temperature. After centrifugation at 400 x g for 10 min at 4°C, the supernatant (cell-free BAL fluid) was stored at -20°C for cytokine analysis. FACS on BAL and lung mononuclear cells was performed as described in supplementary method.

Lung histology

Lungs were fixed in 4% buffered formaldehyde and 3 μ m sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or with periodic acid Schiff reagent (PAS) and examined with a Leica microscope (x400 magnification). Peribronchial infiltrates and mucus hypersecretion were assessed by a semi-quantitative score (0-3) by two observers independently as described before (34).

Pulmonary eosinophil peroxidase (EPO) activity

EPO activity was determined in order to estimate the recruitment of eosinophils to the lung parenchyma as described (35).

Cytokines measurement and antigen-specific IgE by ELISA

IL-4, IL-5, IL-13, TSLP, IL-33, IL-1 β , CCL5 (Rantes), CCL11 (Eotaxin), CCL17 (TARC) concentrations in BAL, cell culture supernatant from mediastinal lymph nodes or lung homogenate and OVA specific IgE in serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using commercial kits from R&D (Abingdon, UK) according to the manufacturer's recommendations.

Lung mononuclear cells isolation and stimulation

Lung mononuclear cells were isolated from mice 24h after the last challenge as described (36). Isolated lung mononuclear single cells were plated in round bottom 96-well plates (2×10^6 /ml) and restimulated 4h *in vitro* with phorbol 12-myristate 13-acetate (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml).

Dendritic cell culture and uptake of OVA-FITC

Dendritic cell culture and OVA-FITC uptake was described in the supplementary methods

Statistical analysis

The data are presented as the mean $\pm$ SEM with n = 6 animals per group. The significance of differences between two groups was determined by one way ANOVA (non parametric test), followed by Bonferroni comparison test using Prism software. Statistical significance was reported if P < 0.05 was achieved.

REFERENCES

1. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 1998;282(5397):2261-3.
2. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 2010;10(4):225-35.
3. Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006;440(7081):237-41.
4. Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol* 2007;147(2):227-35.
5. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):1-5.
6. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003;425(6957):516-21.
7. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 2007;13(7):851-6.
8. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008;453(7198):1122-6.
9. Li H, Liu P, Cepeda J, Fang D, Easley RB, Simon BA, et al. Augmentation of Pulmonary Epithelial Cell IL-8 Expression and Permeability by Pre-B-cell Colony Enhancing Factor. *J Inflamm (Lond)* 2008;5:15.
10. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Willart MA, Muskens F, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007;13(8):913-9.
11. Lommatzsch M, Cicko S, Muller T, Lucattelli M, Bratke K, Stoll P, et al. Extracellular Adenosine Triphosphate and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010.
12. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009;27:519-50.
13. Hultner L, Kolsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer JP, Mailhammer R, et al. In activated mast cells, IL-1 up-regulates the production of several Th2-related cytokines including IL-9. *J Immunol* 2000;164(11):5556-63.
14. Nakae S, Komiyama Y, Yokoyama H, Nambu A, Umeda M, Iwase M, et al. IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol* 2003;15(4):483-90.
15. Stassen M, Arnold M, Hultner L, Muller C, Neudorfl C, Reineke T, et al. Murine bone marrow-derived mast cells as potent producers of IL-9: costimulatory function of IL-10 and kit ligand in the presence of IL-1. *J Immunol* 2000;164(11):5549-55.
16. Schmitz N, Kurrer M, Kopf M. The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol* 2003;33(4):991-1000.
17. Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, et al. Differential effects of IL-1 α and IL-1 β on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol* 2003;171(12):6448-56.
18. Hammerberg C, Arend WP, Fisher GJ, Chan LS, Berger AE, Haskill JS, et al. Interleukin-1 receptor antagonist in normal and psoriatic epidermis. *J Clin Invest* 1992;90(2):571-83.
19. Broide DH, Lotz M, Cuomo AJ, Coburn DA, Federman EC, Wasserman SI. Cytokines in symptomatic asthma airways. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89(5):958-67.
20. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, et al. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 1998;282(5397):2258-61.

21. Yang M, Hogan SP, Henry PJ, Matthaei KI, McKenzie AN, Young IG, et al. Interleukin-13 mediates airways hyperreactivity through the IL-4 receptor-alpha chain and STAT-6 independently of IL-5 and eotaxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(4):522-30.
22. Lambrecht BN, Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 2003;3(12):994-1003.
23. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008;8(3):193-204.
24. Ito T, Wang YH, Duramad O, Hori T, Delespesse GJ, Watanabe N, et al. TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005;202(9):1213-23.
25. Omori M, Ziegler S. Induction of IL-4 expression in CD4(+) T cells by thymic stromal lymphopoietin. *J Immunol* 2007;178(3):1396-404.
26. Rochman I, Watanabe N, Arima K, Liu YJ, Leonard WJ. Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells. *J Immunol* 2007;178(11):6720-4.
27. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010;10(2):103-10.
28. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23(5):479-90.
29. Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(22):9021-6.
30. Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Morii E, Aozasa K, Flavell RA, et al. Caspase-1, caspase-8, and calpain are dispensable for IL-33 release by macrophages. *J Immunol* 2009;183(12):7890-7.
31. Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, et al. Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 1998;187(9):1463-75.
32. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, et al. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1995;267(5206):2000-3.
33. Labow M, Shuster D, Zetterstrom M, Nunes P, Terry R, Cullinan EB, et al. Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. *J Immunol* 1997;159(5):2452-61.
34. Gasse P, Mary C, Guenon I, Noulin N, Charron S, Schnyder-Candrian S, et al. IL-1R1/MyD88 signaling and the inflammasome are essential in pulmonary inflammation and fibrosis in mice. *J Clin Invest* 2007;117(12):3786-99.
35. Schnyder-Candrian S, Togbe D, Couillin I, Mercier I, Brombacher F, Quesniaux V, et al. Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 2006;203(12):2715-25.
36. Hachem P, Lisbonne M, Michel ML, Diem S, Roongapinun S, Lefort J, et al. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2005;35(10):2793-802.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. NLRP3 mediates allergic inflammation

BALF cell differential counts of WT and NLRP3^{-/-} mice sensitized by s.c. injection of OVA on days 0 and 7 and exposed on days 14-16 to intranasal OVA challenges **(A)**. Eosinophil recruitment to the tissue was estimated by measuring eosinophil peroxidase activity (EPO) in the lung tissue homogenates given in optical density (OD 490 nm) values in **(B)**. Th2 cytokines and chemokines production in lung, BAL and mLN and OVA-specific serum IgE levels were determined by ELISA **(C-N)**. The IgE levels are expressed as OD at 405 nm. These experiments were performed 3 times. One representative experiment is shown. Values are the mean $\pm$ SEM of 8-10 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001.

Figure 2. Reduced lung inflammation after OVA exposure in NLRP3^{-/-} mice

Lung sections from saline and OVA-sensitized and challenged WT and NLRP3^{-/-} mice were stained with hematoxylin and eosin (HE) to visualize cell recruitment **(A)** and with periodic acid schiff reagent (PAS) to visualize mucus **(B)**, as shown by the arrows. The extend of peribronchial and perivascular inflammation was scored by two independent observers **(C)**. Magnification is x 400. These experiments were performed 3 times. One representative experiment is shown. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group (B). *** P $\leq$ 0.001.

Figure 3. Reduced IL-13 production in NLRP3^{-/-} mice after OVA exposure

OVA sensitized WT and NLRP3^{-/-} mice were challenged three times with OVA. 24 hours after the third challenge, lung mononuclear cells were isolated and restimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in presence of Brefeldine A followed by extracellular staining of TCR β , CD4 and CD8 α , and intracellular staining of IL-13. Representative dot plots **(A, B)**, frequency and cell numbers of CD4⁺ IL-13⁺ **(C)** and CD8 α ⁺ IL-13⁺ **(D)** cell populations are given. These experiments were performed 3 times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. * P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.001.

Figure 4. Reduced DCs migration in mLN of NLRP3 deficient mice

OVA-FITC was administrated in the lung of WT and NLRP3^{-/-} mice by intranasal route, DCs antigen uptake and migration were followed twenty hours later in mLN. Mean of fluorescence intensity (MFI) of OVA-FITC **(A)**, absolute number of OVA-FITC⁺ MHCII⁺ DCs cells **(B)**, OVA-FITC⁺CD80⁺ DCs cells **(C)**, and OVA-FITC⁺CD40⁺ DCs cells **(D)** were analyzed in mLN. *In vitro* OVA-FITC uptake on bone marrow derived dendritic cells (BMDC) from WT and NLRP3^{-/-} mice was analyzed **(E)**. These experiments were performed 3 times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05.

Figure 5. IL-1R1 signaling is critical during allergic response

BALF cell differential count, measured by flow cytometry, of WT, IL-1R1, IL-1 α and IL-1 β deficient mice sensitized by subcutaneous injection of OVA on days 0 and 7, and exposed on days 14-16 to intranasal OVA challenges **(A)**. Eosinophil recruitment into the tissue was estimated by measuring eosinophil peroxidase activity (EPO) in the lung tissue homogenates given in optical density (OD 490 nm) values in **(B)**. Th2 cytokines and chemokines production in lung, BAL, mLN and OVA-specific IgE levels in serum were determined by ELISA **(C-L)**. The IgE levels are expressed as OD at 405 nm. These experiments were performed 3 times. One representative experiment is shown. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001.

Figure 6. IL-1 α and IL-1 β signalling are necessary for IL-13 producing CD4+ T cell recruitment in the lung

IL-13 producing T cell subsets in lung of OVA-sensitized and challenged WT, IL-1 β ^{-/-} and IL-1R1^{-/-} mice were assessed by flow cytometry. Lung mononuclear cells were isolated and restimulated with PMA (50 ng/ml) and ionomycin (750 ng/ml) in presence of Brefeldine A followed by extracellular staining of TCR β and CD4 and intracellular staining of IL-13. The frequency and absolute cell number of CD4+IL-13+ **(A, C)** cell populations are given. Representative dot plot, frequency and absolute number of IL-13+CD4+ cells gated on TCR β + cell populations **(A-C)** were shown. These experiments were performed 3 times. Values are the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. * P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGEND

Supp. Fig. 1 . Diminished lung inflammation after OVA exposure in IL-1R1, IL-1 α and IL-1 β deficient mice

Lung sections from OVA-sensitized and challenged WT and IL-1R1, IL-1 α and IL-1 β deficient mice were stained with hematoxylin and eosin to visualize cell recruitment and with periodic acid schiff reagent (PAS) to visualize mucus **(A)**, as shown by the arrows. The extend of peribronchial and perivascular inflammation and mucus production was scored by two independent observers **(B)**. Magnification is x 400. The bars in **(B)** represent the mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. *P $\leq$ 0.05; ** P $\leq$ 0.01; *** P $\leq$ 0.001; ns, not significant.

Figure 1

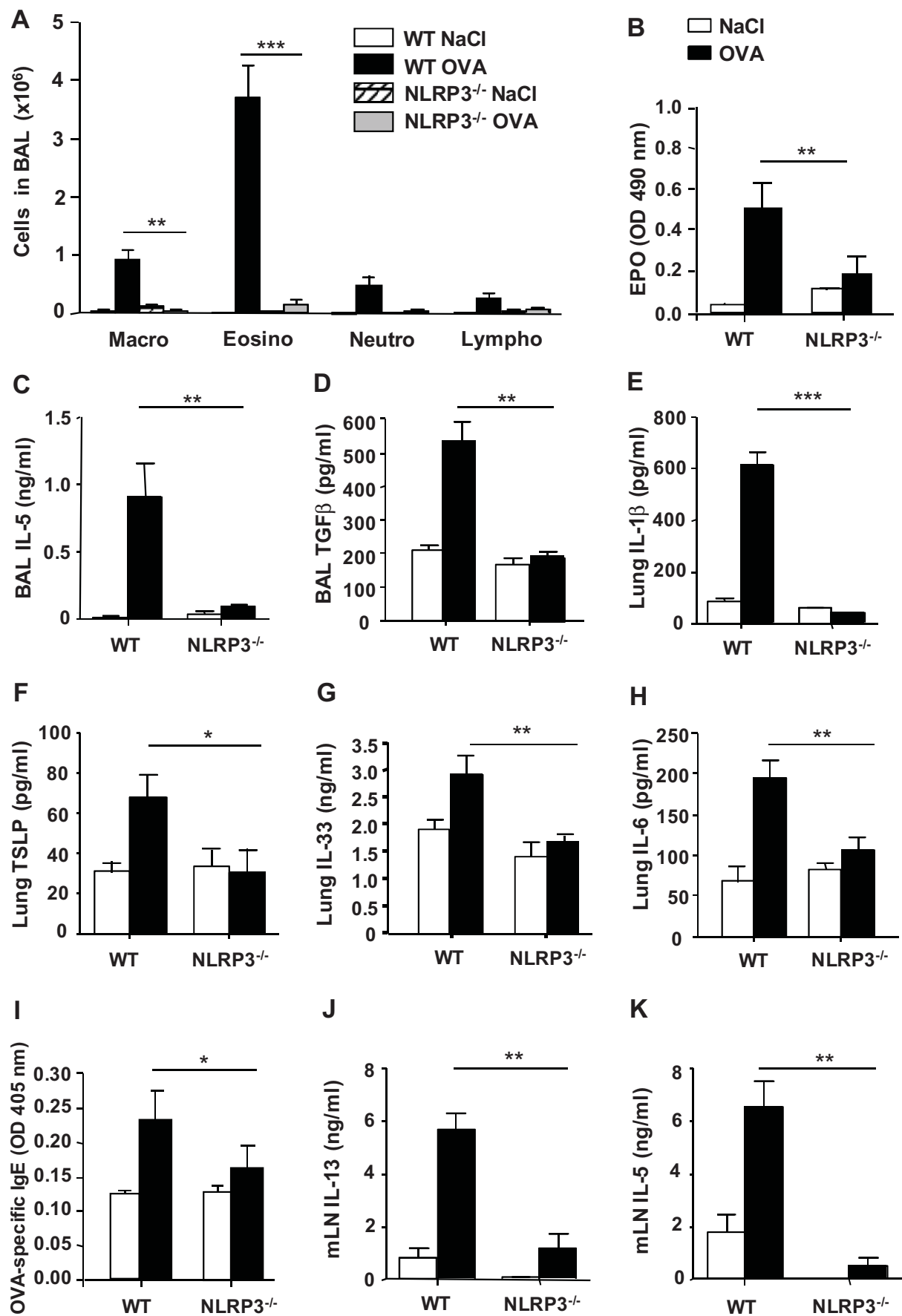


Figure 1

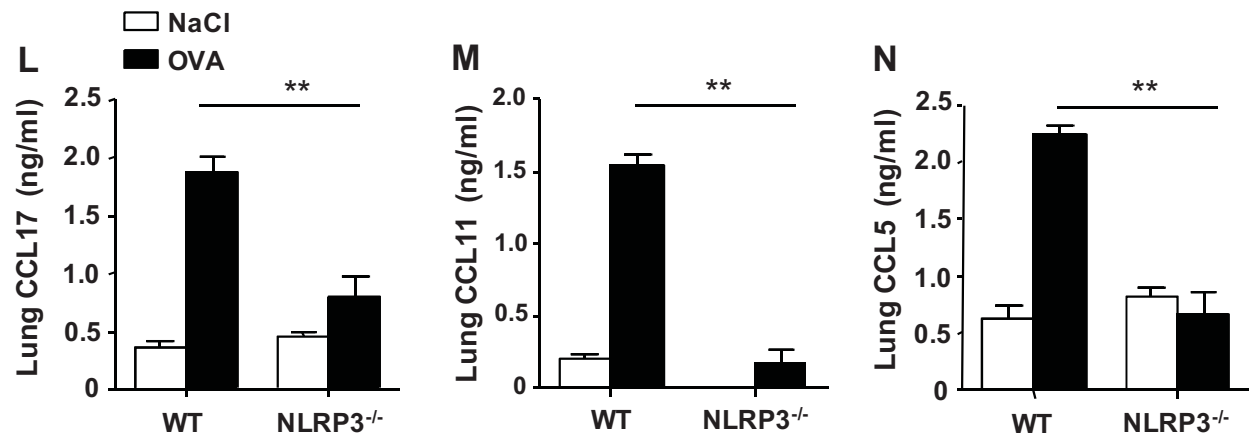


Figure 2

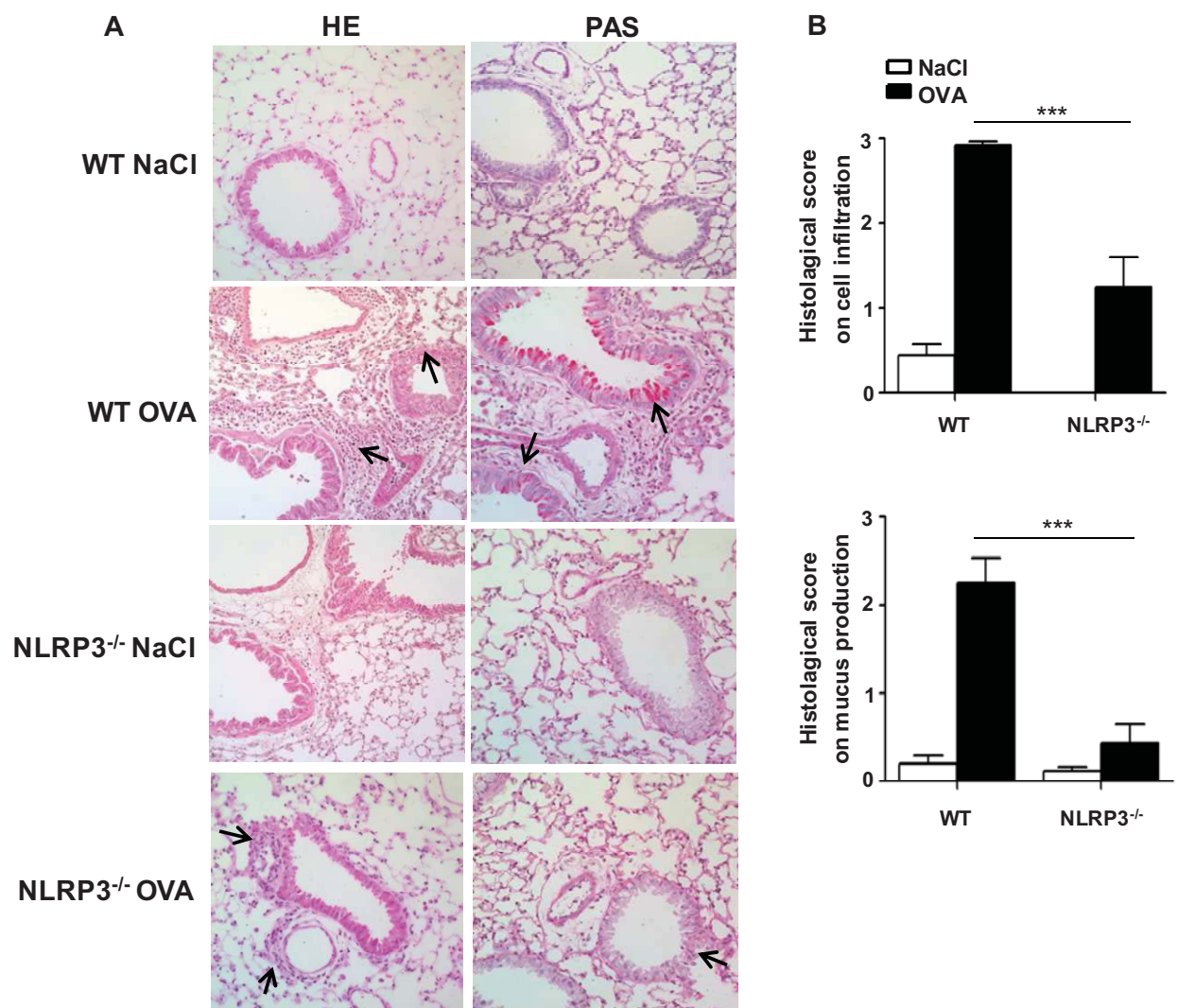


Figure 3

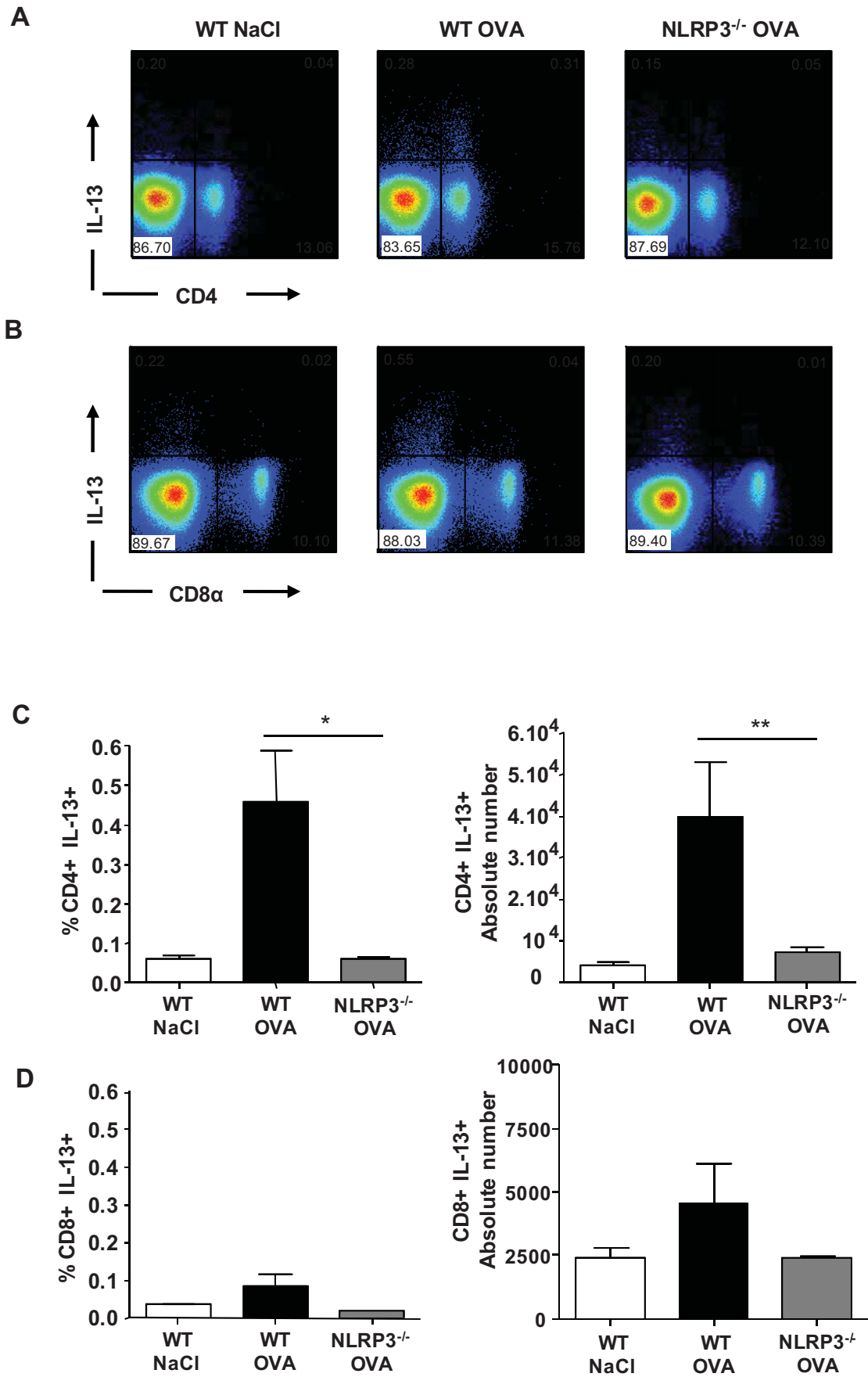


Figure 4

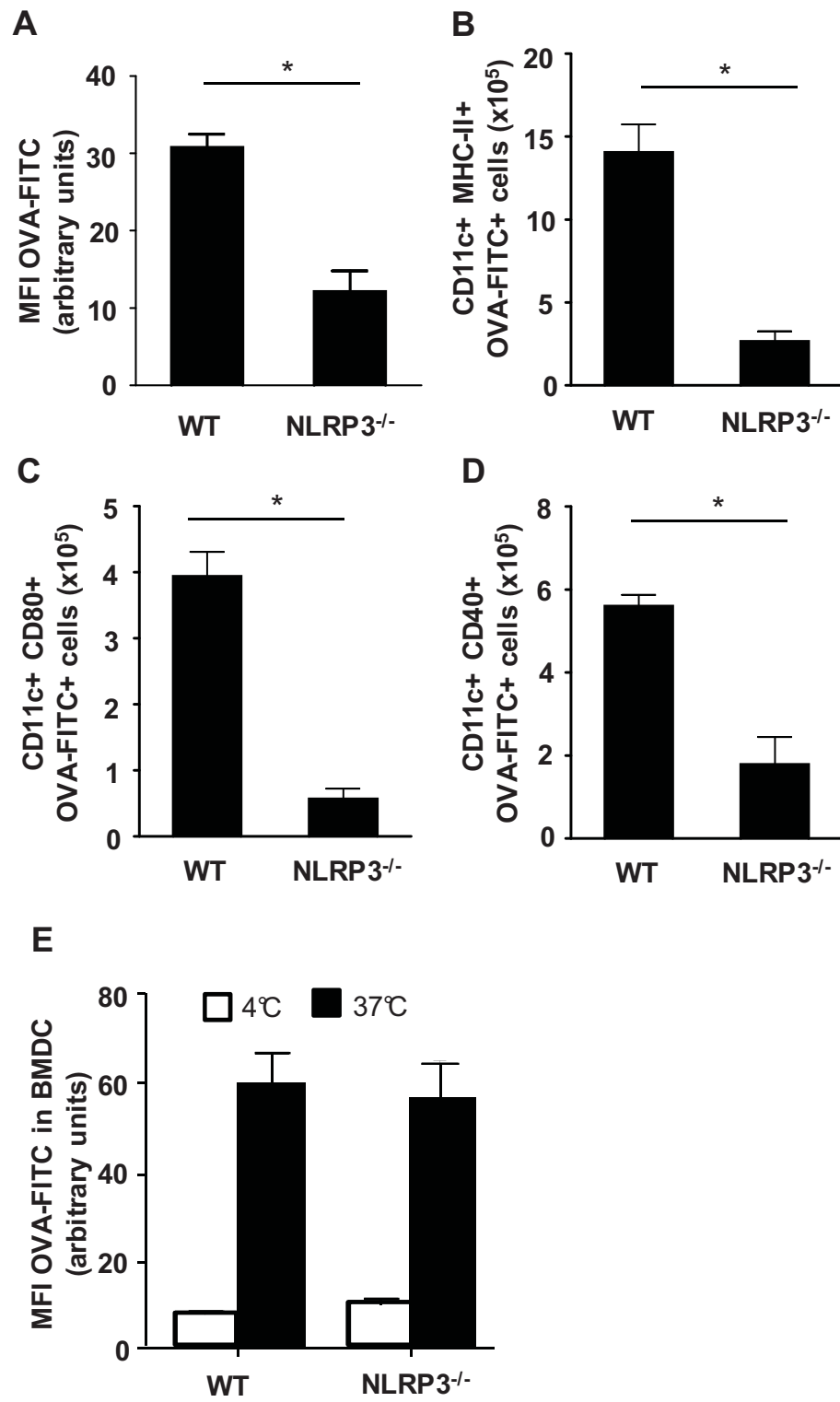


Figure 5

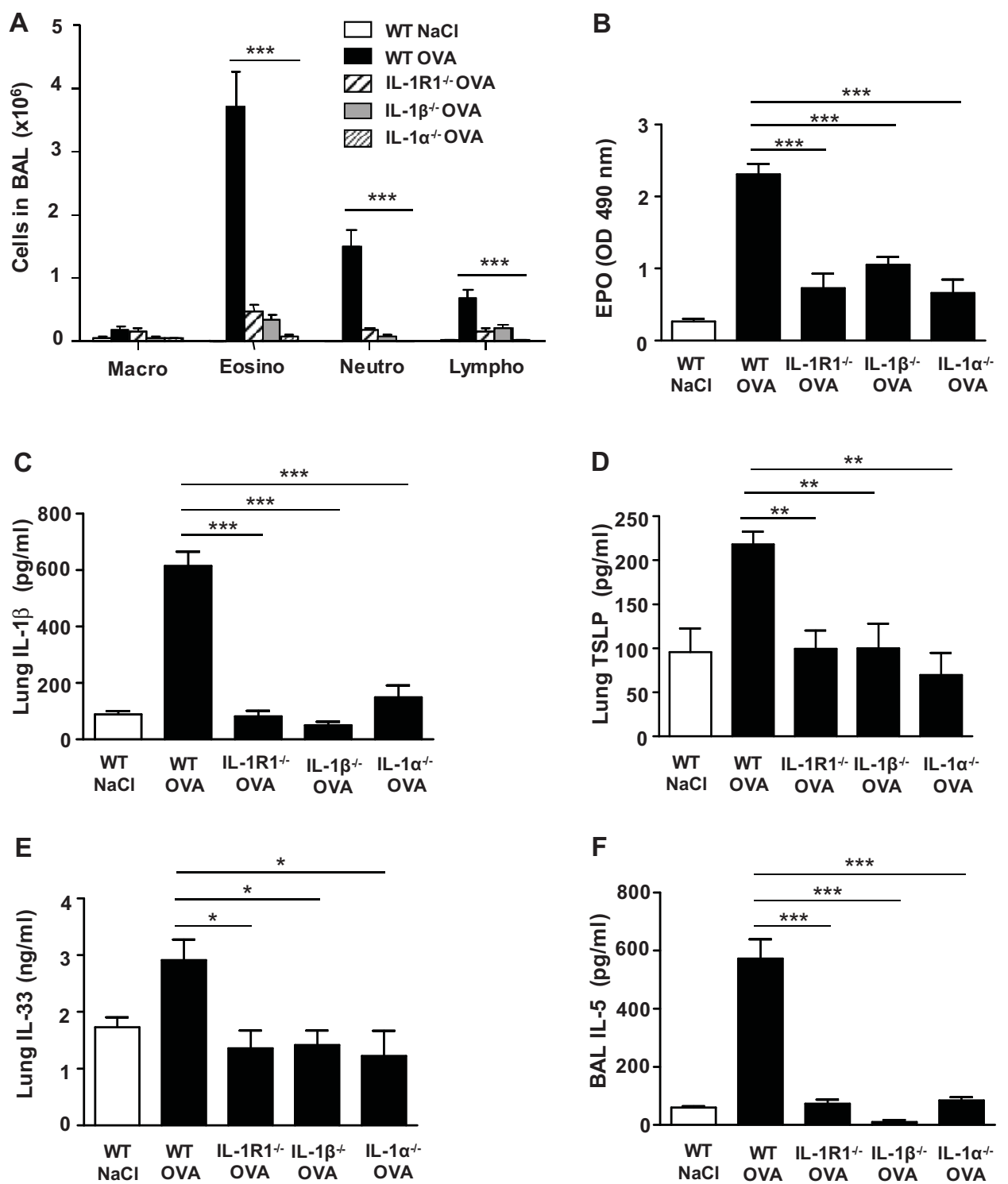


Figure 5

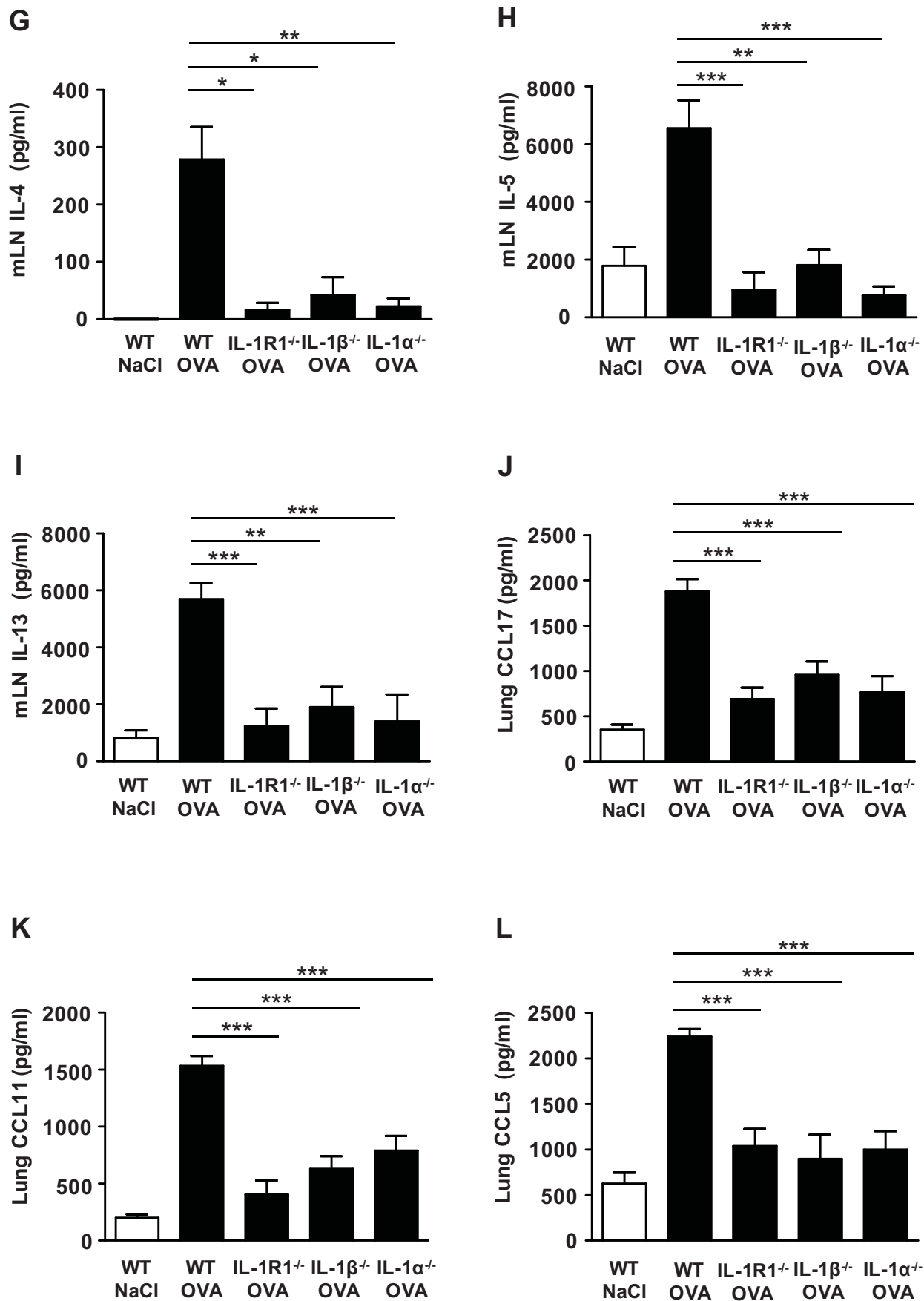
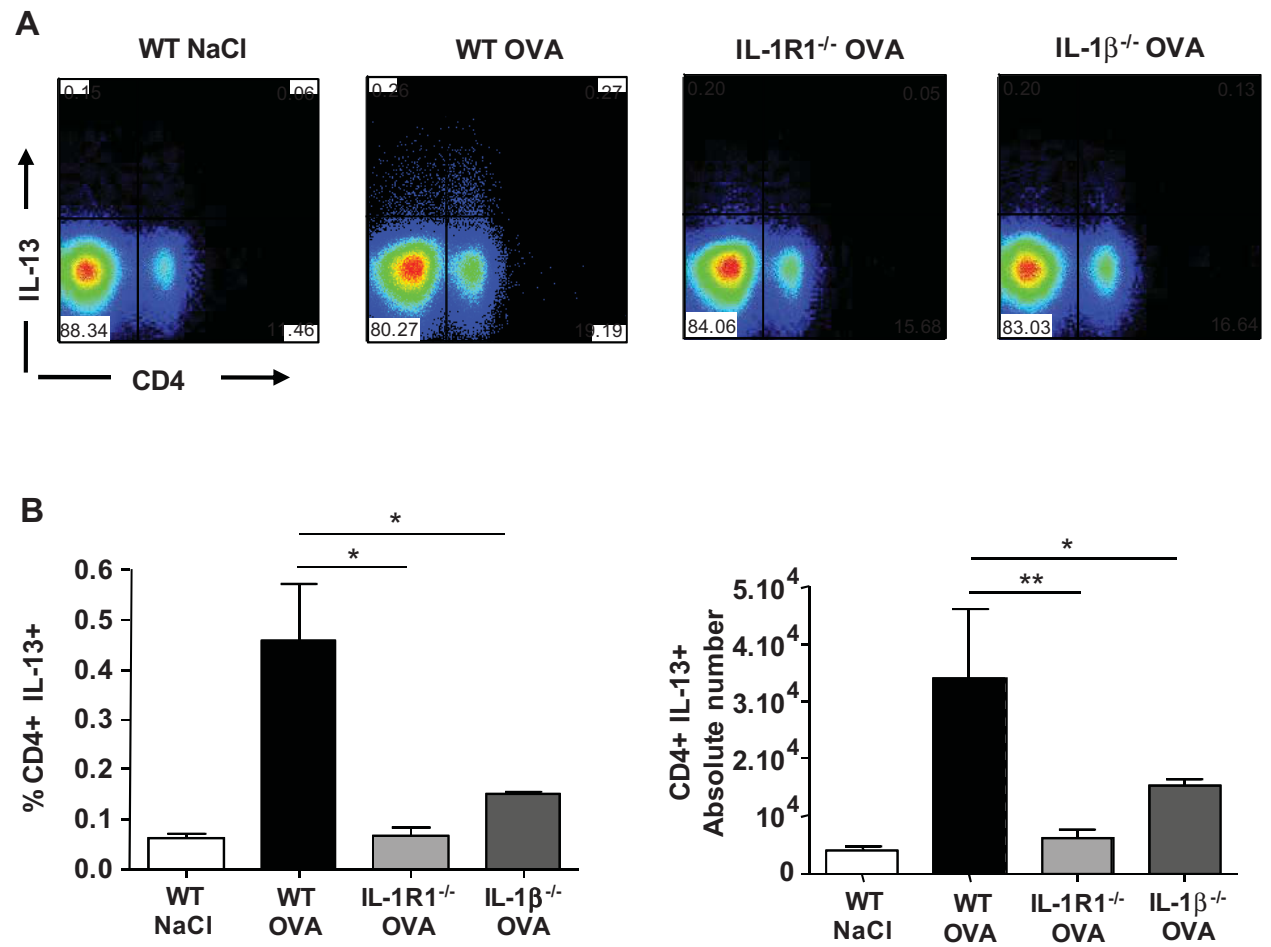
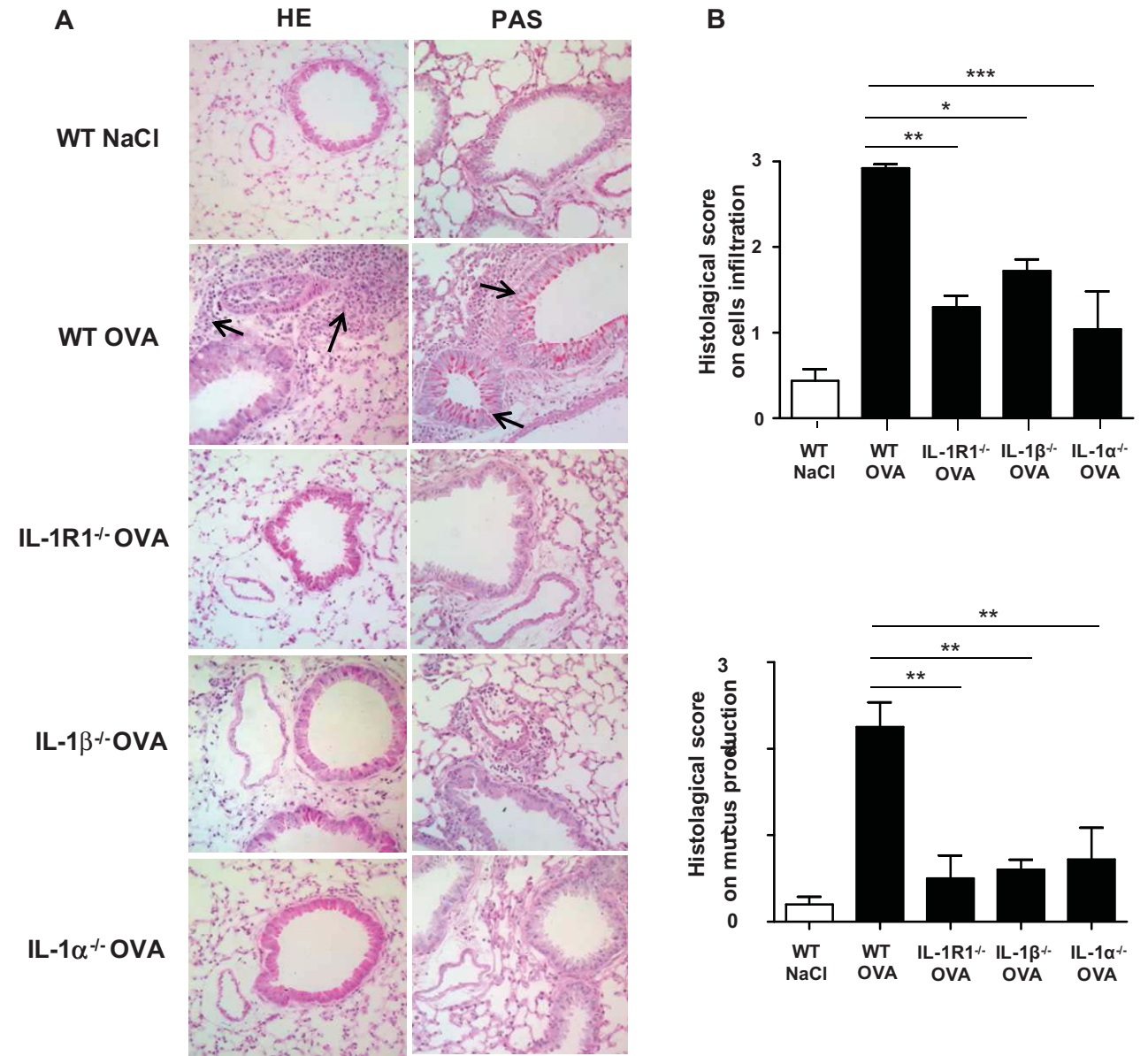


Figure 6



Supplementary figure 1



Discussion article 2

Depuis une dizaine d'années, la compréhension des mécanismes d'induction de l'asthme allergique a énormément progressé. On sait aujourd'hui que la contamination de l'antigène par des motifs dérivés des pathogènes (PAMP), comme le LPS, est nécessaire à l'activation des cellules dendritiques et à la génération de la réponse Th2 allergique (Eisenbarth et al., 2008).

L'activation des cellules dendritiques par les PAMP entraîne entre autres la synthèse de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18. La maturation de ces cytokines nécessite un second signal afin d'activer l'inflammasome et la caspase-1. Ce second signal consiste en des signaux de danger endogènes (DAMP) tels que l'ATP ou l'acide urique libérés par les cellules mortes. En présence de ces deux signaux, on observe une forte sécrétion d'IL-1 β mature qui agit alors sur divers types cellulaires pour induire une réponse Th2 forte (Dinarello, 2009).

Récemment, l'équipe de Lambrecht a montré que l'hydroxyde d'aluminium, un des seuls adjuvant utilisé en vaccination humaine entraînait une mort cellulaire au niveau du site d'injection, qui s'accompagne d'une libération de signaux de danger fournissant ainsi le second signal et permettant de potentialiser la réponse vaccinale (Kool et al., 2008b).

Nos résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension dans les mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3. Nous avons observé que la présence d'adjuvant n'était pas nécessaire à l'activation de cet inflammasome, ni à la libération d'IL-1 β mature. En effet, des souris déficientes en NLRP3 développent une réponse pulmonaire allergique réduite comparativement aux souris sauvages. On observe notamment, une réduction importante de l'éosinophilie, des cytokines Th2 et des chimiokines au niveau pulmonaire, ainsi que des IgE spécifiques de l'antigène dans le sérum.

En absence de l'inflammasome NLRP3, les cellules dendritiques perdent une partie de leur capacité à internaliser les antigènes et se retrouvent en nombre restreint dans les ganglions lymphatiques drainants par rapport aux souris sauvages. De plus, ces cellules expriment moins le CMH de classe II et les molécules de costimulation CD40 et CD80 que des cellules issues de souris sauvages. L'ensemble de ces observations indique que l'absence de NLRP3 entraîne une atténuation de la réponse inflammatoire au niveau pulmonaire, mais également au niveau systémique. A ceci s'ajoute une très forte diminution de la sécrétion d'IL-1 β dans les poumons des souris déficientes pour NLRP3, ce qui peut évidemment jouer un rôle dans l'atténuation de la réponse chez ces souris. En effet, notre étude montre qu'une rupture de la voie IL-1R1 a pour conséquence une réduction massive de la réponse inflammatoire allergique.

De façon surprenante, la déficience en IL-1 α ou en IL-1 β aboutit à un phénotype semblable, indiquant que ces deux cytokines seraient d'importance égale dans cette pathologie. Les souris

déficiences en IL-1R1, IL-1 α ou IL-1 β développent une inflammation pulmonaire réduite, aussi bien au niveau du recrutement cellulaire, qu'au niveau de la production de cytokines pro-inflammatoires. De même, la production d'IgE spécifiques de l'allergène est diminuée de façon identique chez toutes ces souris.

Nous avons également observé une diminution significative de la production de TSLP dans les poumons des souris déficientes en IL-1 α , IL-1 β ou leur récepteur. Or, cette cytokine favorise la réponse Th2 en augmentant l'expression de OX40L sur les cellules dendritiques (Nakae et al., 2003a; Soumelis and Liu, 2004; Zhou et al., 2005). De même, la production des chimiokines de recrutement des éosinophiles et des lymphocytes Th2 (CCL11, CCL5 et CCL17) apparaît dramatiquement réduite chez les souris déficientes pour l'IL-1 α , l'IL-1 β ou leur récepteur, ce qui explique la diminution des signes pulmonaires.

Notre étude révèle un rôle critique de l'IL-1 α et de l'IL-1 β puisque l'absence de l'une ou l'autre de ces cytokines affecte considérablement la réponse inflammatoire allergique. Cela signifie que ces deux cytokines sont nécessaires pour induire une réponse de même amplitude que celle observée chez les souris sauvages.

Il ne faut cependant pas ignorer la possibilité d'une régulation de la forme α par la forme β , et inversement. Différents exemples dans la littérature mentionnent une diminution de la production d'IL-1 β chez les souris déficientes en IL-1 α ou en caspase-1 (Horai et al., 1998; Kuida et al., 1995). Des variations importantes au niveau ARNm ont été détectées chez les souris dont les gènes de l'IL-1 α ou de l'IL-1 β ont été supprimés. Par exemple, l'expression de l'ARNm de l'IL-1 β est diminuée de 1,5 fois chez les souris déficientes en IL-1 α par rapport à une souris sauvage. A l'inverse, les taux d'ARNm de l'IL-1 α sont 30 fois inférieurs à la normale chez une souris déficiente en IL-1 β (Dinarelli, 2009). Ces observations suggèrent qu'il existe des mécanismes de régulation entre ces deux cytokines, qui doivent être pris en compte pour l'interprétation des études utilisant ces lignées de souris.

Dans notre étude, les taux protéiques pulmonaires d'IL-1 β sont diminués chez les souris déficientes en IL-1 α . Mais nous ne pouvons affirmer s'il s'agit d'une régulation négative de l'IL-1 β ou d'une diminution globale de l'inflammation en absence d'IL-1 α . Il est important de noter que malgré leurs fonctions proches, il semblerait qu'aucun système de compensation entre ces deux cytokines ne se soit mis en place chez ces souris déficientes pour le gène de l'IL-1 α ou β .

ARTICLE 3 : ETUDE DE L'INTERLEUKINE-33 DANS L'ACTIVATION ET LA MATURATION DES CELLULES DENDRITIQUES DANS UN MODELE MURIN D'ASTHME ALLERGIQUE

Bien avant la découverte de la voie IL-33/ST2, plusieurs équipes avaient suggéré l'existence d'une voie d'activation des lymphocytes Th2 indépendante de l'IL-4 et de l'IL-5. Dès 1998, Hogan et collègues avaient remarqué que les souris déficientes en IL-4 et IL-5 présentaient une infiltration cellulaire réduite dans les poumons et une diminution des IgE sériques, mais développaient toujours l'HRB après immunisation et provocation à l'ovalbumine (Hogan et al., 1998). De même, les essais de thérapies anti-IL-4 et/ou anti-IL-5 chez les patients asthmatiques n'ont qu'une efficacité partielle (Walsh, 2008).

L'implication de la voie ST2/IL-33 dans le développement de la réponse Th2 et l'HRB est aujourd'hui bien décrite dans la littérature. De même, l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-33 ou son récepteur ST2, ou bien l'administration d'anticorps neutralisants dirigés contre l'IL-33 ont montré une réduction significative de l'inflammation pulmonaire allergique (Coyle et al., 1999; Kurowska-Stolarska et al., 2008; Liu et al., 2009; Lohning et al., 1998 ; Oboki et al., 2010).

De part son effet direct sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles, l'IL-33 amplifie la réponse inflammatoire pulmonaire et contribue à l'exacerbation de l'HRB (Ali et al., 2007; Cherry et al., 2008; Moulin et al., 2007; Pecaric-Petkovic et al., 2009; Stolarski et al., 2010; Suzukawa et al., 2008). L'IL-33 agit également sur les lymphocytes Th2 en favorisant leur recrutement et leur production d'IL-5 et d'IL-13 (Komai-Koma et al., 2007; Kurowska-Stolarska et al., 2008). A ceci se rajoute un effet positif de l'IL-33 sur la production de cytokines Th2 (incluant l'IL-4) sur les cellules NK et NKT (Bourgeois et al., 2009; Smithgall et al., 2008).

Toutefois, relativement peu d'informations sont disponibles quant à l'effet de l'IL-33 sur les cellules dendritiques. On sait pourtant que l'IL-33 est produite très tôt par les cellules épithéliales pulmonaires après exposition à l'allergène (Hammad et al., 2009; Humphreys et al., 2008 ; Oboki et al., 2010) et que les cellules dendritiques jouent un rôle déterminant dans l'induction de la réponse Th2.

Une étude réalisée *in vitro* a montré que des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse exprimaient le récepteur ST2 et répondaient à l'IL-33 en sur-exprimant le CMH-II et CD86 (Rank et al., 2009). Cette même étude révèle que la co-culture de cellules dendritiques et de lymphocytes T naïfs en présence d'IL-33 entraînait la production d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-13 par les cellules T, suggérant un rôle de l'IL-33 dans la différenciation Th2.

Afin de vérifier les effets de l'IL-33 sur les cellules dendritiques, nous avons étudié l'activation de ces dernières au cours de la phase d'immunisation, puis lors des provocations allergéniques dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique chez des souris sauvages ou déficientes pour le récepteur ST2.

IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation

Article en cours de révision pour “*The European Journal of Immunology*”

Anne-Gaëlle Besnard¹, Dieudonnée Togbe^{1,2}, Noëlline Guillou¹, François Erard¹, Valérie Quesniaux¹
and Bernhard Ryffel¹

¹Université d'Orléans and CNRS, UMR 6218 Molecular Immunology and Embryology, 45071 Orléans, France

²Artimmune SA, 16 rue Léonard de Vinci, 45100 Orléans, France

Address of correspondence:

Bernhard Ryffel, M.D. CNRS-UMR6218, Molecular Immunology and Embryology, 3B rue de la Férellerie, 45071 Orléans Cedex 2, France, Phone: + 33 238 25 7980, e-mail: bryffel@cnrs-orleans.fr

ABSTRACT

IL-33, a new member of the IL-1 family cytokine, is involved in Th2-type response in a wide range of diseases and signals through the ST2 receptor expressed on many immune cells. Since the effects of IL-33 on dendritic cells (DCs) remain controversial, we investigated IL-33 ability to modulate DCs functions *in vitro* and *in vivo*. Here, we report that IL-33 activates myeloid DCs to produce IL-6, IL-1 β , TNF, CCL17 and to express high levels of CD40, CD80 and OX40L. Importantly, IL-33-activated DCs prime naive lymphocytes to produce Th2 cytokines IL-5 and IL-13, but not IL-4. Using an OVA-induced allergic lung inflammation model, we demonstrate that the reduced airway inflammation in ST2-deficient mice correlates with failure in DCs activation and migration to the draining lymph nodes. Finally, we show that adoptive transfer of IL-33-activated DCs exacerbates lung inflammation in a DC-driven model of allergic airway inflammation. These data demonstrate for the first time that IL-33 activates DCs during antigen presentation and thereby drives a Th2-type response in allergic lung inflammation.

Key words: cytokines, IL-33, dendritic cell, allergy, lung inflammation

Abbreviations used in this paper: BAL, bronchoalveolar lavage; DCs, dendritic cells; EPO, eosinophil peroxidase; mLN, mediastinal lymph node; OVA, ovalbumin.

INTRODUCTION

Allergic asthma is a chronic disorder characterized by eosinophilic airway inflammation, mucus hypersecretion, antigen-specific-IgE antibodies and increased airway hyperresponsiveness (AHR) [1, 2]. The process of airway inflammation involves various cells types, such as eosinophils, mast cells, lymphocytes and dendritic cells. Th2 cells have been shown to play a predominant role in allergic asthma and Th2 cytokines, such as IL-4, IL-5 and IL-13, exacerbate disease severity [3, 4]. IL-33, the recently discovered Th2 cytokine, is found at high levels in plasma of asthmatic patients [5, 6] and in the lung of mouse during experimental allergic asthma [7, 8].

IL-33 is a member of IL-1 family [9-11]. Like IL-1 β or IL-18, IL-33 is synthesized as a precursor form and can be cleaved by caspase-1 and 3 [12, 13] but the cleavage products are biologically less active than the precursor. In contrast to the other IL-1 family members, IL-33 is mainly expressed in non-hematopoietic cells such as fibroblasts, epithelial cells and endothelial cells [10, 14, 15]. Because of its nuclear localization sequence, IL-33 is usually present in the nucleus, where it acts as a potential transcriptional repressor [16]. Recently, IL-33 has been shown to be released from necrotic cells and may act as an alarmin in a similar manner of IL-1 α [17] or HMGB1 [18, 19]

IL-33 signals through a heterodimeric membrane receptor composed of ST2 and IL-1R1 accessory protein (IL-1RAcP) and activates basophils [20, 21], mast cells [22, 23], eosinophils [24, 25], NK and NKT cells [26], Th2 lymphocytes [5, 27] and macrophages [14]. In accordance with its Th2 functions, administration of IL-33 into naive mice induces severe inflammation in the lung and digestive tract with elevated levels of IL-4, IL-5 and IL-13, splenomegaly and increased serum immunoglobulin [10]. IL-33 has also been reported to polarize naive CD4⁺ T cells into a population of T cells which produces IL-5 and IL-13, but no IL-4 [5]. Polarization of this atypical Th2 population is independent of IL-4, STAT6 and GATA3. On macrophages, IL-33 amplifies IL-13-mediated polarization of alternatively activated macrophages (AAM) to produce CCL17 and CCL24 which contribute to airway inflammation [14].

Limited information is available on the role of IL-33 in DCs function. During mouse bone marrow DCs differentiation, IL-33 was shown to promote DCs generation *in vitro* by triggering GM-CSF production by other bone marrow leukocyte populations [28]. Myeloid DCs generated in the presence of IL-33 exhibit a relatively limited T cells stimulatory capacity compared with conventional DCs cultures established with GM-CSF. On the other hand, Rank et al. reported that mature DCs treatment with IL-

33 upregulated cell-surface expression of MHC class II molecule and the costimulatory molecule CD86 [29]. Furthermore, IL-33-activated DCs could polarize CD4⁺ T cells to produce IL-5 and IL-13, suggesting that IL-33 may play a role in the induction of adaptive immune responses.

Since DCs are crucial for the promotion of allergic asthma, we therefore investigated the role of IL-33 on DCs function in allergic airway inflammation. First we showed that DCs directly respond to IL-33 through ST2 leading to an upregulation of cell surface costimulatory molecules CD40 and CD80, and an increased production of proinflammatory cytokines and chemokines IL-6, IL-1 β , TNF and CCL17 (TARC). DCs treated with IL-33 prime naive T cells to produce the pro-allergic cytokines IL-5 and IL-13. Reduced DCs activation was observed in ST2-deficient mice compared to WT mice after allergen sensitization and challenge. Finally, we demonstrated that adoptive transfer of IL-33-activated DCs into naive recipient mice enhanced lung airway inflammation. Therefore we showed here that IL-33 plays a critical role during antigen sensitization through DCs activation.

RESULTS

IL-33 activates bone marrow derived dendritic cells in vitro

DCs, the most powerful antigen-presenting cells, are considered as the key player on initiating and maintaining allergic Th2 immune response to inhaled allergens in asthma [30]. Since ST2 is expressed in DCs at both transcriptional and protein levels [29], we decided to fully characterized IL-33 effects on DCs. Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were cultured twenty four hours with increasing concentrations of recombinant murine IL-33. We found that 1 ng/ml of IL-33 significantly activates DCs to produce the proinflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , TNF and the chemokine CCL17 (**Figure 1A**). In addition, IL-33 induced up-regulation of CD40, CD80 and OX40L expression on DCs (**Figure 1B**), but has no effect on MHC class II molecule or CD86 expression (data not shown). The IL-33 effects were dose-dependant and the maximal effect was found at 10 ng/ml. IL-33 treatment has no effect on ST2-deficient BMDCs. These results demonstrate that IL-33 potently activates DCs through ST2, leading to IL-6, IL-1 β , TNF and CCL17 production and co-stimulatory surface molecules expression

IL-33-activated DCs promote T-cell proliferation and Th2 polarization

The results on BMDCs maturation suggested that IL-33 may increase the ability of these cells to stimulate T cells. To investigate this possibility, we performed co-culture experiments. DCs were cultured with or without IL-33 for twenty four hours, then washed twice and co-cultured with CFSE-labelled naive CD4⁺ T cells from DO11.10 mice (OVA-TCR transgenic BALB/C mice) in the presence of the OVA-specific peptide. After six days of co-culture, CD4⁺ T cells proliferation was assessed by flow cytometry. IL-33-activated DCs increased T cells proliferation compared to untreated DCs (**Figure 2A**).

To determine whether IL-33-activated DCs can influence T cell polarization, we co-cultured CD4⁺ T cells from naive WT mice with DCs in the presence of increasing doses of IL-33. DCs alone or T cells cultured alone were used as controls. Cytokine levels were analysed after 6 days in the culture supernatants. CD4⁺ T cells cultured with DCs in the presence of IL-33 produced IL-5 and IL-13 in a dose dependent manner (**Figure 2B**), but no IL-4, IL-10 or IFN γ were detected (data not shown). This is consistent with previous reports that IL-33 drives an atypical Th2 response [5, 29]. Absence of IFN γ or IL-10 in the co-culture supernatant indicates that IL-33 does not favour Th1 or Treg polarization. No cytokine was detected in the supernatants of CD4⁺ T cells cultured alone, even in the presence of IL-33 (data not shown). These results indicate that IL-33 has no direct effect on naive T cells, but rather acts through DCs.

Reduced DCs activation in ST2-deficient mice after OVA sensitization

To determine whether the observed properties of IL-33 on DCs had physiological significance, the immune response induced after OVA sensitization was assessed in wild-type (WT) and ST2-deficient mice. Mice were subcutaneously immunized twice with OVA or saline on day 0 and 7. DCs activation in lymph nodes (LN) was analysed a week after the last immunization. As expected, CD11c⁺ DCs from LN of OVA sensitized mice displayed increased expression of the maturation molecules CD40 and CD80 compared to saline control mice (**Figure 3A**). In contrast, CD40 and CD80 expression on DCs was significantly lower in OVA immunized ST2-deficient mice compared to WT mice. MHC class II expression was similar in the two groups of mice (data not shown).

Cells isolated from total lymph nodes of WT or ST2-deficient mice were re-stimulated *in vitro* with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 48 hours to assess Th2 cytokines production. High levels of IL-4, IL-5 and IL-13 were found in cell culture supernatant from WT mice after OVA sensitization (**Figure 3B**). By contrast, IL-4, IL-5 and IL-13 levels were significantly reduced in cell culture supernatant from OVA-treated ST2-deficient mice compared to WT mice. INF γ levels were similar in cell culture supernatant from WT and ST2-deficient mice. These data suggest that IL-33/ST2 pathway is involved in Th2 cells priming by DCs *in vivo* after antigen exposure.

ST2-deficient mice develops attenuated allergic airway inflammation

Since we observed that DCs activation and Th2 cytokines were reduced in ST2-deficient mice after allergen sensitization, we next compared the immune response of WT and ST2-deficient mice after OVA sensitization and challenge. WT and ST2-deficient mice were sensitized twice with OVA in absence of aluminium adjuvant (alum) on day 0 and 7, and challenged intranasally with OVA on day 14, 15 and 16. Control mice received saline during antigen challenge. Twenty four hours after the last challenge, the severity of pulmonary inflammation was assessed. OVA sensitized and challenged WT mice showed a significant increase of allergic lung inflammation with eosinophil influx in the BAL and lung (**Figure 4A**), increased levels of IL-1 β , CCL5 (RANTES), CCL11 (eotaxin) and CCL17 in the lung (**Figure 4B**) and IL-5 in the BAL (**Figure 4C**). Serum OVA-specific IgE was also enhanced in WT mice challenged with OVA compared to saline mice (**Figure 4D**). By contrast, all these parameters were reduced in OVA sensitized and challenged ST2-deficient mice (**Figure 4A-D**). Histological analysis of the lung of asthmatic mice revealed peribronchial and perivascular cell infiltrations after OVA challenge, accompanied by goblet cells hyperplasia and mucus hypersecretion in WT mice (**Figure 4E**). ST2-deficient mice exhibited reduced lung pathology after antigen challenge, with less inflammatory cell infiltration and mucus secretion than in WT mice (**Figure 4F**).

Activation and migration of DCs are impaired in ST2-deficient mice

To determine whether DCs activation and migration were altered in ST2-deficient mice, we analyzed DCs phenotype in lung and mediastinal LN (mLN) twenty four hours after the last challenge. Absolute number of DCs was significantly enhanced in the lungs and in mLN of OVA-sensitized and challenged mice compared to saline challenged mice (**Figure 5A**). DCs number in the lung of ST2-deficient and WT mice was similar, indicating that innate immunity was not altered in the absence of ST2. However, CD40 and CD80 expression on lung DCs was significantly reduced in ST2-deficient mice after OVA challenge. Furthermore, DCs number was markedly reduced in mLN of ST2-deficient mice compared to WT mice (**Figure 5B**). CD40 and CD80 expression was also decreased in the absence of ST2. This indicates that in the absence of IL-33 signalling, activation of DCs is impaired in the lung leading to reduced migration into mLN.

To address the ability of DCs to induce a Th2 response in an antigen-specific manner, cells from mLN were ex vivo re-stimulated with OVA. Th2 cytokines were detected in culture supernatants after five days. Increased Th2 cytokines production was found in the supernatant of mLN cells from OVA sensitized and challenged WT mice. Supernatants of mLN cells from ST2-deficient mice showed a significant reduction of IL-4, IL-5 and IL-13 (**Figure 5C**). Collectively, these results demonstrated that Th2 cells response induced by DCs is impaired in ST2-deficient mice in allergic airway inflammation.

IL-33-activated and OVA-pulsed DCs enhance airway inflammation

To directly demonstrate the involvement of IL-33-activated DCs during antigen sensitization, we transferred OVA-pulsed DCs, pre-treated or not with IL-33 into naive recipient mice. The recipient mice were challenged with OVA ten days after cell transfer (at days 10-12) to induce allergic airway inflammation. Twenty four hours after the last challenge, the severity of inflammation was assessed. In mice receiving unpulsed DCs, few inflammatory cells were found in the BAL fluid after allergen challenge (**Figure 6A**). In contrast, in mice receiving OVA-pulsed DCs, a strong cellular recruitment of eosinophils occurred in the BAL. The EPO activity was significantly increased in lung homogenate of mice transferred with OVA pulsed-DCs treated with IL-33 as compared to mice transferred with control OVA-pulsed DCs (**Figure 6B**). The ex vivo treatment of OVA-pulsed DCs with IL-33 significantly increased the potential of these cells to induce eosinophilic airway inflammation in mice. These data demonstrate that IL-33 has the ability to significantly affect DC maturation, thereby leading to Th2 priming and allergic airway inflammation.

DISCUSSION

At the crossroad of innate and adaptive immunity, DCs have an important role in determining how allergic immune response are initiated and modulated. Located alongside epithelial cells in the skin and the airway, DCs have the ability to capture allergens and subsequently present them to naive lymphocytes in draining lymph nodes. The outcome of the DCs induced T-helper cell polarization depends of the type of antigen captured, the route of exposure and the microenvironment. Indeed, Hammad et al. has shown that epithelial cells release GM-CSF, TSLP, IL-25 and IL-33 within hours following house dust mite (HDM) administration [31]. These molecules activate DCs and profoundly affect the production of Th2 type cytokines by CD4⁺ T cells [32-36].

Here we report a critical role of IL-33 on DCs activation, maturation and capacity to initiate a Th2 mediated allergic inflammation. In vitro, we observed that IL-33 potently activates BMDCs to produce pro inflammatory cytokines IL-6, TNF, IL-1 β and the chemokine CCL17, but not IL-12p40 or IL-23p19 (data not shown). IL-6 and CCL17 production by DCs was related to T cells differentiation into Th2 type [7, 37, 38]. We also found that IL-33 treatment up-regulates cell surface expression of CD40, CD80 and OX40L on DCs. It has been shown that interaction between membrane OX40L on DCs with OX40 (CD134) on naive T cells results in the induction of IL-4 production by T cells followed by their subsequent polarization into Th2 subset [39, 40]. Taken together, these results suggest that IL-33 directly activates DCs to produce pro-Th2 cytokines/chemokines, and co-stimulatory surface molecules. It was reported that IL-33 upregulated MHC-II and CD86 expression on DCs [29]. We did not observe any change in the expression of these surface molecules. This discrepancy may be explained by technical differences in the approach such as the composition the medium or the purity of CD11c⁺.

In accordance with a previous report, we observed that IL-33-activated-DCs primed naive CD4⁺ T cells to produce pro-allergic cytokines IL-5 and IL-13, but no IL-4 [5]. Importantly, we found that naive CD4⁺ T cells did not respond to IL-33 in absence of DCs. This observation is consistent with the fact that naive T cells do not express ST2 and that IL-33 did not induce Th2 cytokines in non-polarized CD4⁺ T cells [10, 41, 42]. Cytokine expression pattern of T cells polarized by IL-33-activated DCs differs from classical Th2 cells by the absence of IL-4 production. An atypical Th2 subset upon IL-33 activation has been reported, which is independent of IL-4, GATA3 and TCR engagement [26, 29].

The contribution of IL-33 on asthma symptoms by its direct action on mast cells, basophils, eosinophils and Th2 cells has been well documented [20-25]. Recently, it has been shown that resolution of allergic inflammation and airway hyperresponsiveness is dependent on the disruption of the ST2/IL-33 pathway [8] and that IL-33 neutralizing antibodies treatment inhibits airway inflammation in mouse [43]. Using ST2 -deficient mice, we demonstrated here that IL-33 signalling is necessary upon antigen sensitization to mount an efficient Th2 response. ST2-deficient mice showed a reduced activation of DCs in lymph nodes after antigen sensitization. In vitro re-stimulation of LN cells from ST2-deficient mice displayed a reduced Th2 response, with a reduction of IL-4, IL-5 and IL-13 production in the supernatant. This indicates that Th2 cells priming by DCs is impaired in the absence of IL-33 signalling during sensitization phase and that IL-4 may in some extent also be dependent of IL-33.

As described in previous studies, ST2-deficient mice resulted in significantly attenuated allergic airway inflammation with a reduction of eosinophil recruitment in the BAL, associated with a decrease in pro inflammatory cytokines and chemokines compared to WT mice. Interestingly, we observed that cells from mLN of ST2-deficient mice produced less Th2 cytokines, IL-4, IL-5 and IL-13 after antigen in vitro restimulation than cells isolated from WT mice. This observation contrasts with Kurowska et al. study which showed that absence of IL-33 signalling does not affect IL-4 production [5, 44]. This discrepancy can be explained by the difference in the asthma protocols or the doses of antigen administrated during immunization [44-46]. Our model, using two sensitizations with low dose of OVA (10 µg/mouse) without adjuvant, followed by three OVA challenges (10 µg/mouse), seems to favour the development of classical Th2 cells which produce IL-4, IL-5 and IL-13, since we showed a reduction of all these cytokines in ST2-deficient mice.

We next found reduced DCs activation in the lung of ST2-deficient mice after OVA challenges compared to WT mice. Local administration of the antigen during challenge probably results in the release by epithelial cells of inflammatory molecules such as IL-33, which could modulate DCs functions in vivo. In the absence of ST2, lung DCs appear to be less activated than in WT mice. Interestingly, absolute numbers of DCs are similar in WT and ST2-deficient mice, indicating that DCs are normally present in the lung, but fail to up-regulate co-stimulatory molecules after antigen challenges. In contrast, a reduced number of DCs was found in mLN of ST2-deficient mice compared to WT mice. This finding suggests that in the absence IL-33 signalling, migration of lung DCs into mLN is impaired leading to a reduced Th2 response. DCs-transfer experiment confirmed that IL-33 increases the immunostimulatory properties of DCs since IL-33-treated DCs enhance lung

eosinophilic inflammation. Together, these data support the notion that IL-33 plays a critical role in the initiation of lung allergic inflammation through DCs activation.

In summary, our results reveal a novel role of IL-33 in enhancing DCs capacity to induce Th2 priming in the context of allergic airway inflammation. We provide evidence that IL-33 signalling plays a critical role in DCs maturation and functions upon antigen sensitization, as in established allergic asthma. The role of epithelial cells in the control of Th2 sensitization and asthma development is emerging. Further studies are required to define precisely how IL-33 and others alarmins regulate adaptive immunity by altering dendritic cell functions.

MATERIAL AND METHODS

Mice

Female BALB/C and ST2-deficient mice (8-10 weeks old) were bred in our specific pathogen free animal facility at CNRS (Orléans, France). ST2-deficient mice were originally provided by Andrew N.J. McKenzie (Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) [47]. Mice were maintained in a temperature controlled (23°C) facility with a strict 12h light/dark cycles and were given free access to food and water. Animal experiments were performed according to the French Institutional Committee.

Generation and stimulation of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)

Bone marrow cells from WT or ST2-deficient mice were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FCS (Hyclone), L-glutamine (2 μ M, Invitrogen), β -Mercaptoethanol (50 nM, Invitrogen), penicillin (100 U/ml, Invitrogen), streptomycin (100 μ g/ml, Invitrogen) and 5% of J558L cells supernatant (GM-CSF). On days 3, 6 and 8 the medium was refreshed and GM-CSF was added. At day 10, nonadherent cells were harvested. The purity of BMDCs was greater than 90%. At day 10, BMDCs were counted and plated in a round-bottomed 96-wells plate ($5 \cdot 10^6$ cells/well) and stimulated with increased doses of recombinant murin IL-33 (0.1, 1, 10 and 100 ng/ml, R&D systems). Culture supernatants were collected at 24 hours and analyzed by ELISA for IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23p19, IFN γ , TNF and CCL17. Cells were collected and stained for flow cytometry analysis as described below.

T cells proliferation assay

CD4⁺ T cells were purified from LN of DO11.10 mice (OVA-specific TCR transgenic mice) by CD4⁺ magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec) and stained with CFSE (Molecular Probe, Invitrogen). $2 \cdot 10^5$ CD4⁺ T cells were cocultured with $2 \cdot 10^4$ BMDCs (ratio 1/10) in a round-bottomed 96-wells plate in the presence of OVA peptide. BMDCs were previously treated or not with 10 ng/ml IL-33 during 24 hours and washed twice with PBS before the coculture. After 6 days of coculture T cells proliferation was assessed by flow cytometry.

DC/T cells coculture

CD4⁺ T cells were purified from lymph nodes of naive WT mice by CD4⁺ magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec). 2.10⁴ BMDCs were seeded in a round-bottomed 96-wells plate and cultured with 2.10⁵ CD4⁺ purified T cells in the presence of medium alone or IL-33. Wells with DCs alone or T cells alone served as controls. Supernatants were collected after 6 days of culture and assayed for IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 and IFN γ by ELISA.

OVA-induced allergic airway inflammation

Wild-type (WT) or ST2-deficient mice were subcutaneously sensitized on day 0 and 7 with 10 μ g of ovalbumin (OVA, grade V, Sigma-Aldrich) without alum adjuvant. On day 14, 15 and 16, mice were challenged intranasally with 10 μ g of OVA or saline. 24 hours after the last OVA exposure, mice were killed and BAL, lung and serum were collected. BAL fluid was analyzed for cellular composition and cytokine levels (see below flow cytometry staining). Half of the lung was stored at -80°C for EPO enzymes and cytokines/chemokines analysis, and the other half was fixed overnight in 4% formaldehyde solution for histological analysis. For some experiments, the whole lung were harvested and digested with DNase (1 mg/ml, Sigma) and Type IV collagenase (0,5 mg/ml, Gibco) during 45 minutes at 37°C. Mononuclear cells were isolated by centrifugation on discontinuous Percoll 35/70% gradient (Amersham, Biosciences) before flow cytometric analysis. Mediastinal lymph nodes were removed and crashed in 100 μ m cell strainers for FACS analysis or in vitro restimulation. To study the involvement of IL-33 during sensitization phase, mice were killed at day 14, prior allergen challenge, and lymph nodes (inguinal, brachial, axillary and mediastinal) were harvested and analyzed for cellular composition or cytokines production after 48 hours anti-CD3/anti-CD28 ex vivo restimulation. Experiments were performed at least twice using groups of six animals.

Allergic airway inflammation induced by intranasal transfer of OVA-pulsed BMDCs

BMDCs were pulsed overnight with OVA 10 μ g/ml (Grade V, Sigma) in the presence or absence of 10 ng/ml recombinant IL-33 (R&D systems). As control, BMDCs were cultured overnight with medium without OVA. After antigen pulse, non-adherent cells were collected, washed twice with PBS to remove OVA and IL-33, and resuspended in PBS. Naive recipient mice received intranasally 2.10⁶ unpulsed DCs, OVA-pulsed DCs or OVA-pulsed in the presence of IL-33 DCs. On day 10, 11 and 12, mice were challenged with 10 μ g OVA intranasally. Twenty-four hours after the last challenge, the intensity of the airway inflammation was assessed in the BAL and lung homogenate.

Flow cytometry staining

BAL cells were stained for 20 minutes with FITC-labelled anti-CD3/anti-B220 (lymphocytes), PE-labelled anti-Siglec F (eosinophils), PE-Cy7-labelled anti-GR1 (neutrophils), PERCP-labelled anti-CD11c and APC-labelled anti-MHC class II (macrophages/dendritic cells) antibodies in PBS containing 3% FCS and 0,01% azide. Differential cells counts were analyzed by flow cytometry as previously described [48]. For determination of DCs activation in lung or LN, cells suspensions were stained for 20 minutes with APC-labelled anti-CD80, PE-labelled anti-OX40L, PE-labelled anti-CD40, APC-labelled anti-CD80, FITC-labelled anti-MHC class II antibodies. Fluorescence was acquired on a BD CANTO II flow cytometer using DIVA software (BD Bioscience). Fluorescence data were analyzed using FlowJO software (Treestar).

Lung histology

Lungs were fixed overnight in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 3 µm lung sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) or with periodic acid Schiff reagent (PAS). Cell infiltration and mucus secretion were assessed by a semi-quantitative score (0-3) using a Leica microscope.

Pulmonary eosinophils peroxidase (EPO) activity

EPO activity was determined in order to estimate the recruitment of eosinophils to the lung parenchym. After BAL and perfusion, lungs were excised, stored frozen at -80°C, and homogenized for 30 seconds in 1 ml of 0.05 M Tris/HCl buffer pH 8.0. The homogenate was centrifuged for 15 minutes at 4°C at 10,000 x g. EPO activity in the supernatant was determined as estimated from the oxidation of O-phenylenediamine (OPD, Sigma-Aldrich) by EPO in the presence of hydrogen peroxide using the protocol by Van Oosterhout and colleagues [49]. The substrate solution consisted of 10 mM OPD in 0.05 M Tris/HCl-buffer (pH=8) and 4 mM H₂O₂ (BDH, Poole, UK). Substrate solution was added to samples in a 96-wells microplate (Greiner) and incubated at 37°C for 30 min. Duplicate incubations were carried out in the absence and presence of the EPO inhibitor 3-amino-1,2,4-triazole (AMT, 2 mmol/L, Sigma-Aldrich). The absorbance was then measured at 490 nm (Flow Labs, Irvine, UK). Results are expressed as OD 490 nm and were corrected for the activity of other peroxidases, which were not inhibited by AMT.

Cytokines, chemokines and OVA-specific IgE measurement

IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-23p19, IFNγ, TNFα, CCL5, CCL11, CCL17 were quantified using commercial ELISA kits from R&D systems. Serum anti-OVA IgE level was measured by ELISA

using anti-IgE (BD Pharmingen) as previously described [50]. Biotinylated OVA and HRP-conjugated streptavidin (Vector Labs) were used for detection.

Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ SEM. The difference between groups was calculated with a two-way ANOVA test using Prism software. A P-value less than 0,05 was considered to be significant. All experiments were repeated at least twice, with $n \geq 6$ animals in each experimental group.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Eddy Liew for critical reading and comments. We are grateful to the EFIS for financial support allowing a fruitful collaboration with Eddy Liew's group. This work was supported by the "Agence Nationale pour la Recherche" (ANR 2007 MIME-103-02), the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM allergy DAL 2007 0822007), the "Fond européen de développement régional" (FEDER Asthme 1575-32168).

REFERENCES

- 1 Shum, B. O., Rolph, M. S. and Sewell, W. A., Mechanisms in allergic airway inflammation - lessons from studies in the mouse. *Expert Rev Mol Med* 2008. 10: e15.
- 2 Nakajima, H. and Takatsu, K., Role of cytokines in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2007. 142: 265-273.
- 3 Finkelman, F. D., Hogan, S. P., Hershey, G. K., Rothenberg, M. E. and Wills-Karp, M., Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol*. 184: 1663-1674.
- 4 Hamid, Q. and Tulic, M., Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 2009. 71: 489-507.
- 5 Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R. C., Stolarski, B., Garcia, C. C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., McKenzie, A. N., Teixeira, M. M., Liew, F. Y. and Xu, D., IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 2008. 181: 4780-4790.
- 6 Prefontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A. J., Lemiere, C., Martin, J. G. and Hamid, Q., Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 2009. 183: 5094-5103.
- 7 Allakhverdi, Z., Comeau, M. R., Smith, D. E., Toy, D., Endam, L. M., Desrosiers, M., Liu, Y. J., Howie, K. J., Denburg, J. A., Gauvreau, G. M. and Delespesse, G., CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2009. 123: 472-478.
- 8 Kearley, J., Buckland, K. F., Mathie, S. A. and Lloyd, C. M., Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2009. 179: 772-781.
- 9 Smith, D. E., IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy*. 40: 200-208.
- 10 Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A., IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005. 23: 479-490.
- 11 Sims, J. E. and Smith, D. E., The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol*. 10: 89-102.
- 12 Cayrol, C. and Girard, J. P., The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. 106: 9021-9026.
- 13 Luthi, A. U., Cullen, S. P., McNeela, E. A., Duriez, P. J., Afonina, I. S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R. C., Kersse, K., Vandenabeele, P., Lavelle, E. C. and Martin, S. J., Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 2009. 31: 84-98.
- 14 Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., Shepherd, M., McSharry, C., McInnes, I. B., Xu, D. and Liew, F. Y., IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 2009. 183: 6469-6477.
- 15 Moussion, C., Ortega, N. and Girard, J. P., The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 2008. 3: e3331.
- 16 Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D. A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G. and Girard, J. P., IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104: 282-287.
- 17 Eigenbrod, T., Park, J. H., Harder, J., Iwakura, Y. and Nunez, G., Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* 2008. 181: 8194-8198.

- 18 Kazama, H., Ricci, J. E., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D. R. and Ferguson, T. A., Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity* 2008. 29: 21-32.
- 19 Scaffidi, P., Misteli, T. and Bianchi, M. E., Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002. 418: 191-195.
- 20 Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S. A., Kaempfer, S., Spiegel, N. and Dahinden, C. A., Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 2009. 113: 1526-1534.
- 21 Suzukawa, M., Iikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. and Yamaguchi, M., An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* 2008. 181: 5981-5989.
- 22 Ali, S., Huber, M., Kollewe, C., Bischoff, S. C., Falk, W. and Martin, M. U., IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104: 18660-18665.
- 23 Moulin, D., Donze, O., Talabot-Ayer, D., Mezin, F., Palmer, G. and Gabay, C., Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 2007. 40: 216-225.
- 24 Cherry, W. B., Yoon, J., Bartemes, K. R., Iijima, K. and Kita, H., A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2008. 121: 1484-1490.
- 25 Suzukawa, M., Koketsu, R., Iikura, M., Nakae, S., Matsumoto, K., Nagase, H., Saito, H., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K. and Yamaguchi, M., Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 2008. 88: 1245-1253.
- 26 Smithgall, M. D., Comeau, M. R., Yoon, B. R., Kaufman, D., Armitage, R. and Smith, D. E., IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 2008. 20: 1019-1030.
- 27 Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A. N., McInnes, I. B. and Liew, F. Y., IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 2007. 37: 2779-2786.
- 28 Turnquist, H. R. and Thomson, A. W., IL-33 broadens its repertoire to affect DC. *Eur J Immunol* 2009. 39: 3292-3295.
- 29 Rank, M. A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K. R., Squillace, D. L. and Kita, H., IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 2009. 123: 1047-1054.
- 30 Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Vos, N., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N., Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J Clin Invest* 2007. 117: 464-472.
- 31 Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M. A., Germain, R. N. and Lambrecht, B. N., House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 2009. 15: 410-416.
- 32 Cates, E. C., Fattouh, R., Wattie, J., Inman, M. D., Goncharova, S., Coyle, A. J., Gutierrez-Ramos, J. C. and Jordana, M., Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 2004. 173: 6384-6392.
- 33 Liu, Y. J., Thymic stromal lymphopoietin and OX40 ligand pathway in the initiation of dendritic cell-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2007. 120: 238-244; quiz 245-236.
- 34 Zhou, B., Comeau, M. R., De Smedt, T., Liggitt, H. D., Dahl, M. E., Lewis, D. B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D. J. and Ziegler, S. F., Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 2005. 6: 1047-1053.
- 35 Wang, Y. H. and Liu, Y. J., Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin Exp Allergy* 2009. 39: 798-806.
- 36 Humphreys, N. E., Xu, D., Hepworth, M. R., Liew, F. Y. and Grencis, R. K., IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* 2008. 180: 2443-2449.

- 37 Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. and Flavell, R. A., Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997. 185: 461-469.
- 38 Homey, B. and Zlotnik, A., Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol* 1999. 11: 626-634.
- 39 Hammad, H., Lambrecht, B. N., Pochard, P., Gosset, P., Marquillies, P., Tonnel, A. B. and Pestel, J., Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J Immunol* 2002. 169: 1524-1534.
- 40 Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G. J., Watanabe, N., Qin, F. X., Yao, Z., Cao, W. and Liu, Y. J., TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 2005. 202: 1213-1223.
- 41 Xu, D., Chan, W. L., Leung, B. P., Huang, F., Wheeler, R., Piedrafita, D., Robinson, J. H. and Liew, F. Y., Selective expression of a stable cell surface molecule on type 2 but not type 1 helper T cells. *J Exp Med* 1998. 187: 787-794.
- 42 Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J. and Nakanishi, K., Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 2008. 20: 791-800.
- 43 Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L. and Huang, T., Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009. 386: 181-185.
- 44 Hoshino, K., Kashiwamura, S., Kuribayashi, K., Kodama, T., Tsujimura, T., Nakanishi, K., Matsuyama, T., Takeda, K. and Akira, S., The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J Exp Med* 1999. 190: 1541-1548.
- 45 Coyle, A. J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., Lin, S., Poisson, L., Meisel, C., Kamradt, T., Bjerke, T., Levinson, D. and Gutierrez-Ramos, J. C., Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* 1999. 190: 895-902.
- 46 Mangan, N. E., Dasvarma, A., McKenzie, A. N. and Fallon, P. G., T1/ST2 expression on Th2 cells negatively regulates allergic pulmonary inflammation. *Eur J Immunol* 2007. 37: 1302-1312.
- 47 Townsend, M. J., Fallon, P. G., Matthews, D. J., Jolin, H. E. and McKenzie, A. N., T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 2000. 191: 1069-1076.
- 48 van Rijt, L. S., Kuipers, H., Vos, N., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N., A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *J Immunol Methods* 2004. 288: 111-121.
- 49 Van Oosterhout, A. J., Hofstra, C. L., Shields, R., Chan, B., Van Ark, I., Jardieu, P. M. and Nijkamp, F. P., Murine CTLA4-IgG treatment inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness and attenuates IgE upregulation in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997. 17: 386-392.
- 50 Woerly, G., Honda, K., Loyens, M., Papin, J. P., Auwerx, J., Staels, B., Capron, M. and Dombrowicz, D., Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma down-regulate allergic inflammation and eosinophil activation. *J Exp Med* 2003. 198: 411-421.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: IL-33 activates BMDCs *in vitro* through ST2 receptor.

BMDCs from WT or ST2-deficient mice were cultured 24 hours with medium or recombinant murine IL-33 (0,1 to 100 ng/ml). **(A)** Supernatants were analyzed for cytokines and chemokines by ELISA. **(B)** Mean intensity of fluorescence (MFI) of CD40, CD80 and OX40L were examined by flow cytometry on BMDCs after 24 hours medium or IL-33 stimulation. Data are presented as mean $\pm$ SEM and are representative of three independent experiments. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant

Figure 2: IL-33-activated DCs promote T-cells proliferation and Th2 polarization of naive CD4+ T cells.

(A) CD4+ T cells purified from naive DO11.10 mice were labelled with CFSE and cocultured with untreated or IL-33-treated DCs at a ratio of 1:10 (T cells:DCs) in the presence of OVA peptide (5 μ g/ml). T cells proliferation was analyzed after 6 days of coculture by flow cytometry. Data are representative of two independent experiments (n = 5). **(B)** CD4+ T-cells extracted from naive WT mice were cocultured with DCs with increased doses of recombinant murine IL-33. The production of IL-5 and IL-13 was determined by ELISA in the supernatant after 6 days of coculture. Data are presented as mean $\pm$ SEM and are representative of two independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant

Figure 3: Reduced activation of DCs in ST2-deficient mice in LN after OVA sensitization

(A) WT or ST2-deficient mice were twice immunized with 10 μ g OVA or saline at day 0 and 7. CD11c+ cells from lymph nodes were analyzed for CD40 and CD80 at day 14 by flow cytometry. Data are presented as the mean $\pm$ SEM of MFI (n = 6). **(B)** Cells from lymph nodes are *in vitro* restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for 48 hours at 5.10⁶ cells/ml. Cytokine expression levels were analyzed in the supernatants by ELISA. * $P \leq 0.05$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant

Figure 4: ST2-deficient mice developed attenuated allergic airway inflammation

OVA sensitized WT and ST2-deficient mice were challenged three times with OVA instillation. **(A)** 24 hours after the third challenge, eosinophil numbers were determined in the BAL and in lung tissues (EPO activity). **(B, C)** Cytokines and chemokines levels were measured by ELISA in lung homogenate or BAL. **(D)** OVA-specific IgE concentrations were assayed in sera by ELISA. **(E)** Lung sections from saline or OVA challenged mice were stained for hematoxylin/eosin (HE) or for periodic acid Schiff (PAS). Representative section of each group is shown. **(F)** The extent of cell infiltrate and mucus

hypersecretion was scored by two independent observers (0–3). Data are presented as mean $\pm$ SEM of 6 mice per group and are representative of at least 3 experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant

Figure 5: DCs activation and migration to draining lymph nodes are reduced in ST2-deficient mice

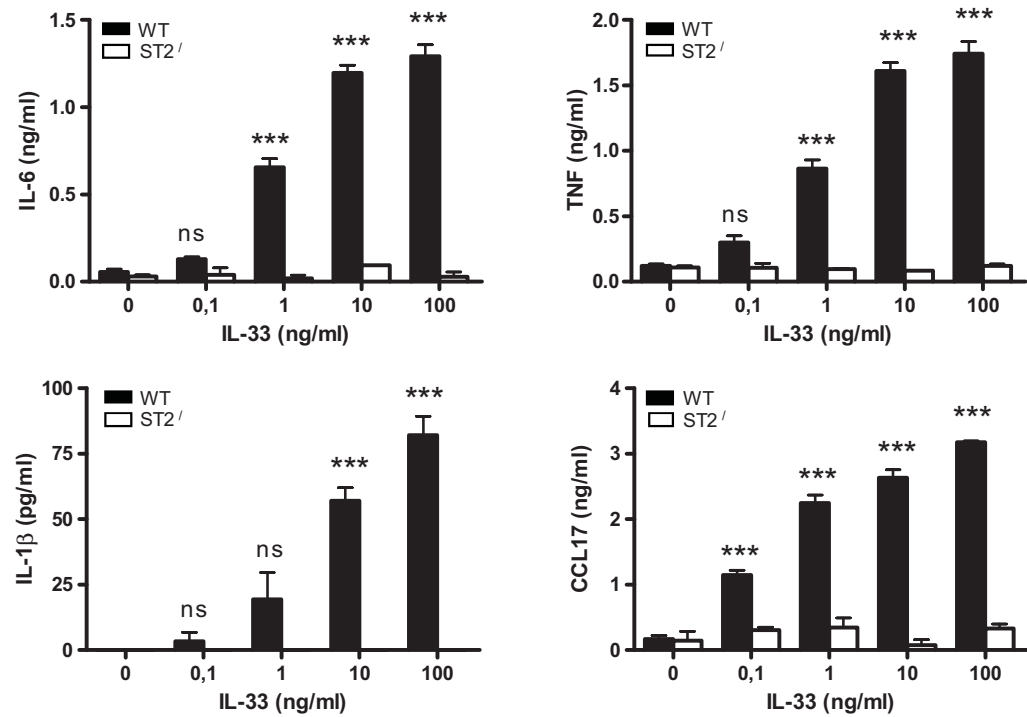
Lungs from OVA sensitized and challenged WT and ST2-deficient mice were digested with DNase/collagenase. Lung mononuclear cells **(A)** and mediastinal lymph node cells **(B)** were stained for extracellular FACS analysis. Absolute numbers of CD11b⁺ CD11c⁺ cells and MFI of CD40, CD80 and MHC-II are shown. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 6 mice per group. **(C)** Cells from mediastinal lymph nodes of OVA sensitized and challenged mice were in vitro restimulated with OVA for 5 days ($5 \cdot 10^6$ cells/ml). Cytokine expression levels were analyzed in the supernatants by ELISA. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 6 mice per group and are representative of 3 independent experiments. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; ns, not significant

Figure 6: IL-33 enhances allergic airway inflammation induced by OVA-pulsed DC

On day 0, naive BALB/c mice were injected intranasally with $2 \cdot 10^6$ unpulsed DCs, OVA-pulsed DCs or OVA-pulsed DCs in the presence of IL-33. From day 10 to 12, mice were intranasally challenged with OVA. Twenty four hours after the last challenge, the severity of the airway inflammation was evaluated. **(A)** BAL was subjected to total differential cell counts. **(B)**, The EPO activity was quantified in lung homogenate. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 8 mice per group. * $P \leq 0.05$; ns, not significant.

Figure 1

A



B

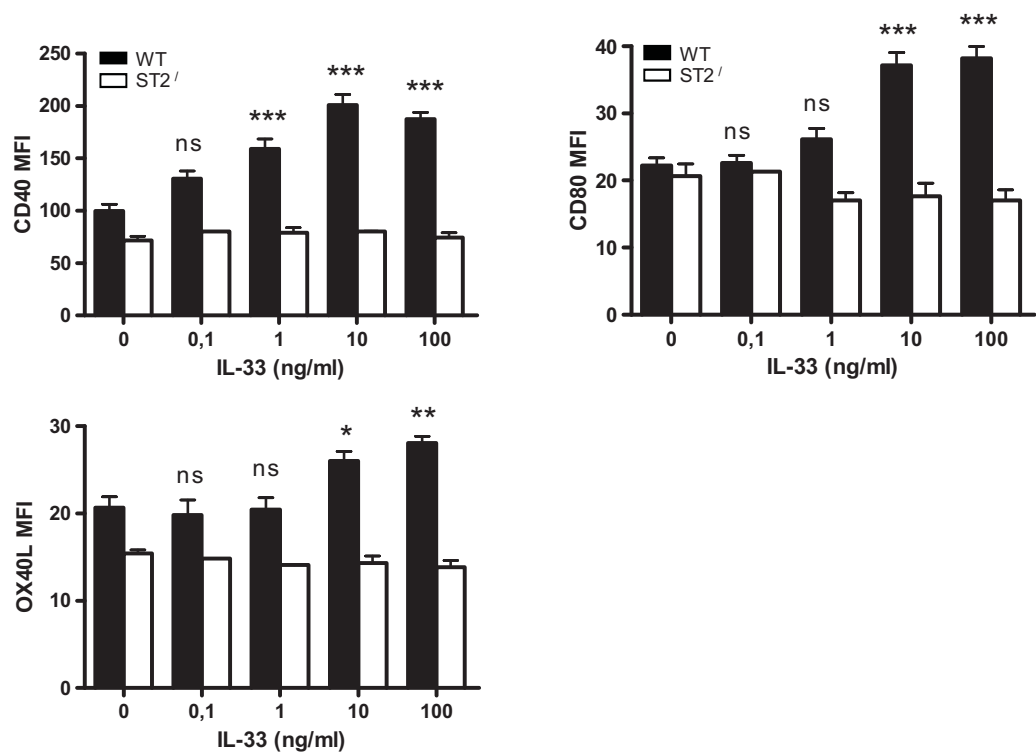


Figure 2

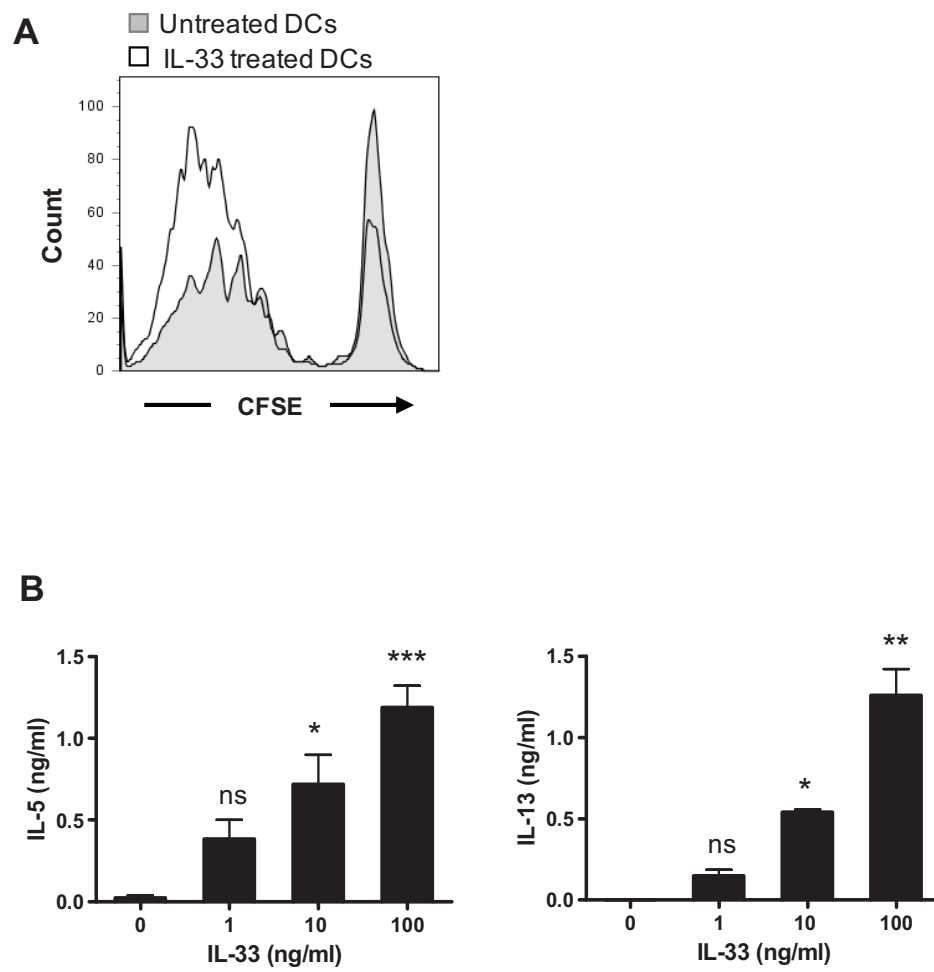


Figure 3

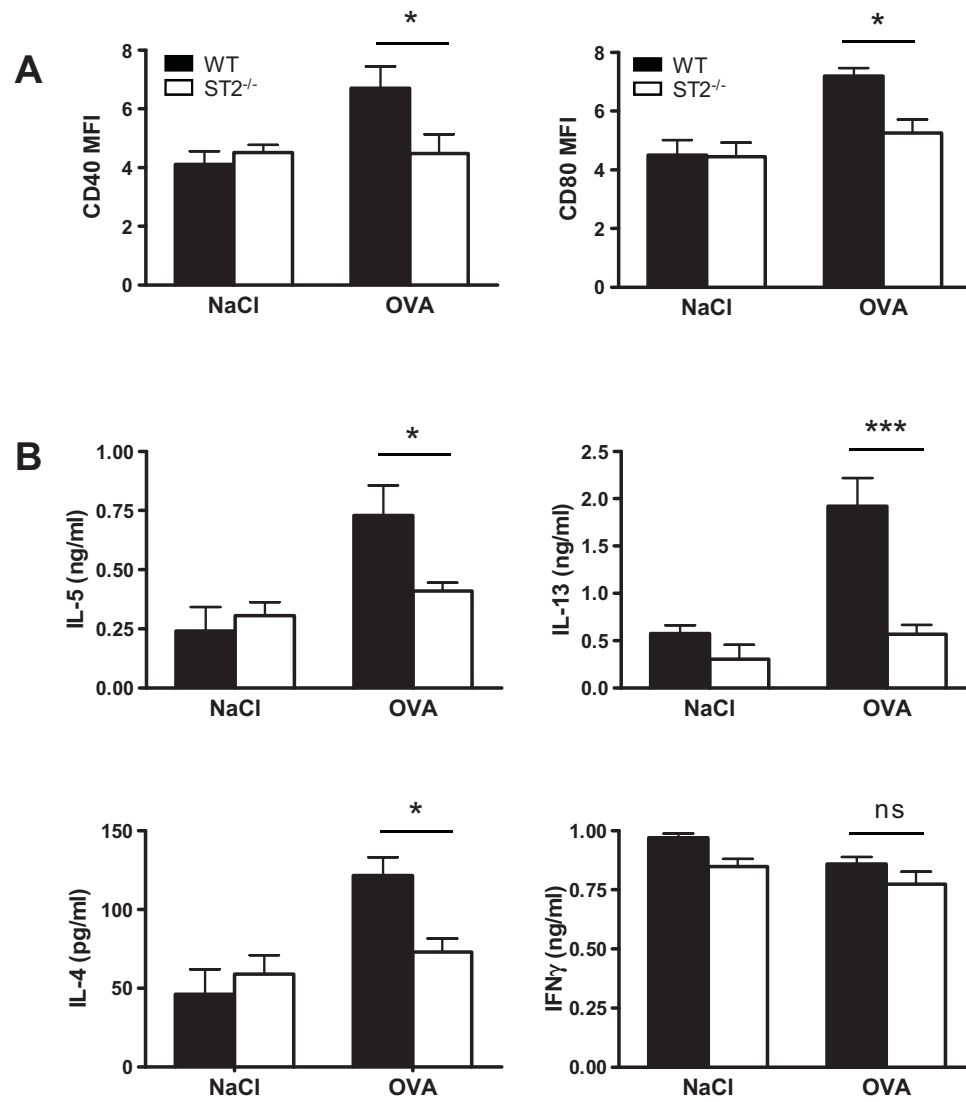


Figure 4

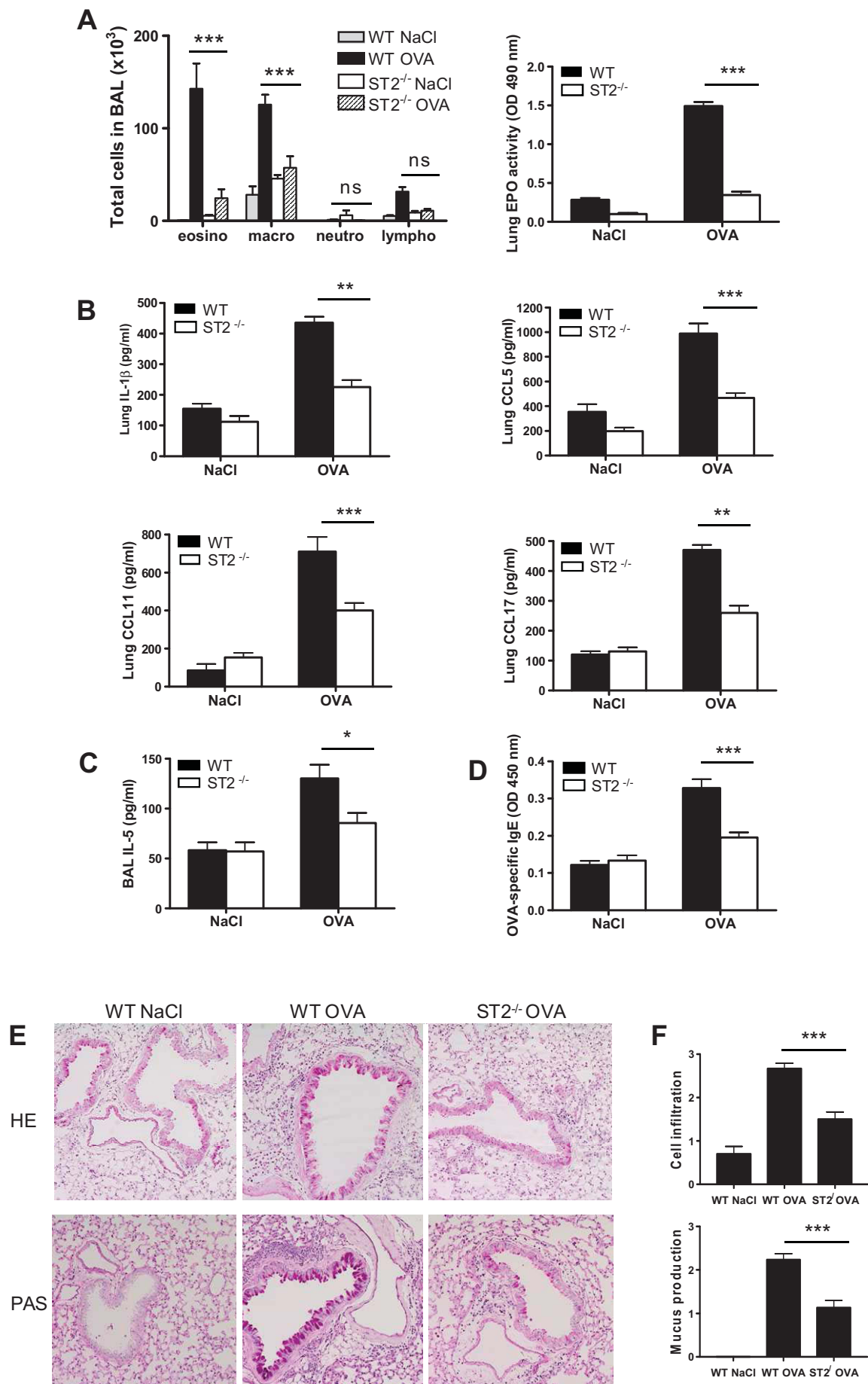


Figure 5

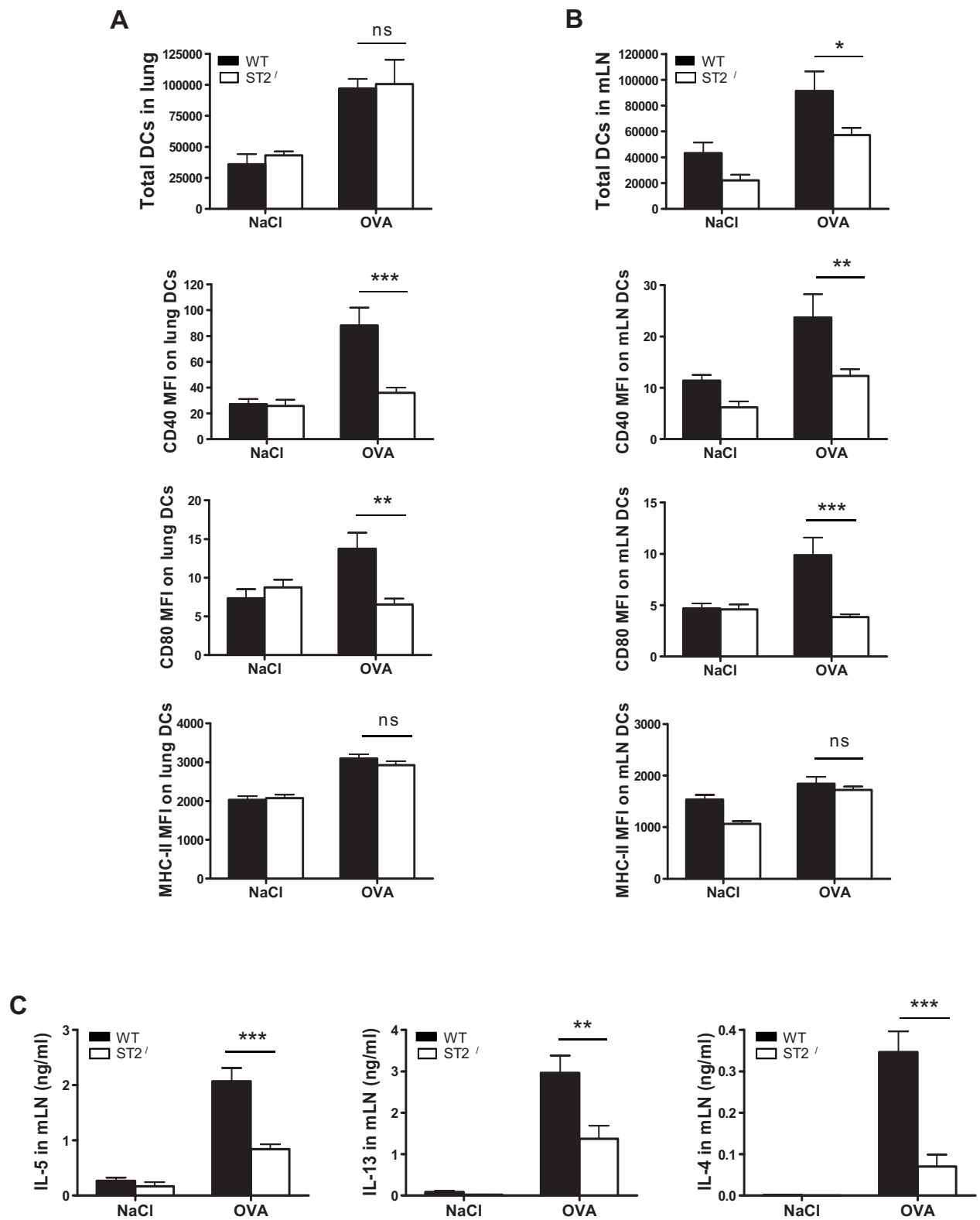
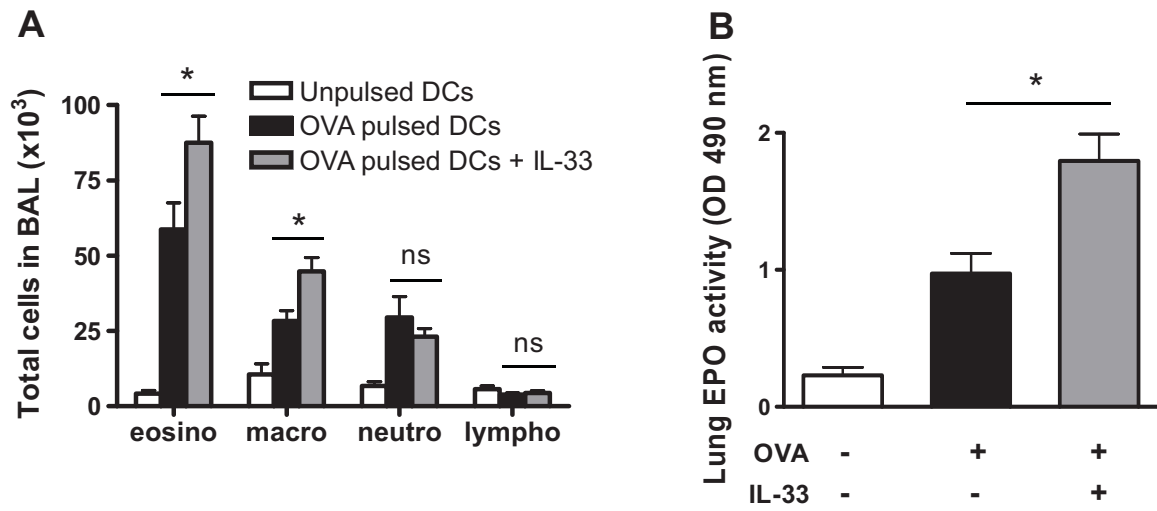


Figure 6



Discussion article 3

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans l'induction de l'immunité adaptative en réponse aux pathogènes ou aux pneumallergènes. Grâce à leur nombreux récepteurs cytokiniques et récepteurs de l'immunité innée, les cellules dendritiques peuvent percevoir une multitude de signaux de l'environnement et déclencher ou non une réponse adaptative spécifique.

En plus de leur rôle de barrière physique avec l'extérieur, on sait aujourd'hui que les cellules épithéliales participent à l'induction des réponses immunes en libérant des molécules pro-inflammatoires comme le TSLP, l'IL-25, l'IL-33, le GM-CSF et la chimiokine CCL20 (Hammad et al., 2009; Humphreys et al., 2008).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux effets de l'IL-33 sur les cellules dendritiques dans la mise en place d'une réponse Th2 dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique induit par l'ovalbumine.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence dans des études *in vitro*, que l'IL-33 activait la production d'IL-6, d'IL-1 β , de TNF et de CCL17 par les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse de souris sauvages. L'analyse cytométrique des cellules a révélé une sur-expression des molécules de co-stimulation CD40, CD80 et OX40L par les cellules dendritiques traitées à l'IL-33. Il est bien établi que la production d'IL-6 et de CCL17 favorise une polarisation Th2 des cellules T naïves (Allakhverdi et al., 2007; Homey and Zlotnik, 1999; Rincon et al., 1997) tout comme l'expression de OX40L (Hammad et al., 2002; Ito et al., 2005).

La co-culture de cellules dendritiques avec des cellules CD4⁺ issues de souris naïves, en présence d'IL-33, induit effectivement une polarisation Th2 des cellules T avec une production accrue d'IL-5 et d'IL-13 mais pas d'IL-4. Il est important de noter qu'en absence de cellules dendritiques, l'IL-33 n'a pas d'effet sur les lymphocytes CD4⁺ naïfs. Ces dernières n'expriment pas le récepteur ST2, l'effet observé intervient via les molécules solubles sécrétées par les cellules dendritiques ou par un contact direct entre les deux types cellulaires (interaction OX40L/OX40 par exemple). Après activation par les cellules dendritiques, il est probable que les cellules T différenciées expriment le récepteur ST2 et répondent alors directement à l'IL-33 présente dans le milieu.

Ces résultats sont à mettre en relation avec de précédentes études qui montraient que l'IL-33 induisait chez les Th2 une production d'IL-5 et d'IL-13, indépendamment de l'IL-4 et de la stimulation antigénique (Kondo et al., 2008; Kurowska-Stolarska et al., 2008; Rank et al., 2009). L'équipe de Kurowska a montré en 2008 que les cellules T générées en présence d'IL-33 produisaient l'IL-5 et l'IL-13 par un mécanisme indépendant de l'IL-4R, de GATA3 et de STAT6, mais impliquant plutôt la voie IL-1R/TLR, via MYD88 et NF κ B (Kurowska-Stolarska et al., 2008). Il existerait donc deux voies distinctes pour la génération des lymphocytes Th2 : une voie dépendante de l'IL-4 et une voie

dépendante de l'IL-33. Ces deux voies seraient nécessaires à la mise en place d'une réponse Th2 optimale puisque cette réponse est réduite chez les souris déficiente en IL-4 ou en ST2 (Kopf et al., 1993; Lohning et al., 1998). Ceci expliquerait également le fait que malgré le rôle crucial du récepteur ST2 dans la polarisation Th2 *in vitro*, il n'est pas indispensable à la génération des réponses Th2 *in vivo* (Coyle et al., 1999; Hoshino et al., 1999; Townsend et al., 2000). De même, dans des modèles murins d'infections par des helminthes ou le RSV, la neutralisation du récepteur ST2 ou l'utilisation de souris déficientes pour ce récepteur réduit la production d'IL-5 sans affecter la production d'IL-4 (Hoshino et al., 1999; Walzl et al., 2001).

Chez l'Homme, on trouve des populations de lymphocytes Th2 présentant des profils d'expression cytokiniques variables (28% de Th2 co-exprimant l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, et 40% de Th2 n'exprimant que l'IL-5 et l'IL-13) (Cousins et al., 2002). Le second profil d'expression serait majoritaire chez les patients atteints de sinusite chronique (Anand et al., 2006; Sauter et al., 2008) et d'œsophagite éosinophilique (Yamazaki et al., 2006). Cependant, l'existence et le rôle de ces populations dans l'asthme allergique ne sont à ce jour pas relatés dans la littérature scientifique.

Au cours de notre étude, l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur ST2 a révélé l'importance de la voie IL-33/ST2 dans la phase d'immunisation à l'allergène. En effet, les souris déficientes pour ce récepteur présentent une diminution de l'activation des cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques après deux immunisations en sous-cutané avec l'ovalbumine. De plus, les cellules issues des ganglions de souris déficientes pour ST2 produisent moins d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 que des cellules issues de souris sauvages, indiquant que l'induction de la réponse Th2 par les cellules dendritiques est compromise en absence de la voie de signalisation IL-33/ST2.

La diminution de la production d'IL-4 par les cellules issues des souris déficientes pour ST2 immunisées avec l'allergène suggère que la voie d'activation classique des Th2 serait également perturbée en absence du récepteur ST2.

En ce qui concerne l'asthme allergique, la contribution de l'IL-33 à l'activation des mastocytes, basophiles, éosinophiles et lymphocytes Th2 est bien documentée. En revanche, aucune étude ne mentionne un effet de l'IL-33 sur les cellules dendritiques dans cette pathologie. On sait pourtant que ces cellules sont primordiales non seulement au cours de la phase d'immunisation à l'allergène, mais aussi au cours de la phase effectrice. Il a été montré que le nombre de cellules dendritiques dans le tissu interstitiel pulmonaire augmente chez la souris après immunisation et provocation à l'allergène (Beaty et al., 2007; van Rijt et al., 2002).

L'administration répétée d'ovalbumine contaminée par de faibles doses de LPS au moment des challenges entraîne probablement une production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules

épithéliales bronchiques et notamment l'IL-33, qui peut alors moduler les fonctions des cellules dendritiques pulmonaires. Nos résultats montrent que les cellules dendritiques pulmonaires sont moins activées chez les souris déficientes pour le récepteur ST2 que chez les souris sauvages après immunisation et challenge à l'ovalbumine. Par ailleurs, la capacité de migration de ces cellules vers les ganglions lymphatiques drainants est diminuée en absence du récepteur ST2.

Afin de confirmer que l'IL-33 est responsable de l'induction de la réponse Th2 par les cellules dendritiques, nous avons transféré des cellules dendritiques chargées à l'ovalbumine et traitées ou non avec l'IL-33, à des souris sauvages naïves. Après provocation allergénique, les souris ayant reçu les cellules dendritiques traitées à l'IL-33 développent une inflammation pulmonaire allergique supérieure aux souris ayant reçu des cellules non traitées. Ces résultats renforcent l'idée que l'IL-33 participerait à l'initiation de la réponse allergénique en activant les cellules dendritiques.

En résumé, ce travail a permis de caractériser *in vitro* et *in vivo*, une nouvelle fonction de l'IL-33 dans l'inflammation pulmonaire allergique. Nous montrons ici pour la première fois que la voie de signalisation IL-33/ST2 joue un rôle critique dans la maturation et les fonctions des cellules dendritiques au cours d'une immunisation à un allergène et pendant la phase effectrice. Le rôle des cellules épithéliales dans le contrôle de la réponse immune et le développement de l'asthme allergique émerge peu à peu. D'autres études seront nécessaires pour définir précisément comment l'IL-33 et les autres « alarmines » régulent les réponses innées et adaptatives.

Maturation et sécrétion de l'IL-33

Malgré les innombrables travaux publiés au cours des derniers mois, de nombreuses zones d'ombres persistent au sujet de l'IL-33, notamment au sujet de sa localisation cellulaire ou de son mode de sécrétion.

L'IL-33 est exprimée constitutivement dans de multiples organes et types cellulaires chez l'Homme et la souris, principalement dans les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales. En absence de stimulus, l'IL-33 est localisée dans le noyau sous sa forme active (non clivée). En revanche, en cas de dommages ou de nécrose tissulaire, elle est libérée dans le milieu extracellulaire sous cette forme, et peut alors exercer son activité de cytokine pro-inflammatoire.

Contrairement à d'autres membres de la famille de l'IL-1, le site de clivage de l'IL-33 se situe dans le domaine "IL-1-like", et le clivage de l'IL-33 par les caspases apoptotiques (caspases-1, -3 et 7 et calpaïne) inactive la cytokine (Cayrol and Girard, 2009; Hayakawa et al., 2009; Luthi et al., 2009; Talabot-Ayer et al., 2009). Il est vraisemblable que l'IL-33 sous sa forme active agisse comme une alarmine en cas de dommages ou de nécroses tissulaires, afin d'alerter localement les cellules

immunitaires. Des fonctions similaires ont été décrites pour la cytokine IL-1 α et la molécule HMGB1 (Bianchi, 2007; Eigenbrod et al., 2008; Klune et al., 2008). Au contraire, lors de mort cellulaire programmée (apoptose), l'activation des caspases apoptotiques entraîne l'inactivation de l'IL-33 afin d'éviter d'induire une inflammation inutile.

Dans notre modèle d'inflammation pulmonaire allergique induite par l'ovalbumine, nous avons observé une forte induction de l'IL-33 dans les poumons (Figure 18). La présence d'IL-33 dans le cytoplasme des macrophages et cellules dendritiques activés suggère une induction de cette cytokine en cas d'inflammation.

Par ailleurs, la façon dont l'IL-33 est sécrétée par ces cellules est mal connue. En effet, l'IL-33 ne possède pas de peptide signal et ne peut donc pas être sécrétée par la voie classique du réticulum endoplasmique (Schmitz et al., 2005). Au même titre que l'IL-1 α et HMGB1, l'IL-33 pourrait être sécrétée via des exosomes après fusion avec la membrane plasmique (Haraldsen et al., 2009) ou alors être transloquée jusqu'à la membrane plasmique par la caspase-1 activée, facilitant ensuite sa sécrétion (Keller et al., 2008).

Au fil des années, l'IL-33 s'est révélée être une cytokine complexe pouvant jouer le rôle d'alarmine sous sa forme nucléaire, ou de cytokine pro-inflammatoire après sécrétion. Bien qu'activant essentiellement la réponse Th2, la voie IL-33/ST2 peut dans certains cas favoriser le développement des réponses Th1 via les cellules NK et NKT (Bourgeois et al., 2009; Smithgall et al., 2008). Son implication dans les pathologies diverses comme les infections virales ou parasitaires, les maladies auto-immunes, les allergies, les maladies cardio-vasculaires ou du système nerveux central, et sa capacité à activer les cellules de l'immunité innée et adaptative font de cette cytokine une des plus complexe à ce jour.

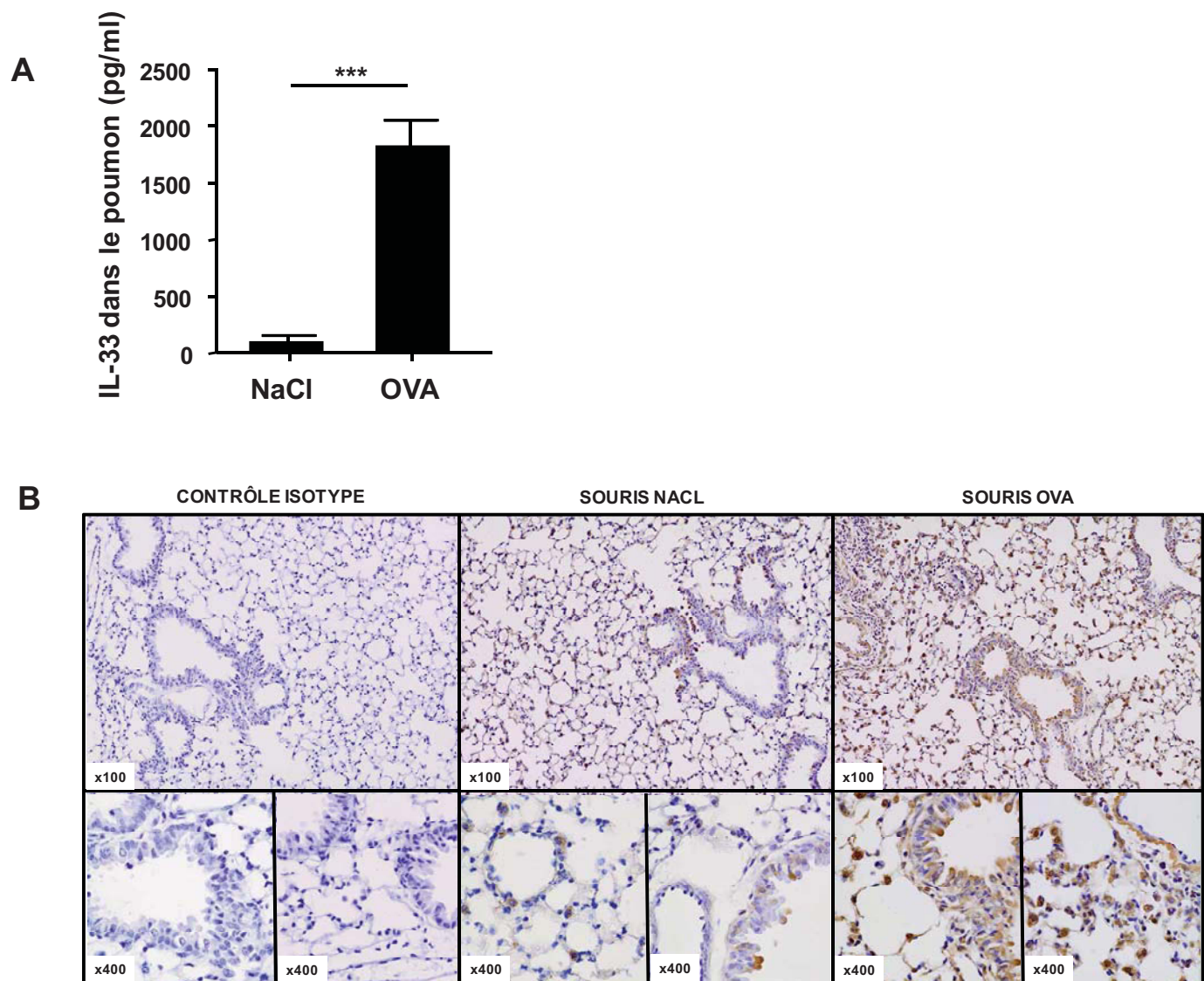


Figure 18 : Induction de l'IL-33 dans les poumons des souris asthmatiques. Vingt-quatre heures après la dernière provocation allergénique, les poumons des souris contrôles NaCl et OVA sont prélevés en vue d'analyses biochimiques et histologiques. (A) Dosage par ELISA de l'IL-33 contenue dans le surnageant de broyat de poumons (kit Duoset mIL-33, R&D systems). (B) Marquages immuno-histochimiques de l'IL-33 sur des coupes de poumons, préalablement fixés au paraformaldehyde, puis inclus en paraffine (goat anti mouse-IL-33, R&D systems). Ces marquages ont été réalisés lors d'un stage dans l'équipe du Professeur Eddy Liew à l'université de Glasgow, avec l'assistance du Docteur Mirchandani.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE

L'asthme allergique est une pathologie chronique des voies respiratoires entraînant des épisodes de toux, des difficultés respiratoires et des sifflements. Au niveau immunologique, l'asthme se caractérise par un recrutement massif d'éosinophiles et de lymphocytes CD4+ au niveau des voies aériennes, accompagné d'une forte production d'IgE spécifiques de l'allergène. La corrélation entre l'éosinophilie et la présence de lymphocytes Th2 dans les poumons d'individus asthmatiques est bien établie, tout comme l'implication des cytokines Th2, telles l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13, dans l'induction et l'amplification de l'inflammation pulmonaire allergique. Au cours de la dernière décennie, les connaissances sur l'asthme ont considérablement évoluées, et on sait aujourd'hui qu'il s'agit d'une pathologie complexe faisant intervenir les lymphocytes Th1, Th2, Th17, et les cellules NKT. De plus, un rôle critique de l'immunité mucoale a été mis en évidence dans la reconnaissance des molécules inhalées et la génération de l'inflammation pulmonaire. L'utilisation d'inhibiteurs, d'anticorps ou encore d'animaux génétiquement modifiés permet d'étudier individuellement les protagonistes de cette immense mise en scène et de comprendre progressivement les mécanismes physiologiques et immunologiques de l'asthme.

Mon principal travail de thèse s'inscrit dans un projet plus vaste entrepris au laboratoire il y a plusieurs années, et visant à caractériser le rôle des lymphocytes Th17 dans différents modèles de pathologies. De nombreux travaux ont démontré l'implication de cette population dans les maladies inflammatoires, et notamment dans les maladies auto-immunes.

Une première étude réalisée à l'Institut avait permis de caractériser le rôle de l'IL-17A au cours de l'asthme allergique chez la souris. Ici, je me suis intéressée au rôle d'une autre cytokine Th17 : l'IL-22. Les fonctions de l'IL-22 étaient jusqu'alors très peu décrites dans la littérature. Différentes études réalisées chez la souris avaient montré que l'IL-22 exerçait un rôle protecteur et régénérateur tissulaire dans certaines infections bactériennes (Aujla et al., 2008; Liang et al., 2006; Pickert et al., 2009; Zenewicz et al., 2008; Zheng et al., 2008), mais serait pro-inflammatoire dans des pathologies du système immunitaire tels le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou les maladies inflammatoires intestinales (Geboes et al., 2009; Ma et al., 2008; Munoz et al., 2009; Zheng et al., 2007).

Notre étude a mis en évidence un double rôle de l'IL-22 dans l'asthme allergique. En effet, nous avons montré qu'elle était importante aussi bien dans l'induction de la pathologie, que dans la régulation négative de l'inflammation pulmonaire au moment des provocations allergéniques. Nous avons également découvert que l'effet régulateur de l'IL-22 dépendait en partie de l'IL-17.

Dans notre modèle, l'IL-17 et l'IL-22 sont majoritairement produites par les lymphocytes Th17, bien que quelques études mentionnent une production d'IL-17 et/ou d'IL-22 par les cellules $\gamma\delta$ et les iNKT (Simonian et al., 2010; Leite-de-Moraes et al., résultats non publiés).

Bien que l'IL-17 et l'IL-22 se partagent certaines fonctions dans l'asthme allergique, leurs mécanismes d'action sont distincts. En effet, le récepteur IL-17RA est préférentiellement exprimés par les cellules d'origine hématopoïétique, alors que le récepteur IL-22R est exclusivement exprimé par les cellules non immunitaires. De ce fait, les modes d'action de ces deux cytokines sont radicalement différents. Cependant, il n'est pas exclu que ces cytokines puissent agir en coopération pour réguler ou exacerber certains processus inflammatoires. Ceci expliquerait pourquoi l'IL-22 peut exercer des effets différents en fonction de la disponibilité en IL-17 (Sonnenberg et al., 2010). L'expression différentielle de ces deux cytokines pourrait expliquer les fonctions antagonistes de l'IL-22 dans les différentes pathologies étudiées. De nouvelles expériences seront nécessaires pour comprendre précisément le lien entre ces deux cytokines dans les pathologies impliquant les Th17.

Chez l'Homme, la différenciation des lymphocytes Th17 est dépendante de l'IL-1 β , l'IL-6 et de l'IL-23 (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Burgler et al., 2009). Les études réalisées chez la souris indiquent que l'IL-1 β n'est pas nécessaire à la polarisation des Th17, mais potentialise la production d'IL-17A (Nakae et al., 2003b; Sutton et al., 2006). Nakae et collègues ont montré que les cellules présentatrices d'antigènes pouvaient orienter la différenciation Th17 par la production d'IL-1 β et par l'induction de l'expression de la molécule OX40 à la surface des cellules T (Nakae et al., 2001). Plus récemment, ce même groupe a mis en évidence un rôle décisif de l'IL-1 β dans l'induction des Th17 dans un modèle d'arthrite chez la souris (Nakae et al., 2003c). Les cellules Th17 étant essentielles dans l'induction de l'asthme, l'étude des facteurs favorisant la polarisation Th17 tel l'IL-1 β est donc importante. De plus, il a été montré que l'IL-1 β et son isoforme l'IL-1 α pouvaient dans certains modèles expérimentaux contribuer à la génération des réponses Th2 et favorisaient la croissance des cellules B. La production d'IL-1 β étant dépendante de l'activation de la caspase-1 par l'inflammasome, nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'inflammasome NLRP3 et à la voie de signalisation IL-1R/IL-1 dans l'asthme allergique. La plupart des études entreprises dans ce but utilisaient des modèles expérimentaux d'inflammation pulmonaire allergique induit par l'ovalbumine en présence d'hydroxyde d'aluminium. Or, cet adjuvant est connu pour être un activateur de l'inflammasome (Kool et al., 2008b). En utilisant un modèle moins agressif et plus physiologique d'inflammation induite par immunisation à l'ovalbumine sans adjuvant, nous avons constaté l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans la production d'IL-1 β et la génération d'une réponse Th2 allergique. De plus, nous avons observé une importante réduction de l'inflammation pulmonaire chez les souris

déficientes en IL-1R1, IL-1 α ou en IL- β comparativement aux souris sauvages après immunisation et provocation allergénique.

L'intervention de la voie IL-1R/IL-1 et l'effet amplificateur de l'IL-1 β sur les Th17 pourraient expliquer, du moins en partie, le lien entre les infections respiratoires et la recrudescence de l'asthme chez les patients. En effet, après inhalation, les pathogènes d'origine virale ou bactérienne sont reconnus au niveau des voies aériennes par les cellules présentatrices d'antigènes alvéolaires et par les cellules épithéliales bronchiques qui s'activent et produisent alors des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires. En réponse à ces pathogènes, les macrophages et les cellules dendritiques produisent de l'IL-1 β et de l'IL-23, (Sallusto and Baggiolini, 2008) qui favorisent la polarisation Th17. Or, notre étude montre que l'IL-17 et l'IL-22, les principales cytokines produites par les Th17, participent à l'induction de la réponse inflammatoire pulmonaire. De nouvelles investigations seront nécessaires pour comprendre avec précision si les Th17 sont responsables de l'exacerbation de l'asthme en cas d'infections respiratoires.

La reconnaissance des pathogènes ou des molécules présentant une activité enzymatique par les cellules épithéliales bronchiques entraîne la production d'IL-25, d'IL-33 et de TSLP, qui contribuent à la mise en place de la réponse allergique. Dans le but d'éclaircir les mécanismes d'action de ces alarmines, nous nous sommes intéressés au rôle de l'IL-33 dans la phase d'immunisation, puis au cours des provocations allergéniques.

Notre étude a révélée un rôle, jusqu'alors inconnu, de l'IL-33 sur les cellules dendritiques. En effet, nous montrons que l'IL-33 est un puissant activateur des cellules dendritiques et oriente la polarisation vers le type 2 via la production d'IL-6 et de CCL17 et par l'expression de la molécule OX40L. Nous avons également constaté une réduction de l'activation des cellules dendritiques au cours de l'immunisation à l'ovalbumine chez les souris déficientes pour le récepteur ST2. De plus, le transfert de cellules dendritiques préalablement traitées avec l'IL-33 exacerbe le recrutement des éosinophiles dans les poumons des souris après provocation allergénique. Ces résultats prouvent que la production d'IL-33 par les cellules structurales peut contribuer de façon précoce à l'induction de la réponse Th2, via l'activation des cellules dendritiques.

L'étude de l'IL-22, de l'axe IL-1R1/IL-1 et de l'IL-33 m'a permis d'aborder différents aspects de la réponse immune dans l'asthme allergique. Mes travaux apportent de nouveaux éléments de compréhension de cette pathologie qui viendront s'ajouter (ou se confronter) aux connaissances actuelles. Il est important de noter que ces résultats ont été obtenus dans un modèle expérimental reproduisant artificiellement l'asthme chez la souris. Les animaux utilisés, de génotypes sauvages ou transgéniques, étaient congéniques, de même âge et étaient élevés dans des conditions rigoureusement contrôlées. On peut alors s'interroger sur la pertinence des résultats et leur transposition à l'humain.

1. La pertinence des modèles expérimentaux d'asthme allergique chez la souris

L'utilité des modèles animaux dans l'étude de l'asthme allergique est controversée. Bien que les études chez l'animal aient apporté de nombreuses avancées scientifiques dans la compréhension de la pathophysiologie de l'asthme, d'autres études ont révélé des différences importantes dans la physiologie et l'immunologie entre l'Homme et la souris.

Les détracteurs des modèles animaux d'asthme allergique se basent sur l'inefficacité chez l'Homme de certaines thérapies développées chez la souris. En effet, plusieurs des agents thérapeutiques identifiés dans des modèles murins, comme l'IL-12 ou les antagonistes du PAF, de l'IL-4 ou de l'IL-5, se sont révélés décevants aux cours d'essais cliniques chez l'Homme. A l'inverse, les essais de thérapies anti-IgE réalisés chez la souris avaient donné des résultats mitigés, alors que cette thérapie se révèle très efficace chez les patients atteints d'asthme sévère. Ces disparités peuvent s'expliquer par les protocoles d'induction de l'asthme utilisés chez la souris. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe différents modèles murins d'asthme allergique qui se distinguent par le type d'allergène utilisé, l'utilisation d'adjuvant, la voie de sensibilisation et de provocation, la durée du protocole ou la souche de souris utilisée. Les modèles d'asthme allergique utilisant l'hydroxyde d'aluminium sont depuis longtemps employés dans les laboratoires de recherche, et ceci bien avant que les mécanismes d'action de cet adjuvant aient été élucidés. On sait aujourd'hui que l'hydroxyde d'aluminium potentialise la réponse immunitaire en déstabilisant les phagosomes et en activant l'inflammasome NLRP3 et la production d'IL-1 β et d'IL-18 (Eisenbarth et al., 2008; Franchi and Nunez, 2008; Hornung et al., 2008). De plus, son effet cytotoxique entraîne une libération locale d'acide urique qui contribue à la maturation des cellules dendritiques (Kool et al., 2008b). L'administration de cet adjuvant lors des immunisations induit une inflammation allergique et une HRB indépendante des mastocytes et des IgE. Plusieurs études montrent clairement que les protocoles d'immunisation sans adjuvant permettent d'obtenir une réponse Th2 comparable à celle obtenue avec adjuvant, en évitant les complications non-physiologiques qui pourraient interférer avec l'expérience (Brewer et al., 1999; Conrad et al., 2009; Zosky and Sly, 2007).

Toutefois, les travaux d'Eisenbarth ont démontré l'importance des signaux de danger au moment des immunisations, puisque l'administration intranasale d'ovalbumine ultra-pure entraîne une tolérance immunitaire (Eisenbarth et al., 2002). Les modèles d'asthme allergique sans adjuvant utilisent généralement une source d'ovalbumine contaminée par de faibles doses de LPS, qui jouent alors le rôle de signaux de danger. Ces modèles permettent de reproduire artificiellement chez la souris les caractéristiques de la maladie telles la production de cytokines Th2, le recrutement éosinophilique, la dégranulation mastocytaire, l'hyperplasie des cellules de Goblet, la production d'IgE spécifiques de

l'antigène et l'HRB. De même, les modèles expérimentaux, dans lesquels l'immunisation est réalisée par instillation de l'allergène sans adjuvant, se généralisent. C'est le cas du modèle induit par l'HDM qui reproduit chez la souris de façon plus réaliste la physiopathologie humaine.

Malgré l'évolution des modèles animaux d'asthme allergique, les différences anatomiques et immunologiques entre l'Homme et la souris rendent délicat la transposition des résultats de l'animal vers l'Homme. Les principales différences observées entre ces deux espèces sont résumées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Tableau 3 : Différences entre les modèles murins et la pathophysiologie humaine dans l'asthme allergique

1	Les souris ne développent pas d'asthme spontanément
2	Au niveau anatomique, l'arbre bronchique murin présente moins de ramifications bronchiques, dans lesquelles les échanges gazeux sont impossibles, que celui de l'Homme
3	Proportionnellement à sa taille, la surface des alvéoles pulmonaires est supérieure chez la souris
4	A l'exception de la trachée, les voies aériennes de la souris ne comprennent pas de glandes submucoales, alors qu'elles sont abondantes chez l'Homme
5	La capacité de dégranulation des éosinophiles murins est inférieure à celle des éosinophiles humains
6	L'inflammation vasculaire et périvasculaire est importante chez la souris, mais quasiment inexistante chez l'Homme
7	Les souris de laboratoire sont généralement hébergées dans des conditions plus propres et contrôlées que les patients asthmatiques
8	Les souris répondent différemment à certains médiateurs. C'est le cas de l'histamine, des neurokinines, des leucotriènes C4, qui causent des broncho constriction chez l'Homme mais pas chez la souris
9	Les souris sont incapables de respirer par la bouche. La respiration orale chez l'Homme contourne les fonctions d'épuration de l'air dans les voies aériennes supérieures
10	Les souris n'ont pas le réflexe de toux, modifiant considérablement la réaction d'hyper réactivité bronchique en cas de crise

(D'après Finkelman FD, 2008)

En dépit de ces disparités, l'utilisation de modèles murins a permis de faire avancer les connaissances scientifiques sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'asthme allergique, et de mettre au point de nouvelles thérapies. C'est le cas des traitements à base de corticostéroïdes, d'inhibiteurs de leucotriènes ou des agonistes des phosphodiesterases qui ont tous été élaborés grâce à des modèles expérimentaux d'asthme allergique chez la souris. De même, l'effet anti-éosinophilique des traitements anti-IL-5, d'abord testé dans des modèles murins d'asthme allergique, est aujourd'hui en essai chez des patients atteints de syndrome hyperéosinophilique, de dermatites éosinophiles ou d'œsophagites éosinophiles (Finkelman and Wills-Karp, 2008).

Malgré les disparités avec l'espèce humaine, les modèles animaux restent donc indispensables à l'étude des pathologies humaines et au développement de nouvelles thérapies. Les modèles murins ont l'avantage d'être peu coûteux et d'offrir de nombreuses possibilités, telles la création d'animaux génétiquement modifiés. Néanmoins, chaque expérimentateur doit avoir conscience des limites de son modèle, et de la valeur prédictive et non théorique de ses résultats.

PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

La recrudescence de l'asthme dans les pays industrialisés a entraîné une multiplication des laboratoires s'intéressant à cette pathologie. Malgré le nombre important de publications scientifiques sur ce sujet, la physiopathologie de l'asthme est loin d'être entièrement comprise, et de nombreuses zones d'ombres restent à éclaircir.

Au cours de ma thèse, j'ai abordé différentes facettes de la réponse immunitaire de l'asthme allergique en utilisant un modèle expérimental d'inflammation pulmonaire allergique chez la souris. A travers trois différents projets, j'ai eu l'opportunité d'étudier des molécules et des mécanismes mis en jeu aussi bien dans la phase d'immunisation à l'allergène, que lors de la phase effectrice. De ce fait, je me suis intéressée à des populations cellulaires variées, telles les cellules dendritiques, les lymphocytes Th2 et Th17 ou les éosinophiles. Cette diversité m'a permis d'acquérir de solides connaissances immunologiques et une vision globale de la pathologie. Bien que fondamentales, mes recherches ouvrent de nouvelles pistes thérapeutiques dans le traitement de l'asthme allergique.

La mise en évidence du rôle régulateur de l'IL-22, en partenariat ou non avec l'IL-17, confère une nouvelle fonction aux lymphocytes Th17, qui pourraient, contre toute attente, participer à la résolution de l'asthme.

Les exemples de régulation de l'inflammation muqueuse par l'IL-22 se multiplient dans la littérature et l'IL-22 pourrait constituer une nouvelle arme pour les laboratoires pharmaceutiques. En effet, l'IL-22 joue un rôle protecteur dans certaines infections bactériennes et aide à la régénération des tissus dans le poumon et l'intestin. On peut alors imaginer traiter ces infections avec de l'IL-22 recombinante ou bien stimuler *in vivo* la synthèse d'IL-22 par les cellules productrices. L'activation de la voie AhR pourrait permettre d'accroître la production de cette cytokine par les Th17. Par ailleurs, l'activation des récepteurs AhR entraîne également la production d'IL-17A et F pouvant être délétères dans d'autres pathologies. L'administration directe d'IL-22 recombinante par voie systémique comme traitement complémentaire en cas d'infection bactérienne, se heurte aux problèmes des doses à administrer, de la demi-vie de la cytokine dans la circulation et évidemment du coût d'un tel traitement. Mais avant toute utilisation thérapeutique, les fonctions et les mécanismes d'action de l'IL-22 devront être clairement identifiés.

Notre étude a confirmé un rôle pro-inflammatoire de l'IL-1 α et β au cours de l'asthme allergique. Des thérapies anti-IL-1 sont en cours d'essais cliniques dans d'autres maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde ou les cryopyrinopathies. Cependant, le caractère pléiotrope de l'IL-1 rend difficile la généralisation de ces traitements. En effet, l'IL-1 agit sur de nombreux types

cellulaires et active la transcription de gènes de l'inflammation, mais aussi des facteurs de croissance des cellules souches et des cellules mésenchymateuses. De plus, l'asthme est une pathologie majoritairement Th2 dans laquelle l'IL-1 ne joue qu'un rôle d'amplificateur. C'est pourquoi, l'IL-1 n'apparaît pas être une cible de choix dans le traitement de l'asthme allergique.

A l'inverse, de par ses nombreux effets sur la réponse Th2, l'IL-33 constitue une cible potentielle dans le traitement de l'asthme allergique. Une étude chez la souris a montré l'efficacité d'un traitement anti-IL-33 dans la résolution de cette pathologie (Liu et al., 2009). Par ailleurs, l'échec des précédents essais de thérapies anti cytokines Th2 chez l'Homme suggèrent que la simple inhibition de l'IL-33 serait insuffisante pour annihiler complètement l'inflammation pulmonaire. Il est probable que les traitements en tandem, plutôt que les monothérapies débouchent sur des meilleurs résultats, comme le prouve une étude récente dans laquelle les patients sont traités avec un anti-IL-5 associé à un antagoniste du récepteur CCR3 (Erin et al., 2002).

CONCLUSIONS

L'augmentation de la prévalence et des coûts engendrés par l'asthme font de cette maladie un véritable problème de santé publique en France comme dans de nombreux pays industrialisés. Les travaux de recherche menés chez l'Homme ou sur des modèles animaux, ont permis une meilleure compréhension de la maladie asthmatique et la découverte de cibles thérapeutiques potentielles. Cependant, la composante multifactorielle et l'hétérogénéité de la maladie chez l'Homme compliquent le développement de nouvelles thérapies. Une approche plus personnalisée de la pathologie pourrait dans bien des cas permettre d'adapter le traitement à chaque type d'asthme et d'augmenter les chances de réussite. Néanmoins, comme dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, les espoirs de guérison sont minces, et les thérapies s'attachent plutôt à réduire les symptômes et à limiter la progression de la maladie. Dans le cas de l'asthme allergique, une meilleure éducation et un suivi médical personnalisé, permettraient dans bien des cas d'améliorer les conditions de vie des patients et de réduire les hospitalisations.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Acosta-Rodriguez, E.V., Napolitani, G., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2007). Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8, 942-949.

Akbari, O. (2006). The role of iNKT cells in development of bronchial asthma: a translational approach from animal models to human. *Allergy* 61, 962-968.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2, 725-731.

Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9, 582-588.

Ali, S., Huber, M., Kollewe, C., Bischoff, S.C., Falk, W., and Martin, M.U. (2007). IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18660-18665.

Allakhverdi, Z., Comeau, M.R., Jessup, H.K., Yoon, B.R., Brewer, A., Chartier, S., Paquette, N., Ziegler, S.F., Sarfati, M., and Delespesse, G. (2007). Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells. *J Exp Med* 204, 253-258.

Amu, S., Saunders, S.P., Kronenberg, M., Mangan, N.E., Atzberger, A., and Fallon, P.G. (2010). Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1114-1124 e1118.

Anand, V.K., Kacker, A., Orjuela, A.F., Huang, C., Manarey, C., and Xiang, J. (2006). Inflammatory pathway gene expression in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 20, 471-476.

Angkasekwinai, P., Chang, S.H., Thapa, M., Watarai, H., and Dong, C. (2010). Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nat Immunol* 11, 250-256.

Asokanathan, N., Graham, P.T., Stewart, D.J., Bakker, A.J., Eidne, K.A., Thompson, P.J., and Stewart, G.A. (2002). House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* 169, 4572-4578.

Aujla, S.J., Chan, Y.R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D.J., Pociask, D.A., Reinhart, T.A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., *et al.* (2008). IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* 14, 275-281.

B

Balzano, G., Fuschillo, S., Melillo, G., and Bonini, S. (2001). Asthma and sex hormones. *Allergy* 56, 13-20.

- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18, 767-811.
- Barrett, N.A., and Austen, K.F. (2009). Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity* 31, 425-437.
- Beaty, S.R., Rose, C.E., Jr., and Sung, S.S. (2007). Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178, 1882-1895.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., *et al.* (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119, 3723-3738.
- Behera, A.K., Kumar, M., Lockey, R.F., and Mohapatra, S.S. (2002). Adenovirus-mediated interferon gamma gene therapy for allergic asthma: involvement of interleukin 12 and STAT4 signaling. *Hum Gene Ther* 13, 1697-1709.
- Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81, 1-5.
- Black, J.L., and Johnson, P.R. (2002). Factors controlling smooth muscle proliferation and airway remodelling. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2, 47-51.
- Bogiatzi, S.I., Fernandez, I., Bichet, J.C., Marloie-Provost, M.A., Volpe, E., Sastre, X., and Soumelis, V. (2007). Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 178, 3373-3377.
- Boguniewicz, M., Martin, R.J., Martin, D., Gibson, U., Celniker, A., Williams, M., and Leung, D.Y. (1995). The effects of nebulized recombinant interferon-gamma in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol* 95, 133-135.
- Boniface, K., Bernard, F.X., Garcia, M., Gurney, A.L., Lecron, J.C., and Morel, F. (2005). IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 174, 3695-3702.
- Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 10, 467-478.
- Borish, L., Aarons, A., Rumbyrt, J., Cvietusa, P., Negri, J., and Wenzel, S. (1996). Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 97, 1288-1296.
- Borish, L., Mascali, J.J., Dishuck, J., Beam, W.R., Martin, R.J., and Rosenwasser, L.J. (1992). Detection of alveolar macrophage-derived IL-1 beta in asthma. Inhibition with corticosteroids. *J Immunol* 149, 3078-3082.
- Bourgeois, E., Van, L.P., Samson, M., Diem, S., Barra, A., Roga, S., Gombert, J.M., Schneider, E., Dy, M., Gourdy, P., *et al.* (2009). The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 39, 1046-1055.

Bousquet, J., Jeffery, P.K., Busse, W.W., Johnson, M., and Vignola, A.M. (2000). Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 1720-1745.

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., *et al.* (2006). IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G827-838.

Brewer, J.M., Conacher, M., Hunter, C.A., Mohrs, M., Brombacher, F., and Alexander, J. (1999). Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. *J Immunol* 163, 6448-6454.

Burgler, S., Ouaked, N., Bassin, C., Basinski, T.M., Mantel, P.Y., Siegmund, K., Meyer, N., Akdis, C.A., and Schmidt-Weber, C.B. (2009). Differentiation and functional analysis of human T(H)17 cells. *J Allergy Clin Immunol* 123, 588-595, 595 e581-587.

Busse, W.W. (2001). Anti-immunoglobulin E (omalizumab) therapy in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S12-17.

C

Carriere, V., Roussel, L., Ortega, N., Lacorre, D.A., Americh, L., Aguilar, L., Bouche, G., and Girard, J.P. (2007). IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 282-287.

Cayrol, C., and Girard, J.P. (2009). The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9021-9026.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722-725.

Chackerian, A.A., Oldham, E.R., Murphy, E.E., Schmitz, J., Pflanz, S., and Kastelein, R.A. (2007). IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 179, 2551-2555.

Chang, H.C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.N., Han, L., *et al.* (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol* 11, 527-534.

Cheng, G., Arima, M., Honda, K., Hirata, H., Eda, F., Yoshida, N., Fukushima, F., Ishii, Y., and Fukuda, T. (2002). Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 409-416.

Cherry, W.B., Yoon, J., Bartemes, K.R., Iijima, K., and Kita, H. (2008). A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 121, 1484-1490.

Cheung, P.F., Wong, C.K., Ip, W.K., and Lam, C.W. (2006). IL-25 regulates the expression of adhesion molecules on eosinophils: mechanism of eosinophilia in allergic inflammation. *Allergy* 61, 878-885.

Cohn, L., Homer, R.J., MacLeod, H., Mohrs, M., Brombacher, F., and Bottomly, K. (1999). Th2-induced airway mucus production is dependent on IL-4R α , but not on eosinophils. *J Immunol* **162**, 6178-6183.

Cohn, L., Homer, R.J., Marinov, A., Rankin, J., and Bottomly, K. (1997). Induction of airway mucus production By T helper 2 (Th2) cells: a critical role for interleukin 4 in cell recruitment but not mucus production. *J Exp Med* **186**, 1737-1747.

Cohn, L., Tepper, J.S., and Bottomly, K. (1998). IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol* **161**, 3813-3816.

Commins, S., Steinke, J.W., and Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 1108-1111.

Conrad, M.L., Yildirim, A.O., Sonar, S.S., Kilic, A., Sudowe, S., Lunow, M., Teich, R., Renz, H., and Garn, H. (2009). Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy* **39**, 1246-1254.

Coquet, J.M., Chakravarti, S., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2008). Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **180**, 7097-7101.

Cousins, D.J., Lee, T.H., and Staynov, D.Z. (2002). Cytokine coexpression during human Th1/Th2 cell differentiation: direct evidence for coordinated expression of Th2 cytokines. *J Immunol* **169**, 2498-2506.

Coyle, A.J., Lloyd, C., Tian, J., Nguyen, T., Eriksson, C., Wang, L., Ottoson, P., Persson, P., Delaney, T., Lehar, S., *et al.* (1999). Crucial role of the interleukin 1 receptor family member T1/ST2 in T helper cell type 2-mediated lung mucosal immune responses. *J Exp Med* **190**, 895-902.

Coyle, A.J., Tsuyuki, S., Bertrand, C., Huang, S., Aguet, M., Alkan, S.S., and Anderson, G.P. (1996). Mice lacking the IFN- γ receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. *J Immunol* **156**, 2680-2685.

Croft, M. (2003). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**, 265-273.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744-748.

D

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., *et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF- β -induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF- β , generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol* **9**, 1347-1355.

Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., and Romagnani, S. (1993). Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* **150**, 353-360.

Delmas, M.C., and Fuhrman, C. (2010). [Asthma in France: a review of descriptive epidemiological data]. *Rev Mal Respir* 27, 151-159.

Demoulin, J.B., and Renauld, J.C. (1998). Interleukin 9 and its receptor: an overview of structure and function. *Int Rev Immunol* 16, 345-364.

Dinarello, C.A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27, 519-550.

Doe, C., Bafadhel, M., Siddiqui, S., Desai, D., Mistry, V., Rugman, P., McCormick, M., May, R., Sleeman, M.A., Anderson, I.K., *et al.* Expression of the Th17-associated cytokines interleukin (IL)-17A and F in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*.

Douwes, J., Gibson, P., Pekkanen, J., and Pearce, N. (2002). Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms. *Thorax* 57, 643-648.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., *et al.* (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357-1361.

Dugas, B., Renauld, J.C., Pene, J., Bonnefoy, J.Y., Peti-Frere, C., Braquet, P., Bousquet, J., Van Snick, J., and Mencia-Huerta, J.M. (1993). Interleukin-9 potentiates the interleukin-4-induced immunoglobulin (IgG, IgM and IgE) production by normal human B lymphocytes. *Eur J Immunol* 23, 1687-1692.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 10, 857-863.

Durrant, D.M., and Metzger, D.W. (2010). IL-12 can alleviate Th17-mediated allergic lung inflammation through induction of pulmonary IL-10 expression. *Mucosal Immunol* 3, 301-311.

E

Eigenbrod, T., Park, J.H., Harder, J., Iwakura, Y., and Nunez, G. (2008). Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* 181, 8194-8198.

Eisenbarth, S.C. (2008). Use and limitations of alum-based models of allergy. *Clin Exp Allergy* 38, 1572-1575.

Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S., and Flavell, R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 453, 1122-1126.

Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196, 1645-1651.

Erin, E.M., Williams, T.J., Barnes, P.J., and Hansel, T.T. (2002). Eotaxin receptor (CCR3) antagonism in asthma and allergic disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1, 201-214.

Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Discher, M., Krentel, H., Hagenberg, A., Braun, A., and Krug, N. (2003). Increased expression of interleukin-9 messenger RNA after segmental allergen challenge in allergic asthmatics. *Chest* 123, 370S.

F

Finkelman, F.D., and Wills-Karp, M. (2008). Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 121, 603-606.

Finotto, S., Neurath, M.F., Glickman, J.N., Qin, S., Lehr, H.A., Green, F.H., Ackerman, K., Haley, K., Galle, P.R., Szabo, S.J., *et al.* (2002). Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295, 336-338.

Flood-Page, P., Swenson, C., Faferman, I., Matthews, J., Williams, M., Brannick, L., Robinson, D., Wenzel, S., Busse, W., Hansel, T.T., *et al.* (2007). A study to evaluate safety and efficacy of mepolizumab in patients with moderate persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 1062-1071.

Fort, M.M., Cheung, J., Yen, D., Li, J., Zurawski, S.M., Lo, S., Menon, S., Clifford, T., Hunte, B., Lesley, R., *et al.* (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15, 985-995.

Franchi, L., and Nunez, G. (2008). The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 β secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur J Immunol* 38, 2085-2089.

G

Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 6, 135-142.

Gao, Z., Kang, Y., Xu, Y., Shang, Y., Gai, J., and He, Q. (2002). Inhibition of allergic responsiveness in a murine asthma model via IFN- γ transgene expression. *Chin Med J (Engl)* 115, 1470-1474.

Gavett, S.H., O'Hearn, D.J., Li, X., Huang, S.K., Finkelman, F.D., and Wills-Karp, M. (1995). Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J Exp Med* 182, 1527-1536.

Geboes, L., Dumoutier, L., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Mitera, T., Renauld, J.C., and Matthys, P. (2009). Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 60, 390-395.

Gonzalo, J.A., Lloyd, C.M., Wen, D., Albar, J.P., Wells, T.N., Proudfoot, A., Martinez, A.C., Dorf, M., Bjerke, T., Coyle, A.J., *et al.* (1998). The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 188, 157-167.

Gratzl, S., Palca, A., Schmitz, M., and Simon, H.U. (2000). Treatment with IFN- α in corticosteroid-unresponsive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105, 1035-1036.

H

Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M.L., Diem, S., Roongapinun, S., Lefort, J., Marchal, G., Herbelin, A., Askenase, P.W., Dy, M., *et al.* (2005). Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN- γ . *Eur J Immunol* 35, 2793-2802.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 9, 857-865.

Hamid, Q., and Tulic, M. (2009). Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 71, 489-507.

Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15, 410-416.

Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8, 193-204.

Hammad, H., Lambrecht, B.N., Pochard, P., Gosset, P., Marquillies, P., Tonnel, A.B., and Pestel, J. (2002). Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J Immunol* 169, 1524-1534.

Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M.A., Kool, M., Muskens, F., and Lambrecht, B.N. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207, 2097-2111.

Haraldsen, G., Balogh, J., Pollheimer, J., Sponheim, J., and Kuchler, A.M. (2009). Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol* 30, 227-233.

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132. Epub 2005 Oct 1122.

Harrington, L.E., Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol* 18, 349-356.

Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A.T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D.J., Griesse, M., and Krauss-Etschmann, S. (2007). Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells in pediatric asthma. *J Allergy Clin Immunol* 119, 1258-1266.

Hashimoto, T., Akiyama, K., Kobayashi, N., and Mori, A. (2005). Comparison of IL-17 production by helper T cells among atopic and nonatopic asthmatics and control subjects. *Int Arch Allergy Immunol* 137 Suppl 1, 51-54.

Hayakawa, H., Hayakawa, M., Kume, A., and Tominaga, S. (2007). Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem* 282, 26369-26380.

Hayakawa, M., Hayakawa, H., Matsuyama, Y., Tamemoto, H., Okazaki, H., and Tominaga, S. (2009). Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 218-222.

He, R., Oyoshi, M.K., Garibyan, L., Kumar, L., Ziegler, S.F., and Geha, R.S. (2008). TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11875-11880.

He, R., Oyoshi, M.K., Jin, H., and Geha, R.S. (2007). Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15817-15822.

Hellings, P.W., Kasran, A., Liu, Z., Vandekerckhove, P., Wuyts, A., Overbergh, L., Mathieu, C., and Ceuppens, J.L. (2003). Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 42-50.

Hogan, S.P., Matthaei, K.I., Young, J.M., Koskinen, A., Young, I.G., and Foster, P.S. (1998). A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol* **161**, 1501-1509.

Homey, B., and Zlotnik, A. (1999). Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol* **11**, 626-634.

Horai, R., Asano, M., Sudo, K., Kanuka, H., Suzuki, M., Nishihara, M., Takahashi, M., and Iwakura, Y. (1998). Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-1alpha/beta, and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1beta is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* **187**, 1463-1475.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* **9**, 847-856.

Hoshino, K., Kashiwamura, S., Kuribayashi, K., Kodama, T., Tsujimura, T., Nakanishi, K., Matsuyama, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). The absence of interleukin 1 receptor-related T1/ST2 does not affect T helper cell type 2 development and its effector function. *J Exp Med* **190**, 1541-1548.

Hsu, H.C., Yang, P., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., Yi, J., Guentert, T., Tousson, A., Stanus, A.L., *et al.* (2008). Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* **9**, 166-175.

Huau, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., Xing, Z., and Phan, S.H. (2003). Eosinophils and T lymphocytes possess distinct roles in bleomycin-induced lung injury and fibrosis. *J Immunol* **171**, 5470-5481.

Hue, S., Ahern, P., Buonocore, S., Kullberg, M.C., Cua, D.J., McKenzie, B.S., Powrie, F., and Maloy, K.J. (2006). Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* **203**, 2473-2483.

Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grencis, R.K. (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol* **180**, 2443-2449.

I

Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Vos, N., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2007). Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J Clin Invest* **117**, 464-472.

Ikeda, K., Nakajima, H., Suzuki, K., Kagami, S., Hirose, K., Suto, A., Saito, Y., and Iwamoto, I. (2003). Mast cells produce interleukin-25 upon Fc epsilon RI-mediated activation. *Blood* **101**, 3594-3596. Epub 2003 Jan 3502.

Ikeuchi, H., Kuroiwa, T., Hiramatsu, N., Kaneko, Y., Hiromura, K., Ueki, K., and Nojima, Y. (2005). Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 52, 1037-1046.

Ito, T., Wang, Y.H., Duramad, O., Hori, T., Delespesse, G.J., Watanabe, N., Qin, F.X., Yao, Z., Cao, W., and Liu, Y.J. (2005). TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand. *J Exp Med* 202, 1213-1223.

J

Jaiswal, A.I., Dubey, C., Swain, S.L., and Croft, M. (1996). Regulation of CD40 ligand expression on naive CD4 T cells: a role for TCR but not co-stimulatory signals. *Int Immunol* 8, 275-285.

Jeffery, P.K. (2001). Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S28-38.

Joetham, A., Takeda, K., Taube, C., Miyahara, N., Matsubara, S., Koya, T., Rha, Y.H., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2007). Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta. *J Immunol* 178, 1433-1442.

Johnson, S.R., and Knox, A.J. (1997). Synthetic functions of airway smooth muscle in asthma. *Trends Pharmacol Sci* 18, 288-292.

K

Kato, A., Favoreto, S., Jr., Avila, P.C., and Schleimer, R.P. (2007). TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol* 179, 1080-1087.

Kauffman, H.F., Tamm, M., Timmerman, J.A., and Borger, P. (2006). 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* 4, 5.

Kearley, J., Buckland, K.F., Mathie, S.A., and Lloyd, C.M. (2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 179, 772-781.

Keller, M., Ruegg, A., Werner, S., and Beer, H.D. (2008). Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831.

Kim, H.Y., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 11, 577-584.

Kim, Y.S., Choi, S.J., Choi, J.P., Jeon, S.G., Oh, S.Y., Lee, B.J., Gho, Y.S., Lee, C.G., Zhu, Z., Elias, J.A., *et al.* (2010). IL-12-STAT4-IFN-gamma axis is a key downstream pathway in the development of IL-13-mediated asthma phenotypes in a Th2 type asthma model. *Exp Mol Med* 42, 533-546.

Kips, J.C., Brusselle, G.J., Joos, G.F., Peleman, R.A., Tavernier, J.H., Devos, R.R., and Pauwels, R.A. (1996). Interleukin-12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 153, 535-539.

Klune, J.R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T.R., and Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 14, 476-484.

Komai-Koma, M., Xu, D., Li, Y., McKenzie, A.N., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2007). IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol* 37, 2779-2786.

Kondo, Y., Yoshimoto, T., Yasuda, K., Futatsugi-Yumikura, S., Morimoto, M., Hayashi, N., Hoshino, T., Fujimoto, J., and Nakanishi, K. (2008). Administration of IL-33 induces airway hyperresponsiveness and goblet cell hyperplasia in the lungs in the absence of adaptive immune system. *Int Immunol* 20, 791-800.

Kool, M., Petrilli, V., De Smedt, T., Rolaz, A., Hammad, H., van Nimwegen, M., Bergen, I.M., Castillo, R., Lambrecht, B.N., and Tschopp, J. (2008a). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J Immunol* 181, 3755-3759.

Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008b). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205, 869-882.

Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M.C., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362, 245-248.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27, 485-517.

Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renauld, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179, 8098-8104.

Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 267, 2000-2003.

Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Murphy, G., Russo, R.C., Stolarski, B., Garcia, C.C., Komai-Koma, M., Pitman, N., Li, Y., Niedbala, W., *et al.* (2008). IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 181, 4780-4790.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C.J., Ying, S., Pitman, N., Mirchandani, A., Rana, B., van Rooijen, N., *et al.* (2009). IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol* 183, 6469-6477.

L

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

Lahn, M., Kanehiro, A., Takeda, K., Joetham, A., Schwarze, J., Kohler, G., O'Brien, R., Gelfand, E.W., and Born, W. (1999). Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat Med* 5, 1150-1156.

Lambrecht, B.N. (2006). Alveolar macrophage in the driver's seat. *Immunity* 24, 366-368.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2003). Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 3, 994-1003.

Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2009). Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31, 412-424.

Lampinen, M., Carlson, M., Hakansson, L.D., and Venge, P. (2004). Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* 59, 793-805.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.

Leckie, M.J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B.J., Walls, C.M., Mathur, A.K., Cowley, H.C., Chung, K.F., Djukanovic, R., *et al.* (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 356, 2144-2148.

Lejeune, D., Dumoutier, L., Constantinescu, S., Kruijer, W., Schuringa, J.J., and Renauld, J.C. (2002). Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 277, 33676-33682.

Letuve, S., Lajoie-Kadoch, S., Audusseau, S., Rothenberg, M.E., Fiset, P.O., Ludwig, M.S., and Hamid, Q. (2006). IL-17E upregulates the expression of proinflammatory cytokines in lung fibroblasts. *J Allergy Clin Immunol* 117, 590-596.

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203, 2271-2279.

Liew, F.Y., Pitman, N.I., and McInnes, I.B. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 10, 103-110.

Lindblad, E.B. (2004). Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunol Cell Biol* 82, 497-505.

Lindell, D.M., Berlin, A.A., Schaller, M.A., and Lukacs, N.W. (2008). B cell antigen presentation promotes Th2 responses and immunopathology during chronic allergic lung disease. *PLoS One* 3, e3129.

Liu, X., Li, M., Wu, Y., Zhou, Y., Zeng, L., and Huang, T. (2009). Anti-IL-33 antibody treatment inhibits airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 181-185.

Lohning, M., Stroehmann, A., Coyle, A.J., Grogan, J.L., Lin, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Levinson, D., Radbruch, A., and Kamradt, T. (1998). T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6930-6935.

Louten, J., Boniface, K., and de Waal Malefyt, R. (2009). Development and function of TH17 cells in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1004-1011.

Lucey, D.R., Nicholson-Weller, A., and Weller, P.F. (1989). Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1348-1351.

Luthi, A.U., Cullen, S.P., McNeela, E.A., Duriez, P.J., Afonina, I.S., Sheridan, C., Brumatti, G., Taylor, R.C., Kersse, K., Vandenabeele, P., *et al.* (2009). Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity* 31, 84-98.

M

Ma, H.L., Liang, S., Li, J., Napierata, L., Brown, T., Benoit, S., Senices, M., Gill, D., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., *et al.* (2008). IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 118, 597-607.

MacKenzie, J.R., Mattes, J., Dent, L.A., and Foster, P.S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167, 3146-3155.

Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27, 229-265.

Martinon, F., and Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14, 10-22.

Matangkasombut, P., Marigowda, G., Ervine, A., Idris, L., Pichavant, M., Kim, H.Y., Yasumi, T., Wilson, S.B., DeKruyff, R.H., Faul, J.L., *et al.* (2009). Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1181-1185.

Matsuda, H., Suda, T., Sato, J., Nagata, T., Koide, Y., Chida, K., and Nakamura, H. (2005). alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 22-31.

Matsumura, F., Puga, A., and Tohyama, C. (2009). Biological functions of the arylhydrocarbon receptor: beyond induction of cytochrome P450s. Introduction to this special issue. *Biochem Pharmacol* 77, 473.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 8, 1390-1397.

McGeachy, M.J., Chen, Y., Tato, C.M., Laurence, A., Joyce-Shaikh, B., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., O'Shea, J.J., and Cua, D.J. (2009). The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10, 314-324.

McLane, M.P., Haczku, A., van de Rijn, M., Weiss, C., Ferrante, V., MacDonald, D., Renauld, J.C., Nicolaides, N.C., Holroyd, K.J., and Levitt, R.C. (1998). Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 713-720.

McMillan, S.J., Bishop, B., Townsend, M.J., McKenzie, A.N., and Lloyd, C.M. (2002). The absence of interleukin 9 does not affect the development of allergen-induced pulmonary inflammation nor airway hyperreactivity. *J Exp Med* 195, 51-57.

Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Page, N., Olivenstein, R., Elias, J., and Chakir, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 108, 430-438.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.

Moulin, D., Donze, O., Talabot-Ayer, D., Mezin, F., Palmer, G., and Gabay, C. (2007). Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40, 216-225.

Moussion, C., Ortega, N., and Girard, J.P. (2008). The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One* 3, e3331.

Munoz, M., Heimesaat, M.M., Danker, K., Struck, D., Lohmann, U., Plickert, R., Bereswill, S., Fischer, A., Dunay, I.R., Wolk, K., *et al.* (2009). Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J Exp Med* 206, 3047-3059.

Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., and Cua, D.J. (2003). Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198, 1951-1957. Epub 2003 Dec 1958.

N

Nakae, S., Asano, M., Horai, R., Sakaguchi, N., and Iwakura, Y. (2001). IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J Immunol* 167, 90-97.

Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., and Iwakura, Y. (2002). Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17, 375-387.

Nakae, S., Komiyama, Y., Yokoyama, H., Nambu, A., Umeda, M., Iwase, M., Homma, I., Sudo, K., Horai, R., Asano, M., *et al.* (2003a). IL-1 is required for allergen-specific Th2 cell activation and the development of airway hypersensitivity response. *Int Immunol* 15, 483-490.

Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2003b). Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 171, 6173-6177.

Nakae, S., Saijo, S., Horai, R., Sudo, K., Mori, S., and Iwakura, Y. (2003c). IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5986-5990.

Nakajima, H., and Hirose, K. Role of IL-23 and Th17 Cells in Airway Inflammation in Asthma. *Immune Netw* 10, 1-4.

Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 53-72.

Naseer, T., Minshall, E.M., Leung, D.Y., Laberge, S., Ernst, P., Martin, R.J., and Hamid, Q. (1997). Expression of IL-12 and IL-13 mRNA in asthma and their modulation in response to steroid therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 155, 845-851.

Negishi, T., Kato, Y., Ooneda, O., Mimura, J., Takada, T., Mochizuki, H., Yamamoto, M., Fujii-Kuriyama, Y., and Furusako, S. (2005). Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J Immunol* 175, 7348-7356.

O

Oboki, K., Ohno, T., Kajiwar, N., Arae, K., Morita, H., Ishii, A., Nambu, A., Abe, T., Kiyonari, H., Matsumoto, K., *et al.* (2010). IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Ozaki, K., Spolski, R., Feng, C.G., Qi, C.F., Cheng, J., Sher, A., Morse, H.C., 3rd, Liu, C., Schwartzberg, P.L., and Leonard, W.J. (2002). A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science* 298, 1630-1634.

P

Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2010). Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 40, 1232-1240.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005a). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005b). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6, 1133-1141. Epub 2005 Oct 1132.

Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S.A., Kaempfer, S., Spiegl, N., and Dahinden, C.A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113, 1526-1534.

Perrigoue, J.G., Saenz, S.A., Siracusa, M.C., Allenspach, E.J., Taylor, B.C., Giacomini, P.R., Nair, M.G., Du, Y., Zaph, C., van Rooijen, N., *et al.* (2009). MHC class II-dependent basophil-CD4⁺ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* 10, 697-705.

Pickert, G., Neufert, C., Leppkes, M., Zheng, Y., Wittkopf, N., Warntjen, M., Lehr, H.A., Hirth, S., Weigmann, B., Wirtz, S., *et al.* (2009). STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med* 206, 1465-1472.

Ponath, P.D., Qin, S., Post, T.W., Wang, J., Wu, L., Gerard, N.P., Newman, W., Gerard, C., and Mackay, C.R. (1996). Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med* 183, 2437-2448.

Postma, D.S., and Lebowitz, M.D. (1995). Persistence and new onset of asthma and chronic bronchitis evaluated longitudinally in a community population sample of adults. *Arch Intern Med* 155, 1393-1399.

Pouliot, P., Willart, M.A., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2010). Studying the function of dendritic cells in mouse models of asthma. *Methods Mol Biol* 595, 331-349.

Prefontaine, D., Lajoie-Kadoch, S., Foley, S., Audusseau, S., Olivenstein, R., Halayko, A.J., Lemiere, C., Martin, J.G., and Hamid, Q. (2009). Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol* 183, 5094-5103.

Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2006). 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 117, S450-456.

R

Rank, M.A., Kobayashi, T., Kozaki, H., Bartemes, K.R., Squillace, D.L., and Kita, H. (2009). IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123, 1047-1054.

Reber, L., Da Silva, C.A., and Frossard, N. (2006). Stem cell factor and its receptor c-Kit as targets for inflammatory diseases. *Eur J Pharmacol* 533, 327-340.

Reparon-Schuijt, C.C., van Esch, W.J., van Kooten, C., Rozier, B.C., Levarht, E.W., Breedveld, F.C., and Verweij, C.L. (2000). Regulation of synovial B cell survival in rheumatoid arthritis by vascular cell adhesion molecule 1 (CD106) expressed on fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum* 43, 1115-1121.

Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R.A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 185, 461-469.

Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A.M., Corrigan, C., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326, 298-304.

Robinson, D.S., Ying, S., Bentley, A.M., Meng, Q., North, J., Durham, S.R., Kay, A.B., and Hamid, Q. (1993). Relationships among numbers of bronchoalveolar lavage cells expressing messenger ribonucleic acid for cytokines, asthma symptoms, and airway methacholine responsiveness in atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 92, 397-403.

Romagnani, S. (2002). Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol* 38, 881-885.

Romagnani, S. (2004). Immunologic influences on allergy and the TH1/TH2 balance. *J Allergy Clin Immunol* 113, 395-400.

Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24, 147-174.

Rothenberg, M.E., MacLean, J.A., Pearlman, E., Luster, A.D., and Leder, P. (1997). Targeted disruption of the chemokine eotaxin partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 185, 785-790.

S

Sallusto, F., and Baggiolini, M. (2008). Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol* 9, 949-952.

Sanos, S.L., Bui, V.L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johnner, C., and Diefenbach, A. (2009). RORgammat and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat Immunol* 10, 83-91.

Sauter, A., Stern-Straeter, J., Chang, R.C., Hormann, K., and Naim, R. (2008). Influence of interleukin-13 on beta-catenin levels in eosinophilic chronic rhinosinusitis cell culture. *Int J Mol Med* 21, 447-452.

Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., *et al.* (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23, 479-490.

Schmitz, N., Kurrer, M., and Kopf, M. (2003). The IL-1 receptor 1 is critical for Th2 cell type airway immune responses in a mild but not in a more severe asthma model. *Eur J Immunol* 33, 991-1000.

Schnyder-Candrian, S., Togbe, D., Couillin, I., Mercier, I., Brombacher, F., Quesniaux, V., Fossiez, F., Ryffel, B., and Schnyder, B. (2006). Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma. *J Exp Med* 203, 2715-2725.

Schramm, C.M., Puddington, L., Yiamouyiannis, C.A., Lingenheld, E.G., Whiteley, H.E., Wolynec, W.W., Noonan, T.C., and Thrall, R.S. (2000). Proinflammatory roles of T-cell receptor (TCR)gamma delta and TCRalpha beta lymphocytes in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 218-225.

Schulman, E.S. (2001). Development of a monoclonal anti-immunoglobulin E antibody (omalizumab) for the treatment of allergic respiratory disorders. *Am J Respir Crit Care Med* 164, S6-11.

Sidhu, S.S., Yuan, S., Innes, A.L., Kerr, S., Woodruff, P.G., Hou, L., Muller, S.J., and Fahy, J.V. (2010). Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14170-14175.

Simonian, P.L., Wehrmann, F., Roark, C.L., Born, W.K., O'Brien, R.L., and Fontenot, A.P. gamma delta T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 207, 2239-2253.

Simonian, P.L., Wehrmann, F., Roark, C.L., Born, W.K., O'Brien, R.L., and Fontenot, A.P. (2010). gamma delta T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med* 207, 2239-2253.

Sims, J.E., Giri, J.G., and Dower, S.K. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* 72, 9-14.

Sims, J.E., and Smith, D.E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 89-102.

Smit, J.J., and Lukacs, N.W. (2006). A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol* 533, 277-288.

Smith, D.E. (2005). IL-33: a tissue derived cytokine pathway involved in allergic inflammation and asthma. *Clin Exp Allergy* 40, 200-208.

Smithgall, M.D., Comeau, M.R., Yoon, B.R., Kaufman, D., Armitage, R., and Smith, D.E. (2008). IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol* 20, 1019-1030.

Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9, 310-318.

- Sokol, C.L., Chu, N.Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 10, 713-720.
- Sonderegger, I., Kisielow, J., Meier, R., King, C., and Kopf, M. (2008). IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* 38, 1833-1838.
- Song, C., Luo, L., Lei, Z., Li, B., Liang, Z., Liu, G., Li, D., Zhang, G., Huang, B., and Feng, Z.H. (2008). IL-17-producing alveolar macrophages mediate allergic lung inflammation related to asthma. *J Immunol* 181, 6117-6124.
- Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kirn, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med*.
- Soumelis, V., and Liu, Y.J. (2004). Human thymic stromal lymphopoietin: a novel epithelial cell-derived cytokine and a potential key player in the induction of allergic inflammation. *Springer Semin Immunopathol* 25, 325-333.
- Soumelis, V., Reche, P.A., Kanzler, H., Yuan, W., Edward, G., Homey, B., Gilliet, M., Ho, S., Antonenko, S., Lauerma, A., *et al.* (2002). Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 3, 673-680.
- Sousa, A.R., Lane, S.J., Nakhosteen, J.A., Lee, T.H., and Poston, R.N. (1996). Expression of interleukin-1 beta (IL-1beta) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 154, 1061-1066.
- Spinozzi, F., Agea, E., Bistoni, O., Forenza, N., and Bertotto, A. (1998). gamma delta T cells, allergen recognition and airway inflammation. *Immunol Today* 19, 22-26.
- Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C., *et al.* (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity* 33, 192-202.
- Stock, P., Lombardi, V., Kohlrantz, V., and Akbari, O. (2009). Induction of airway hyperreactivity by IL-25 is dependent on a subset of invariant NKT cells expressing IL-17RB. *J Immunol* 182, 5116-5122.
- Stolarski, B., Kurowska-Stolarska, M., Kewin, P., Xu, D., and Liew, F.Y. (2010). IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 185, 3472-3480.
- Sung, S.S., Fu, S.M., Rose, C.E., Jr., Gaskin, F., Ju, S.T., and Beaty, S.R. (2006). A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176, 2161-2172.
- Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K.H., and Lavelle, E.C. (2006). A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203, 1685-1691.
- Suzukawa, M., Ikura, M., Koketsu, R., Nagase, H., Tamura, C., Komiya, A., Nakae, S., Matsushima, K., Ohta, K., Yamamoto, K., *et al.* (2008). An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. *J Immunol* 181, 5981-5989.

Suzuki, S., Kokubu, F., Kawaguchi, M., Homma, T., Odaka, M., Watanabe, S., Ieki, K., Matsukura, S., Kurokawa, M., Takeuchi, H., *et al.* (2007). Expression of interleukin-17F in a mouse model of allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1, 89-94.

Svensson, L., Lilliehook, B., Larsson, R., and Bucht, A. (2003). gammadelta T cells contribute to the systemic immunoglobulin E response and local B-cell reactivity in allergic eosinophilic airway inflammation. *Immunology* 108, 98-108.

T

Talabot-Ayer, D., Lamacchia, C., Gabay, C., and Palmer, G. (2009). Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem* 284, 19420-19426.

Tamachi, T., Maezawa, Y., Ikeda, K., Kagami, S., Hatano, M., Seto, Y., Suto, A., Suzuki, K., Watanabe, N., Saito, Y., *et al.* (2006). IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a TH2 cell-dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol* 118, 606-614.

Tanaka, H., Miyazaki, N., Oashi, K., Teramoto, S., Shiratori, M., Hashimoto, M., Ohmichi, M., and Abe, S. (2001). IL-18 might reflect disease activity in mild and moderate asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol* 107, 331-336.

Tang, C., Inman, M.D., van Rooijen, N., Yang, P., Shen, H., Matsumoto, K., and O'Byrne, P.M. (2001). Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 166, 1471-1481.

Taube, C., Dakhama, A., and Gelfand, E.W. (2004a). Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 173-186.

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

Taylor, A., Akdis, M., Joss, A., Akkoc, T., Wenig, R., Colonna, M., Daigle, I., Flory, E., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2007). IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1. *J Allergy Clin Immunol* 120, 76-83.

Tedder, T.F., and Matsushita, T. Regulatory B cells that produce IL-10: a breath of fresh air in allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 125, 1125-1127.

Terashima, A., Watarai, H., Inoue, S., Sekine, E., Nakagawa, R., Hase, K., Iwamura, C., Nakajima, H., Nakayama, T., and Taniguchi, M. (2008). A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *J Exp Med* 205, 2727-2733.

Tillie-Leblond, I., Iliescu, C., and Deschildre, A. (2004). [Physiopathology of inflammatory events in asthma]. *Arch Pediatr* 11 Suppl 2, 58s-64s.

Townsend, M.J., Fallon, P.G., Matthews, D.J., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N. (2000). T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191, 1069-1076.

Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 10, 864-871.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

V

van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201, 981-991.

van Rijt, L.S., Prins, J.B., Leenen, P.J., Thielemans, K., de Vries, V.C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2002). Allergen-induced accumulation of airway dendritic cells is supported by an increase in CD31(hi)Ly-6C(neg) bone marrow precursors in a mouse model of asthma. *Blood* 100, 3663-3671.

Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.C., and Stockinger, B. (2008a). The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453, 106-109.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008b). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* 9, 1341-1346.

Venkatesha, R.T., Berla Thangam, E., Zaidi, A.K., and Ali, H. (2005). Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol Immunol* 42, 581-587.

Vercelli, D. (2008). Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 8, 169-182.

Verstraelen, S., Bloemen, K., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G., and Van Den Heuvel, R. (2008). Cell types involved in allergic asthma and their use in in vitro models to assess respiratory sensitization. *Toxicol In Vitro* 22, 1419-1431.

Virchow, J.C., Jr., Walker, C., Hafner, D., Kortsik, C., Werner, P., Matthys, H., and Kroegel, C. (1995). T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 960-968.

Vroeling, A.B., Fokkens, W.J., and van Drunen, C.M. (2008). How epithelial cells detect danger: aiding the immune response. *Allergy* 63, 1110-1123.

W

Wakashin, H., Hirose, K., Maezawa, Y., Kagami, S., Suto, A., Watanabe, N., Saito, Y., Hatano, M., Tokuhisa, T., Iwakura, Y., *et al.* (2008). IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 1023-1032.

Walker, C., Kaegi, M.K., Braun, P., and Blaser, K. (1991). Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 88, 935-942.

Walsh, G.M. (2008). Emerging drugs for asthma. *Expert Opin Emerg Drugs* 13, 643-653.

Walzl, G., Matthews, S., Kendall, S., Gutierrez-Ramos, J.C., Coyle, A.J., Openshaw, P.J., and Hussell, T. (2001). Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med* 193, 785-792.

Wan, H., Winton, H.L., Soeller, C., Tovey, E.R., Gruenert, D.C., Thompson, P.J., Stewart, G.A., Taylor, G.W., Garrod, D.R., Cannell, M.B., *et al.* (1999). Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104, 123-133.

Wang, C.B., Wong, C.K., Ip, W.K., Li, M.L., Tian, Y.P., and Lam, C.W. (2005). Induction of IL-6 in co-culture of bronchial epithelial cells and eosinophils is regulated by p38 MAPK and NF-kappaB. *Allergy* 60, 1378-1385.

Wang, M.D., and HayGlass, K.T. (2000). gammadelta T-cell-deficient mice do not differ from normal controls in their induction or expression of type 2 dominant responses to exogenous antigen. *Immunopharmacology* 48, 291-298.

Wang, Y.H., Angkasekwina, P., Lu, N., Voo, K.S., Arima, K., Hanabuchi, S., Hippe, A., Corrigan, C.J., Dong, C., Homey, B., *et al.* (2007). IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *J Exp Med* 204, 1837-1847.

Watford, W.T., Hissong, B.D., Bream, J.H., Kanno, Y., Muul, L., and O'Shea, J.J. (2004). Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev* 202, 139-156.

Whittington, H.A., Armstrong, L., Uppington, K.M., and Millar, A.B. (2004). Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 220-226.

Willart, M.A., and Hammad, H. (2010). Alarming dendritic cells for allergic sensitization. *Allergol Int* 59, 95-103.

Williams, C.M., and Galli, S.J. (2000). Mast cells can amplify airway reactivity and features of chronic inflammation in an asthma model in mice. *J Exp Med* 192, 455-462.

Wilson, D.H., Adams, R.J., Tucker, G., Appleton, S., Taylor, A.W., and Ruffin, R.E. (2006). Trends in asthma prevalence and population changes in South Australia, 1990-2003. *Med J Aust* 184, 226-229.

Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (2010). Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207, 535-552.

Wilson, R.H., Whitehead, G.S., Nakano, H., Free, M.E., Kolls, J.K., and Cook, D.N. (2009). Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 180, 720-730.

Wolk, K., Kunz, S., Witte, E., Friedrich, M., Asadullah, K., and Sabat, R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 21, 241-254.

Wolk, K., Witte, E., Hoffmann, U., Doecke, W.D., Endesfelder, S., Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H.D., Wittig, B.M., and Sabat, R. (2007). IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol* 178, 5973-5981.

Wolk, K., Witte, E., Wallace, E., Docke, W.D., Kunz, S., Asadullah, K., Volk, H.D., Sterry, W., and Sabat, R. (2006). IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 36, 1309-1323.

Wolk, K., Witte, E., Witte, K., Warszawska, K., and Sabat, R. (2010). Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol* 32, 17-31.

Wright, J.F., Bennett, F., Li, B., Brooks, J., Luxenberg, D.P., Whitters, M.J., Tomkinson, K.N., Fitz, L.J., Wolfman, N.M., Collins, M., *et al.* (2008). The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol* 181, 2799-2805.

Y

Yamagata, S., Tomita, K., Sato, R., Niwa, A., Higashino, H., and Tohda, Y. (2008). Interleukin-18-deficient mice exhibit diminished chronic inflammation and airway remodelling in ovalbumin-induced asthma model. *Clin Exp Immunol* 154, 295-304.

Yamasaki, A., Saleh, A., Koussih, L., Muro, S., Halayko, A.J., and Gounni, A.S. (2010). IL-9 induces CCL11 expression via STAT3 signalling in human airway smooth muscle cells. *PLoS One* 5, e9178.

Yamazaki, K., Murray, J.A., Arora, A.S., Alexander, J.A., Smyrk, T.C., Butterfield, J.H., and Kita, H. (2006). Allergen-specific in vitro cytokine production in adult patients with eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci* 51, 1934-1941.

Ying, S., O'Connor, B., Ratoff, J., Meng, Q., Mallett, K., Cousins, D., Robinson, D., Zhang, G., Zhao, J., Lee, T.H., *et al.* (2005). Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity. *J Immunol* 174, 8183-8190.

Yoshimoto, T., Yasuda, K., Tanaka, H., Nakahira, M., Imai, Y., Fujimori, Y., and Nakanishi, K. (2009). Basophils contribute to T(H)2-IgE responses in vivo via IL-4 production and presentation of peptide-MHC class II complexes to CD4+ T cells. *Nat Immunol* 10, 706-712.

Z

Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29, 947-957.

Zheng, Y., Danilenko, D.M., Valdez, P., Kasman, I., Eastham-Anderson, J., Wu, J., and Ouyang, W. (2007). Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445, 648-651.

Zheng, Y., Valdez, P.A., Danilenko, D.M., Hu, Y., Sa, S.M., Gong, Q., Abbas, A.R., Modrusan, Z., Ghilardi, N., de Sauvage, F.J., *et al.* (2008). Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 14, 282-289.

Zhou, B., Comeau, M.R., De Smedt, T., Liggitt, H.D., Dahl, M.E., Lewis, D.B., Gyarmati, D., Aye, T., Campbell, D.J., and Ziegler, S.F. (2005). Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol* 6, 1047-1053.

Zhu, J., and Paul, W.E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557-1569.

Zimmermann, N., Hershey, G.K., Foster, P.S., and Rothenberg, M.E. (2003). Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 111, 227-242; quiz 243.

Zosky, G.R., and Sly, P.D. (2007). Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37, 973-988.

Zuany-Amorim, C., Ruffie, C., Haile, S., Vargaftig, B.B., Pereira, P., and Pretolani, M. (1998). Requirement for gammadelta T cells in allergic airway inflammation. *Science* 280, 1265-1267.

Anne-Gaëlle BESNARD

**Etude des mécanismes immunitaires dans un modèle d'inflammation
pulmonaire allergique chez la souris : Rôles de l'interleukine-22**

Résumé :

L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies aériennes. Chez les individus sensibles, l'inhalation d'allergènes entraîne une inflammation pulmonaire se traduisant par des épisodes récurrents de toux, de difficultés respiratoires et une sécrétion de mucus. Des études réalisées chez l'animal ont mis en évidence un rôle crucial des lymphocytes Th2 et des cytokines associées (IL-4, IL-5 et IL-13). Plus récemment, il a été montré que les lymphocytes Th17 participaient à la physiopathologie de l'asthme. La présente étude s'intéresse à une cytokine majoritairement produite par les Th17 : l'IL-22. Différents travaux indiquent que cette cytokine serait impliquée dans l'immunité muqueuse où elle exercerait des effets protecteurs ou pro-inflammatoires en fonction du modèle expérimental étudié.

En utilisant un modèle murin d'inflammation pulmonaire allergique induite par l'ovalbumine, nous avons montré que l'IL-22 jouait un rôle pro-inflammatoire au cours de l'induction de l'asthme allergique puisque les souris déficientes en IL-22 développent une forme atténuée de la maladie. A l'inverse, nous avons constaté que l'IL-22 avait un effet protecteur dans la phase effectrice, et que cet effet était dépendant de l'IL-17A. Nos travaux mettent donc en lumière une double fonction de l'IL-22 dans l'asthme allergique chez la souris.

En parallèle de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle de l'IL-1 et de l'inflammasome NLRP3 dans ce même modèle d'inflammation pulmonaire.

Enfin, une troisième étude a permis de mettre en lumière un rôle encore inconnu de l'interleukine-33 dans l'activation des cellules dendritiques au cours de la mise en place de la réponse asthmatique.

Mots-clés : inflammation pulmonaire, asthme, IL-22, IL-17, IL-1, NLRP3 inflammasome, IL-33

Roles of interleukin-22 in a mouse model of allergic airways inflammation

Summary:

Asthma is a heterogeneous inflammatory disorder of the airways characterized by chronic airway inflammation, airway hyper-reactivity and by symptoms of recurrent wheezing, coughing and shortness of breath. Understanding of the role of allergy and Th2 cells in asthma has benefited from mouse model of allergic asthma. Recently, several studies highlighted Th17 involvement in asthma pathogenesis.

In the present study, we investigate the role of IL-22, a Th17-related cytokine, in a mouse model of allergic lung inflammation induced by ovalbumin. First, using IL-22 deficient mice, we demonstrated a pro-inflammatory role of IL-22 during the sensitization phase. In contrast, we observed a protective function of IL-22 during the effective phase. This protective effect of IL-22 seems to be dependent of IL-17. In conclusion, we demonstrate here a dual role of IL-22 in asthma pathogenesis.

Since interleukin-1 β is critical for Th17 polarization in human, we also investigated the role of IL-1 signalling and NLRP3 inflammasome in our model of allergic airway inflammation. We showed that NLRP3 inflammasome and IL-1R/IL-1 pathway are critical to induce allergic lung inflammation, even in the absence of adjuvant.

Finally, we studied the effect of interleukin-33 on dendritic cells activation and Th2 priming during antigen sensitization and in established asthma.

Keywords : lung inflammation, asthma, IL-22, IL-17, IL-1, NLRP3 inflammasome, IL-33



Institut d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire
UMR6218 – CNRS d'Orléans
3B rue de la Férollerie - 45071 Orléans cedex 2

