

Université de Montréal

**Rôle des cellules dendritiques SIRP α ⁺ dans l'asthme
expérimental**

Par

Marianne Raymond

Programme des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Septembre 2010

©Marianne Raymond 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Rôle des cellules dendritiques SIRP α ⁺ dans l'asthme
expérimental**

Présentée par :

Marianne Raymond

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Yves Raymond, Ph.D., Président-rapporteur

Marika Sarfati, M.D. Ph.D., Directeur de recherche

Benoit Laramée, M.D., Membre du jury

Devi Banerjee, M.D., Examineur externe

Jean-François Gauchat, Ph.D., Représentant du doyen de la FESP

Résumé

L'asthme est une maladie multifactorielle hétérogène qui engendre une inflammation pulmonaire associée à une variété de manifestations cliniques, dont des difficultés respiratoires graves. Globalement, l'asthme touche environ une personne sur 6 et présente actuellement un sérieux problème de santé publique. Bien que de nombreux traitements soient disponibles pour soulager les symptômes de la maladie, aucun traitement curatif n'est actuellement disponible. La compréhension des mécanismes qui régissent l'état inflammatoire au cours de la maladie est primordiale à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces.

Les cellules dendritiques captent les allergènes dans les poumons et migrent vers les ganglions drainants pour les présenter aux cellules T et engendrer la réponse inflammatoire pathogénique chez les asthmatiques. Nous avons contribué à l'avancement des connaissances mécanistiques de l'asthme en identifiant chez la souris la sous-population de cellules dendritiques responsable de l'initiation et du maintien de la réponse inflammatoire locale et systémique associée à l'asthme. En effet, nous avons démontré que le SIRP α , récepteur extracellulaire impliqué dans la régulation de la réponse immune, est sélectivement exprimé à la surface des cellules dendritiques immunogéniques. L'interruption de la liaison entre le SIRP α et son ligand, le CD47, interfère avec la migration des cellules dendritiques SIRP α ⁺ et reverse la réponse inflammatoire allergique. Ce mécanisme constitue une avenue thérapeutique prometteuse. D'ailleurs, les molécules de fusion CD47-Fc et SIRP α -Fc se sont avérées efficaces pour inhiber l'asthme allergique dans le modèle murin.

Nous avons également démontré l'implication des cellules dendritiques SIRP α dans un modèle d'inflammation pulmonaire sévère. L'administration répétée de ces cellules, localement par la voie intra-trachéale et systématiquement par la voie intra-veineuse,

mène au développement d'une réponse inflammatoire mixte, de type Th2-Th17, similaire à celle observée chez les patients atteints d'asthme sévère. La présence de cellules T exprimant à la fois l'IL-17, l'IL-4, l'IL-13 et le GATA3 a été mise en évidence pour la première fois *in vitro* et *in vivo* dans les poumons et les ganglions médiastinaux grâce à ce modèle. Nos expériences suggèrent que ces cellules Th2-Th17 exploitent la plasticité des cellules T et sont générées à partir de la conversion de cellules Th17 qui acquièrent un phénotype Th2, et non l'inverse.

Ces résultats approfondissent la compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et le maintien de l'asthme allergique et non allergique, en plus d'ouvrir la voie à l'élaboration d'un traitement spécifique pour les patients asthmatiques, particulièrement ceux pour qui aucun traitement efficace n'est actuellement disponible.

Mots-clés : Asthme, inflammation pulmonaire, cellules dendritiques, migration, CD47, SIRP α , Th2, Th17

Abstract

Asthma is a heterogeneous multifactorial disease resulting in airway inflammation associated with a variety of clinical manifestations, which include severe breathing difficulties. Asthma affects approximately one out of six people and is currently a serious public health problem. As of now, many treatments are available to relieve the symptoms of the disease, but no definitive cure is available. Understanding the mechanisms that regulate the inflammatory condition during the disease is essential to the discovery of effective new therapeutic targets.

Dendritic cells capture allergens in the lungs, migrate to the draining lymph nodes where they activate cognate T cells, which cause the pathogenic inflammatory response. My work help defined and deepened the mechanistic understanding of asthma by identifying the subpopulation of dendritic cells responsible for the initiation and maintenance of local and systemic inflammatory response. We demonstrated that SIRP α is selectively expressed on the surface of immunogenic dendritic cells. Indeed, the interruption of the ligation between SIRP α and its ligand, CD47, interferes with the migration of SIRP α ⁺ dendritic cells and reverses the allergic inflammatory response. This mechanism is a promising new therapeutic avenue. Moreover, we showed that the soluble fusion molecules CD47-Fc and SIRP α -Fc are potent inhibitors of the allergic asthma in a mouse model.

In addition, we demonstrated the involvement of SIRP α ⁺ dendritic cells in a model of severe airway inflammation induced upon local and systemic repeated administration of those cells. Either treatment led to the development of a mixed Th2-Th17 inflammation, a phenotype recently described in patients with severe asthma. This model allowed us to show the presence of T cells expressing at once IL-17, IL-4, IL-13 and GATA3 *in vitro* and *in vivo* in the lungs and in the mediastinal lymph nodes. Our results suggest that

these Th2-Th17 cells are generated from the conversion of Th17 cells acquiring a Th2 phenotype, and not the other way around, a hallmark of Th17 cells plasticity.

These results deepen the understanding of the mechanisms involved in the initiation and maintenance of allergic and non-allergic asthma. Besides, we open a way to the development of a specific treatment for asthmatic patients, particularly those for whom no effective treatment is currently available.

Keywords : Asthma, airway inflammation, dendritic cells, migration, CD47, SIRP α , Th2, Th17

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	V
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures	XI
Liste des abréviations	XIV
Remerciements.....	XV
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Introduction générale.....	1
1.2 Épidémiologie de l’asthme	1
1.3 L’immunologie de l’asthme	3
1.3.1 Mise à jour sur la différenciation des cellules T CD4.....	3
1.3.2 Généralités de l’asthme	8
1.3.3 Asthme extrinsèque.....	8
1.3.4 Asthme intrinsèque.....	18
1.4 Facteurs de risque.....	22
1.4.1 La génétique.....	23
1.4.2 Facteurs environnementaux.....	24
1.4.3 L’hôte	28
1.4.4 Les modifications épigénétiques	30
1.5 Traitement	31
1.5.1 Traitement de l’asthme extrinsèque	31
1.5.2 Traitement de l’asthme intrinsèque.....	32
1.6 Modèles expérimentaux.....	33
1.6.1 Modèles murins d’asthme	35

1.7	La molécule CD47 et ses partenaires.....	39
1.7.1	CD47	39
1.7.2	TSP.....	40
1.7.3	SIRP	41
1.8	Fonctions immunologiques du CD47	43
1.8.1	CD47-TSP.....	43
1.8.2	CD47-SIRP α : La tolérance du soi.....	44
1.8.3	CD47-SIRP α : La migration des cellules de l'immunité innée	45
1.8.4	CD47-SIRP α : La régulation de la réponse immune	47
1.9	Les souris déficientes en CD47	47
1.10	Mise en contexte de mon travail	49
2.	RÉSULTATS	50
2.1	Article I : Le contrôle sélectif de la migration des DC SIRP α ⁺ par le CD47 est essentiel au développement de l'inflammation allergique Th2.....	50
2.1.1	Abstract.....	55
2.1.2	Introduction	56
2.1.3	Matériel and Methods	58
2.1.4	Results	62
2.1.5	Figures.....	67
2.1.6	Discussion.....	75
2.1.7	References	78
2.2	Article II : Cibler SIRP α protège de l'inflammation pulmonaire allergique de type 2.....	82
2.2.1	Abstract.....	85
2.2.2	Introduction	86
2.2.3	Materials and Methods.....	88
2.2.4	Results	91
2.2.5	Figures.....	94
2.2.6	Discussion.....	100

2.2.7	References	103
2.3	Article III : Reprogrammation <i>in vivo</i> des cellules Th17 en Th17/Th2 par les DC SIRP α dans les poumons en conditions inflammatoires.....	106
2.3.1	Abstract.....	109
2.3.2	Introduction	110
2.3.3	Materials and Methods.....	112
2.3.4	Results.....	115
2.3.5	Figures.....	122
2.3.6	Discussion.....	134
2.3.7	References	139
3.	DISCUSSION.....	143
3.1	Mise en contexte	143
3.2	Les DCs dans l'asthme allergique.....	145
3.2.1	SIRP α : Un nouveau marqueur sélectif	146
3.2.2	CD47-SIRP α : Le contrôle de la migration des DCs SIRP α ⁺	147
3.2.3	DCs SIRP α ⁺ : La fonction immunogénique	150
3.2.4	Les DCs sont-elles essentielles dans l'asthme allergique?.....	151
3.3	Les DCs SIRP α ⁺ dans l'asthme non allergique	153
3.3.1	Un passage obligé à travers la barrière épithéliale?.....	156
3.3.2	Rôle des DC SIRP α ⁺ dans la plasticité fonctionnelle des Th17	160
3.4	DCs SIRP α ⁺ : Une cible thérapeutique?.....	164
3.4.1	Traiter avec le CD47-Fc et le SIRP-Fc	165
3.4.2	Des effets indésirables potentiels?.....	170
3.4.3	De la souris à l'humain : Est-ce réaliste?	171
4.	CONCLUSIONS	173
4.1	Comment nos résultats contribuent à l'avancement des connaissances?	173
4.2	Perspectives	174
	Bibliographie	176

Liste des tableaux

Tableau I. Caractéristiques de l'asthme chez l'humain et chez la souris.	36
---	----

Liste des figures

Figure 1. Développement des lignées Th1, Th2 et Th17.	4
Figure 2. Interaction entre les cellules épithéliales, les DCs et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique.	10
Figure 3. Phase de sensibilisation à l'allergène dans les voies respiratoires.....	12
Figure 4. Phase tardive de l'asthme allergique.....	14
Figure 5. Phase chronique de l'asthme allergique.....	17
Figure 6. Comparaison de l'inflammation bronchique chez un patient asthmatique et un patient atteint de MPOC.....	19
Figure 7. Gènes de susceptibilité de l'asthme.	24
Figure 8. Structure du CD47.....	40
Figure 9. Interactions entre les membres de la famille SIRP et leurs ligands.	41
Figure 10. Hypothèse de l'interaction CD47-SIRP α dans la migration des DC SIRP α	148
Figure 11. IL-17 dans les ganglions médiastinaux selon le schéma d'induction de l'inflammation pulmonaires.....	155
Figure 12 Schéma récapitulatif de l'inflammation pulmonaire sévère à composantes mixtes Th17/Th2.	163
Figure 13 Schéma récapitulatif de l'asthme allergique et de l'interaction des molécules de fusion.	168

Article I

Figure 1.1 CD11b ^{high} CD103 ⁻ DCs preferentially expressed SIRP- α and are recruited during allergic airway inflammation.	67
Figure 1.2 CD47 deficiency reduces the severity of experimental allergic asthma.....	68
Figure 1.3 CD47 selectively controls airway CD11b ^{high} CD103 ⁻ SIRP- α ⁺ DC migration at steady state and during allergic airway disease.	69

Figure 1.4 CD47 regulates airway SIRP- α DC-driven Th2 responses.	70
Figure 1.5 Local delivery of SIRP- α^+ CD47 $^{+/+}$ DCs elicits a strong Th2 response in CD47 $^{-/-}$ mice.....	71
Figure 1.6 CD47 expression on SIRP- α DCs is required to promote Th2-mediated airway inflammation.....	72
Figure 1.7 Targeting CD47 protects BALB/c mice from Th2-mediated airway allergic inflammation.....	73
Figure 1.8 (Supplementary Fig 1) Phenotype and functional properties of BMDCs.	74

Article II

Figure 2.1 CD47-Fc delivered at priming inhibits airway inflammation.	94
Figure 2.2 CD47-Fc delivered at priming suppresses late Th2 responses <i>in vivo</i>	95
Figure 2.3 CD47-Fc does not impair Th2 priming and effector function <i>in vitro</i>	96
Figure 2.4 CD47-Fc alters SIRP α^+ DC migration to mLN and Th cell priming <i>in vivo</i>	97
Figure 2.5 SIRP- α ligation on BMDC <i>in vitro</i> impairs Th cell priming <i>in vivo</i>	98
Figure 2.6 (Supplementary Figure 1) Differential cell count in BALF using flow cytometry.	99

Article III

Figure 3.1 Repetitive local administration of OVA-DC induces an IgE-independent Ag-specific Th17 response.....	122
Figure 3.2 Systemic injection of OVA-DC induces Ag-specific Th17-associated airway inflammation.....	123
Figure 3.3 Local and systemic administration of OVA-DC induces double IL-17 $^+$ IL-13 $^+$ producing T cells in mLNs.	124
Figure 3.4 Temporal windows of airway inflammation and induction of IL-17 $^+$ IL-13 $^+$ CD4 $^+$ T cells in mLNs of mice repeatedly immunized with DCs.	125

Figure 3.5 Inflammatory DCs and TCR stimulation are necessary to initiate Th17 responses.	126
Figure 3.6 <i>In vitro</i> conversion of Th17 but not Th2 polarized T cells into Th17 ⁺ Th2 ⁺ cells.	127
Figure 3.7 Identification of IL-17 ⁺ IL-13 ⁺ IL-4 ⁺ CD4 ⁺ T (Th17 ⁺ Th2 ⁺) cells that express GATA-3 in inflamed lung tissues.	128
Figure 3.8 Airway host DCs convert effector CD4 ⁺ T cells into Th17 ⁺ Th2 ⁺ cells <i>in vitro</i>	129
Figure 3.9 (Supplementary Fig 1) Repetitive local injection of OVA-DC induces a corticosteroid-resistant Th17 airway inflammation.	130
Figure 3.10 (Supplementary Fig 2) <i>In vivo</i> trafficking of DC injected IV to lungs and mLN.	131
Figure 3.11 (Supplementary Fig 3) Early IL-17 production in mLN cells, lungs and BALF of mice repeatedly immunized with DCs.	131
Figure 3.12 (Supplementary Fig 4) LPS titration in OVA protein.	132
Figure 3.13 (Supplementary Fig 5) Th17 ⁺ Th2 ⁺ lung CD4 ⁺ T cells that express GATA-3 do not produce IFN- γ	132
Figure 3.14 (Supplementary Fig 6) OVA-DCs convert lung effector CD4 ⁺ T cells into Th17 ⁺ Th2 ⁺ cells that express GATA-3 <i>in vitro</i>	133

Liste des abréviations

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
DC : Cellule dendritique
EMTU : Epithelial-mesenchymal tropic unit
FcεRI : Récepteur IgE de haute affinité
FoxP3 : Forkhead box P3 protein
GATA3 : GATA-binding protein 3
GINA : Global Initiative for Asthma
IFN γ : Interféron gamma
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
MPOC : Maladies pulmonaires obstructives chroniques
NK : Natural killer
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PAR : Protease activated receptor
PRR : Pattern recognition receptor
ROR γ t : Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- γ t
SCF : Stem cell factor
STAT : Signal transducer and activator of transcription
T-bet : Transcription factor T-box
TcR : Récepteur des cellules T
Tfh : T auxiliaires folliculaires
TGF β : Transforming growth factor beta
Th : T effecteur auxiliaire (T helper)
TLR : Toll-like receptor
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
Treg : T régulatrices
TSLP : Thymic stromal lymphopoietin

Remerciements

J'aimerais d'abord exprimer ma sincère gratitude à Dre Marika Sarfati qui, depuis les 5 dernières années, a fait beaucoup plus que de me superviser et m'encadrer. L'expérience de mon doctorat a été des plus enrichissantes grâce à vous, tant sur le plan personnel que scientifique. Un merci particulier pour tout le temps, le dévouement et le savoir que vous avez partagés avec moi. Je vous dois également toute ma reconnaissance pour les opportunités de stages techniques et des congrès à l'étranger qui ont grandement enrichi mon bagage. Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir ainsi ouvert sur le monde et de m'avoir fait tant grandir.

Ce fut aussi un privilège de travailler et de discuter avec Dr Guy Delespesse, qui a su piquer ma curiosité scientifique. Ses encouragements et son optimisme vis-à-vis mes travaux m'ont apporté beaucoup de motivation. Ce fut également un plaisir de travailler avec Manuel Rubio, Vu Vang Quang, Geneviève Fortin, Salim Boughermouh, Julie Martel, Nobuyasu Baba et Keiko Wakahara. Je vous remercie tous de m'avoir offert votre aide, votre savoir, votre temps ainsi que votre bagage culturel si enrichissant. Un merci particulier à Manu et à Quang pour votre aide précieuse et votre patience, spécialement lors des soirées tardives.

Mes remerciements vont aussi aux membres du jury, Dr Yves Raymond, Dr Benoit Laramée, Dre Devi Banerjee et à Dr Jean-François Gauchat qui ont accepté de juger mon travail, ainsi qu'à l'Université de Montréal, soit à la faculté de médecine et à la faculté des études supérieures pour le support financier et administratif.

J'aimerais témoigner mes sincères remerciements à tout le personnel de l'animalerie, à ma petite sœur Isabelle et à mes amis, plus particulièrement à Véronique pour son énergie et son soutien et à Jean-Simon pour les discussions scientifiques et l'aide précieuse. Je ne saurais également passer sous le silence la patience et le support que Jean-Philippe m'a apportés. Je me considère particulièrement privilégiée d'avoir sans relâche été aussi bien entourée par vous tous.

Pour terminer, j'aimerais porter une mention spéciale à mes parents, sans qui tout ce cheminement n'aurait pas été possible. Vos encouragements, votre soutien, votre optimisme et votre amour inconditionnel m'ont donné énormément d'énergie et m'ont menée avec succès jusqu'ici.

Plus j'apprends, moins je sais.

1. INTRODUCTION

1.1 Introduction générale

L'asthme, du latin "asthma" signifiant "essoufflement", est défini aujourd'hui comme une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires. L'asthme se caractérise par de l'hyperréactivité bronchique en réponse à des stimuli spécifiques ou non spécifiques. La sécrétion excessive de mucus, l'épaississement de la paroi des bronches, le remodelage tissulaire aboutissent à l'obstruction bronchique et par conséquent provoquent des difficultés respiratoires graves (Galli et al., 2008b). Les symptômes peuvent survenir à différents moments de la journée, à une fréquence variable et entraîner des problèmes indésirables tels la fatigue, l'insomnie, la réduction des activités physiques, ce qui entraîne de l'absentéisme au travail ou à l'école, etc. Bien qu'une multitude de traitements soit disponible pour soulager les symptômes de la maladie, aucun traitement curatif n'a jusqu'à maintenant vu le jour. L'asthme est une maladie multifactorielle hétérogène, associée à une variété de manifestations cliniques et de réponses thérapeutiques, qui défie encore médecins et chercheurs.

1.2 Épidémiologie de l'asthme

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime actuellement le nombre de sujets asthmatiques à 300 millions à travers le monde. L'asthme remporte le palmarès des maladies chroniques les plus répandues chez l'enfant, sans discrimination territoriale et atteint également un grand nombre d'adultes. D'un point de vue socio-économique, les coûts directs (hospitalisation et médication) et indirects (absentéisme, mort prématurée) liés à l'asthme sont substantiels. Mondialement, on estime que l'asthme engendre des coûts supérieurs à ceux du VIH/SIDA et de la tuberculose réunis. Par conséquent, l'OMS reconnaît que l'asthme est une maladie d'importance majeure en santé publique et elle a mis en place une stratégie pour lutter contre la maladie (OMS, 2008; OMS).

D'une région à l'autre, la prévalence de l'asthme varie énormément, passant de 1% en Éthiopie à 18% dans certains pays d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Globalement, l'asthme touche davantage les habitants des pays développés que sous-développés (GINA, 2009). De plus, à l'intérieur d'un même pays, la prévalence de l'asthme est clairement moindre dans les régions rurales comparativement aux grands centres urbains, ainsi que chez les enfants de grande famille et ceux qui côtoient les garderies (Yazdanbakhsh et al., 2002). Au Canada, 8,4% de la population de plus de 12 ans est déclarée asthmatique en 2008, c'est-à-dire plus de 2 millions de Canadiens. La maladie touche tous les groupes d'âges, bien que la prévalence soit plus élevée chez les enfants et les adolescents que chez les adultes, alors que les femmes sont plus susceptibles que les hommes. Le nombre de cas est stable depuis plusieurs années au pays, sans toutefois rapporter d'amélioration dans les statistiques, alors que les décès liés à l'asthme sont heureusement en déclin depuis une vingtaine d'années (Statistique-Canada, 2009).

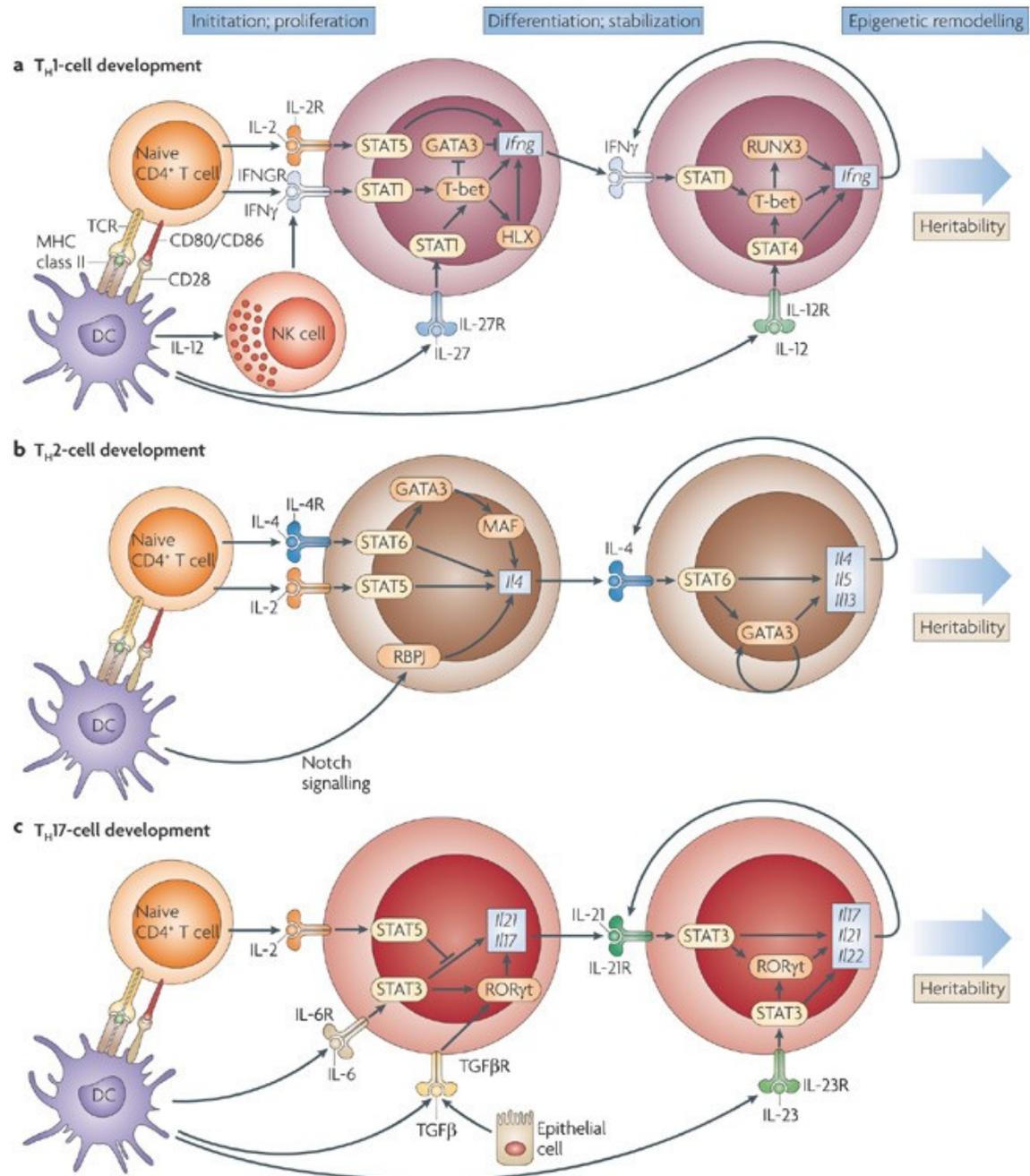
Bien que certaines études supposent un déclin actuel de l'asthme dans plusieurs régions du globe, un groupe a récemment publié une recherche systématique et exhaustive rassemblant les études épidémiologiques publiées entre 1990 et 2008 sur l'asthme. Les résultats sont clairs; aucun signe de déclin global de la prévalence de l'asthme n'est actuellement observable. Au contraire, de nombreuses régions montrent encore une augmentation de l'incidence. Toutefois, il est vrai que la sévérité de l'asthme et les soins d'urgence auprès des asthmatiques se voient diminuer dans certains pays développés, probablement grâce à l'amélioration de la qualité des soins apportés aux patients (Anandan 2010). Malgré que la situation des décès liés à l'asthme semble s'améliorer depuis plusieurs années, la GINA estime qu'encore 250 000 asthmatiques meurent chaque année en raison de la maladie. Plus de 80% des décès surviennent dans les pays sous-développés (GINA, 2009).

1.3 L'immunologie de l'asthme

Avant d'étudier l'aspect immunologique de l'asthme, il est primordial d'avoir en tête le développement de la réponse T effectrice, vu son implication dans la maladie. De façon générale, trois différentes lignées de cellules Th (T effectrice auxiliaires; T helper) CD4 ont jusqu'à maintenant été définies : les cellules effectrices Th1, Th2, Th17 (**Figure 1**). L'environnement de cytokines, le type de signal donné ainsi que les facteurs de transcription sollicités lors de l'activation des cellules T naïves orientent la réponse T vers l'une de ces populations effectrices (Zhu and Paul, 2010). D'autres "lignées" potentielles de cellules T ont été décrites, bien qu'elles ne présentent pas un profil de cytokines et de facteurs de transcription exclusifs.

1.3.1 Mise à jour sur la différenciation des cellules T CD4

Th1. Brièvement, l'inflammation Th1 est une réponse à médiation cellulaire conçue pour cibler les envahisseurs intracellulaires comme les protozoaires. Les peptides dérivés de ces microorganismes engendrent un fort signal en se liant au TcR (récepteur des cellules T; T cell receptor), favorisant le développement d'une réponse Th1, c'est-à-dire la production d'IFN γ (interféron γ) par les cellules T (Placek et al., 2009). Le facteur de transcription STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1) est activé par l'IFN γ et/ou l'IL (interleukine)-27 et induit l'expression de T-bet (transcription factor T-box) de manière à orchestrer la réponse Th1 et la production d'IFN γ supplémentaire. La cellule présentatrice d'antigène produit également de l'IL-12 en réponse à l'activation des TLR (toll-like receptor) et induit l'expression de T-bet par l'intermédiaire de STAT4 et de l'IFN γ (Wilson et al., 2009a). Une déficience de la réponse Th1 réduit la résistance aux mycobactéries alors qu'une réponse inappropriée ou excessive est impliquée dans certains désordres autoimmuns (Zhu et al., 2010).



Nature Reviews | Immunology

Figure 1. Développement des lignées Th1, Th2 et Th17.

Tiré de Wilson C.B. et al., Nature Reviews Immunology, issue 9, February 2009, 91-105.

Th2. La réponse Th2, responsable des maladies allergiques et de l'asthme, est spécialisée dans la protection contre les parasites extracellulaires comme les helminthes (Murphy and Reiner, 2002). L'initiation de la réponse prend place à la surface de la peau, des poumons et des intestins. Le signal provenant de l'extérieur de l'organisme interagit avec les composantes de l'immunité innée, soit les cellules épithéliales, les DCs (cellules dendritiques), les basophiles et possiblement d'autres cellules, qui produisent les cytokines responsables de la différenciation des cellules T naïves en cellules Th2. Les DCs et les basophiles servent de cellules présentatrices d'antigènes, selon la nature de l'antigène. Ces cellules peuvent être directement activées par l'agresseur ou encore par l'entremise de cytokines produites par les cellules épithéliales, incluant la TSLP (thymic stromal lymphopoietin), l'IL-25 et l'IL-33 (Paul and Zhu, 2010). L'engagement du TcR de la cellule T CD4 naïve par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II de la cellule présentatrice d'antigène induit classiquement la production d'IL-2 et d'IL-4 par les cellules T, capables d'activer STAT5 et STAT6 respectivement, qui mènent à la production d'IL-4 supplémentaire et amplifient en boucle la réponse inflammatoire de type Th2. La signalisation résultant de la liaison de l'IL-4 avec son récepteur passe par GATA3 (GATA-binding protein 3), qui entraîne l'expression des gènes associés aux cytokines IL-4, IL-5 et IL-13, propre à l'inflammation de type Th2 (Zhu et al., 2010). L'IL-4 est aussi responsable de la production d'IgE (immunoglobuline E) par les cellules B (Paul and Zhu, 2010). Les cellules NK (natural killer), les cellules NKT, les cellules T $\gamma\delta$, les macrophages, les cellules B, les éosinophiles et les mastocytes participent aussi à l'initiation et à l'amplification de la réponse Th2 en créant un environnement de cytokines pro-Th2 (Paul and Zhu, 2010). *In vitro*, il est possible de différencier des cellules T CD4 naïves en cellules Th2 en présence d'IL-4 et d'une stimulation du TcR avec un antigène spécifique présenté par une cellule présentatrice d'antigène. La stimulation polyclonale avec l'anticorps anti-CD3 combinée à l'anticorps anti-CD28 mènent également à la polarisation Th2 (Murphy and Reiner, 2002; Zhu et al., 2010).

Th17. Ce n'est qu'au début du XXI^{ème} siècle qu'il a été démontré que les cellules productrices d'IL-17 sont une lignée de cellules T auxiliaires distincte des lignées Th1 et Th2 (Infante-Duarte et al., 2000). Nécessaire pour combattre certaines bactéries et les champignons extracellulaires, la réponse Th17 implique l'activation de STAT3, qui entraîne l'expression de ROR γ t (retinoic-acid-receptor-related orphan receptor- γ t) et la production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22. Après leur différenciation, les cellules Th17 expriment le récepteur à l'IL-23 et répondent à l'IL-23 qui amplifie la réaction (Wilson et al., 2009a; Zhu et al., 2010). La différenciation Th17 *in vitro* requiert la présence d'IL-6 et de TGF β (transforming growth factor β) et est amplifiée par l'IL-23 chez la souris alors qu'avec les cellules humaines, l'IL-1 β , l'IL-23 et possiblement une faible dose de TGF β sont nécessaires (Mills, 2008). Les cellules Th17 pathogènes ont été impliquées dans l'arthrite, l'encéphalomyélite et la colite chez la souris (Langrish et al., 2005; Nakae et al., 2003).

Tfh. Récemment, une nouvelle lignée a émergé : les cellules Tfh (T auxiliaires folliculaires; T follicular helper). Les Tfh résident dans les centres germinaux, où ils contrôlent la commutation de classe et l'hypermutation somatique, processus impliqué dans la production d'anticorps par les cellules B avec lesquelles ils sont en contact. Les Tfh produisent de l'IL-4 et de l'IFN γ . À savoir s'il s'agit d'une lignée indépendante ou un état phénotypique de chacune des lignées déjà décrites, de plus amples études seront nécessaires pour éclaircir ce concept (King et al., 2008). Dans un modèle d'infection aux helminthes, les cellules Th2 semblent être à l'origine des cellules Tfh, alors que dans l'intestin, il a été proposé qu'elles dérivent des cellules Treg (T régulatrices) (Tsuji et al., 2009; Zaretsky et al., 2009).

Régulation. La fonction effectrice de toutes les réponses T auxiliaires est régulée entre autre par les cellules Treg. Grâce à leurs propriétés suppressives, les cellules Treg assurent le contrôle de la réponse inflammatoire. Ces cellules sont CD4⁺CD25⁺ et expriment le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box P3), essentiel à leur

développement et leurs fonctions (Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Elles jouent un rôle important dans la limitation des dommages liés à l'inflammation, des maladies auto-immunes et dans le maintien de la tolérance (Ray et al., 2010).

D'étroites régulations et interactions existent également entre les différentes lignées de cellules T auxiliaires. Les facteurs de transcriptions exprimés par une lignée répriment la production de cytokine des autres lignées. GATA3 inhibe la différenciation Th1 et Th17 alors que T-bet inhibe la transcription du gène *il4*, essentiel au développement Th2, et interfère avec la différenciation Th17 (Usui et al., 2003; Wilson et al., 2009a). Les cytokines d'une lignée sont aussi impliquées dans le processus de répression des autres lignées. Par exemple, l'IL-4 et l'IFN γ inhibent la différenciation Th17 alors que le TGF β inhibe la différenciation Th1 et Th2 (Wilson et al., 2009a; Zhu et al., 2010). Des modifications épigénétiques ainsi que l'IL-10, produite par les cellules Th1, Th2, Th17 et Treg sont d'autres éléments importants du contrôle de la réponse T auxiliaire (O'Garra and Vieira, 2007; Wilson et al., 2009a). Finalement, la nature et la force du signal font varier l'orientation de la réponse. Il a en effet été démontré que l'activation du TLR4 par un faible niveau de lipopolysaccharides (LPS) entraîne une réponse Th2 alors qu'un signal soutenu et une forte activation à partir d'une grande quantité de LPS induisent plutôt une réponse Th1 (Eisenbarth et al., 2002). L'engagement du TLR2, récepteur de plusieurs produits microbiens incluant le peptidoglycane, induit plutôt une réponse Th17 (Reynolds et al., 2010).

Tel que mentionné, l'asthme dérive classiquement d'un défaut de la réponse immunitaire de type Th2. Toutefois, chez certains individus atteints d'asthme sévère, des cellules Th17 sont aussi attirées dans les poumons et contribuent au recrutement de neutrophiles (Alcorn et al., 2010). Il a également été démontré que la réponse Th1 peut agir en synergie avec la réponse Th2 et augmenter la gravité de la maladie. La présence de composantes Th1 et/ou Th17 est corrélée avec la sévérité de l'asthme ainsi que la réponse au traitement avec les glucocorticoïdes, efficace pour contrôler une réponse Th2 typique.

1.3.2 Généralités de l'asthme

L'asthme classique a été largement étudié et fait toujours l'objet de recherche intensive. La maladie est caractérisée par une infiltration bronchique éosinophilique et une réaction allergique systémique en réponse à de faibles doses d'antigènes innocuitaires, les allergènes. En 1947, Rackemann décrit un groupe de patients qui développe des symptômes similaires à ceux des patients atteints d'asthme allergique mais avec des caractéristiques supplémentaires spécifiques : ces patients répondent moins bien aux traitements standards par les corticostéroïdes, développent généralement la maladie à l'âge adulte et sont principalement de sexe féminin. De plus, la maladie n'est pas associée à une allergie, à un facteur environnemental connu, à un historique génétique ou à une autre cause identifiable. Cette pathologie est surnommée "l'asthme intrinsèque" et par conséquent l'asthme classique devient "l'asthme extrinsèque" (Rackemann, 1947). Depuis, cette classification s'est complexifiée et englobe aujourd'hui plusieurs pathologies inflammatoires pulmonaires différentes. Malgré que plusieurs groupes se soient penchés sur la question et aient fait des propositions, il n'existe toujours pas de consensus quant à la classification des différentes manifestations de la maladie (Moore et al., 2010). En plus de l'asthme extrinsèque / intrinsèque, on peut également lire asthme allergique / non-allergique, éosinophilique / non-éosinophilique, sensible / résistant aux corticostéroïdes, modéré / sévère (Oboki et al., 2008). Il n'en reste pas moins que ces maladies semblent représenter des entités distinctes par l'historique du patient, l'âge auquel les symptômes font leurs apparitions, le type d'inflammation pulmonaire impliqué, la sévérité de la pathologie et la réponse aux traitements.

1.3.3 Asthme extrinsèque

L'asthme allergique classique présente plusieurs caractéristiques de la réponse inflammatoire résultant de l'infection avec des parasites extracellulaires comme les helminthes intestinaux et les tiques, c'est-à-dire le développement d'une réponse

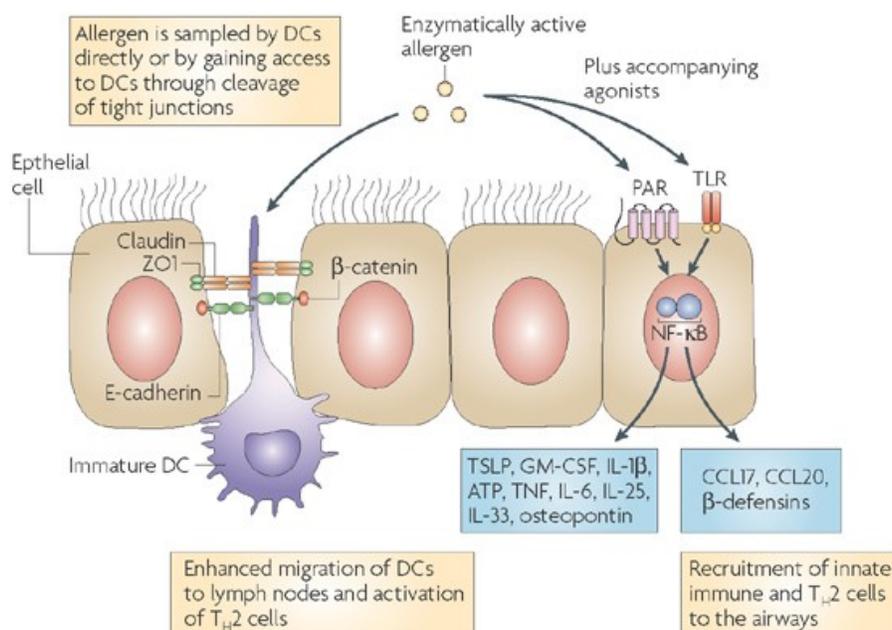
systémique de type Th2 combinée à la présence d'IgE spécifique à un antigène donné (Galli et al., 2008b). Cette réponse implique toutefois des antigènes normalement inoffensifs, contre lesquels est montée une réponse allergique. Le cours de la maladie peut être divisé en une suite d'étapes: la phase de sensibilisation, c'est-à-dire la mise en place d'un état inflammatoire de type allergique suivie des phases dites immédiate, tardive et chronique de l'asthme.

Barrière épithéliale. Que ce soit lors de la phase de sensibilisation ou au cours d'une exposition subséquente, le passage de l'antigène à travers la barrière épithéliale est crucial pour l'établissement d'une réponse inflammatoire. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette étape et engendrent une variété de symptômes.

L'épithélium des voies respiratoires, lorsqu'intact, est étanche et joue un rôle de première ligne de défense entre le monde extérieur et le système immunitaire; il forme une barrière physique et physiologique contre les pathogènes et les allergènes. L'épithélium est composé d'une couche unique de cellules épithéliales, d'une couverture de microcils ainsi que de cellules sécrétant du surfactant et du mucus, dans lequel s'accumulent plusieurs substances antimicrobiennes sécrétées par les cellules épithéliales (Holgate, 2007; Kato and Schleimer, 2007; Schleimer et al., 2007). Ces dernières expriment aussi des PRR (pattern recognition receptors), des récepteurs capables de reconnaître différents types d'agresseurs. Les TLR, activés par des produits microbiens, font partie des PRR et sont exprimés également par les DCs (**Figure 2**). Les cellules épithéliales expriment aussi des PAR (protease activated receptors) spécifiques aux antigènes protéolytiques, qui ont la capacité de fragmenter des protéines, comme l'antigène Der p1 des acariens, les spores d'*Aspergillus* et le pollen de l'herbe à poux (Tai et al., 2006; Wan et al., 1999).

Les cellules épithéliales sont intimement reliées par une structure complexe, les jonctions serrées, formées de nombreuses protéines transmembranaires et protéines adaptives.

Des DCs immatures sont stratégiquement situées dans les voies respiratoires pour échantillonner constitutivement le contenu des produits avec lesquels nous entrons en contact (Banchereau and Steinman, 1998). Certaines de ces sentinelles étendent leurs dendrites jusqu'à la lumière des voies respiratoires grâce à la formation de jonctions occlusives avec les cellules épithéliales, sans interférer avec leurs fonctions (Lambrecht and Hammad, 2009; Sung et al., 2006). La **Figure 2** illustre cette interaction.



Nature Reviews | Immunology

Figure 2. Interaction entre les cellules épithéliales, les DCs et les allergènes à l'interface de la muqueuse bronchique.

Tiré de Hammad H. and Lambrecht B.N., Nature Reviews Immunology, March 2008, issue 8, 193-204.

C'est donc en interagissant avec les récepteurs à la surface des cellules épithéliales ou des DCs que les antigènes entrent en contact avec le système immunitaire. Les antigènes ayant des propriétés enzymatiques sont capables de cliver les molécules des jonctions serrées, ce qui entraîne l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium et l'altération de ses fonctions protectrices (Jeong et al., 2008; Kauffman et al., 2006; Wan et al., 1999). D'ailleurs, toute altération de l'intégrité de la barrière épithéliale, qu'elle

soit liée à un défaut génétique ou à l'attaque par un agresseur, augmente le risque de développer une réponse immunitaire inappropriée pouvant causer l'asthme allergique.

Phase de sensibilisation. L'asthme classique est le résultat d'une allergie et par conséquent, nécessite une phase de sensibilisation à l'antigène contre lequel le patient réagit. Dans le cas de l'asthme allergique, la sensibilisation a lieu au niveau des voies respiratoires. L'antigène est pris en charge par les DCs des voies respiratoires qui s'activent et migrent vers les ganglions médiastinaux qui drainent les poumons. Le récepteur de chimiokine CCR7 et ses ligands CCL21 et CCL19 sont impliqués dans leur processus de migration (Humrich et al., 2006). L'antigène est présenté aux cellules T par les molécules du CMH de classe II, initiant la conversion des cellules T CD4 naïves en cellules Th2. Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et interagissent avec les cellules B qui produisent des IgE, qui diffusent localement et gagnent la circulation lymphatique et sanguine pour enfin être distribuées systématiquement. Cette interaction des cellules T et des cellules présentatrices d'antigène implique la co-stimulation de CD28 et CD40 ligand sur la cellule T, qui interagissent respectivement avec le CD80 ou CD86 et le CD40 (Galli et al., 2008b; Geha et al., 2003). Il a été proposé que les basophiles sont aussi capables d'induire une telle réponse (Sokol et al., 2008). Les IgE spécifiques et non-spécifiques se lient aux récepteurs IgE de haute affinité (FcεRI) à la surface des mastocytes. Cette phase de la réponse allergique est asymptomatique mais met en veille un état inflammatoire prêt à répondre rapidement en cas d'exposition subséquente des voies respiratoires à l'allergène (Galli et al., 2008b) (**Figure 3**).

Phase immédiate. Dans les minutes suivant une nouvelle exposition à l'allergène contre lequel un individu est sensibilisé, les mastocytes et les IgE montent une réaction d'hypersensibilité immédiate qui mène rapidement à l'inflammation des voies respiratoires. En effet, l'allergène est reconnu par des IgE spécifiques, liés aux FcεRI à la

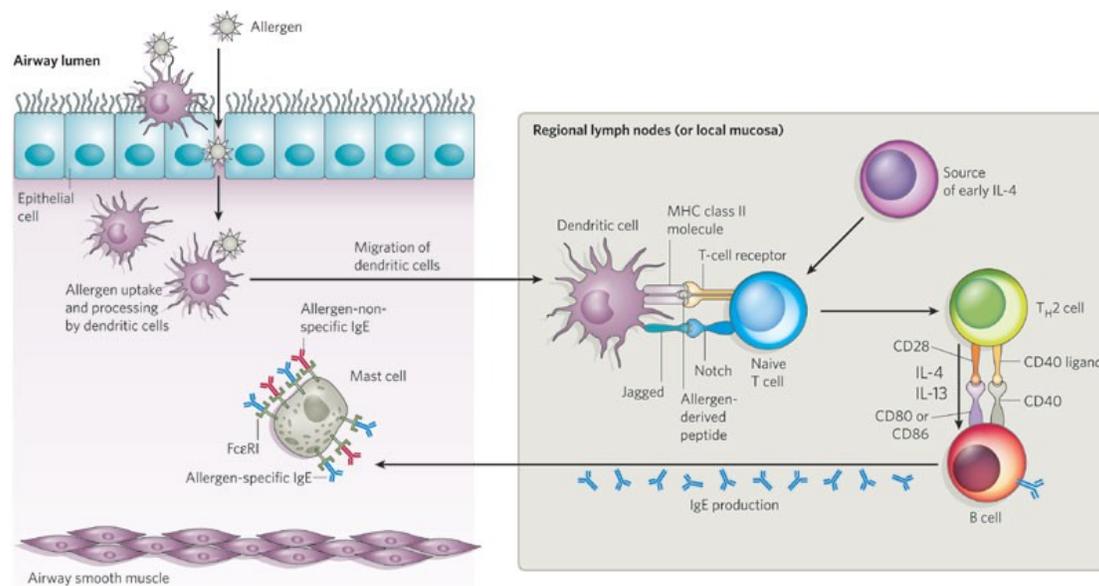


Figure 3. Phase de sensibilisation à l'allergène dans les voies respiratoires.

Tiré de Galli S.J. et al., July 2008, *Nature*, issue 454, 445-454.

surface des mastocytes. Le complexe IgE/allergène induit l'agrégation des récepteurs, activant les mastocytes qui libèrent immédiatement le contenu de leurs granules cytoplasmiques, sécrètent des médiateurs lipidiques et synthétisent de nouveaux facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines proinflammatoires. Lors de la dégranulation, les mastocytes libèrent des médiateurs préformés, incluant l'histamine, des protéoglycans, des protéases et certaines cytokines, principalement le TNF- α (tumor necrosis factor- α) ainsi que la sérotonine chez la souris. Les leukotriènes et les prostanoïdes sont des lipides nouvellement synthétisés sécrétés rapidement après un contact avec l'allergène. Ces médiateurs précoces induisent à différents niveaux la bronchoconstriction, la vasodilatation, la production de mucus, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et préparent la phase tardive en attirant de nombreuses cellules inflammatoires impliquées dans la pathophysiologie de l'asthme. Les manifestations cliniques qui en résultent sont maximales et peuvent être dramatiques (Galli et al., 2008b; Holgate, 2008). Les basophiles, qui expriment également des Fc ϵ RI à leur surface, réagissent sensiblement de la même façon que les mastocytes à l'exposition de

l'antigène après sensibilisation à quelques exceptions près. Le récepteur de prostaglandine de type 2, par exemple, n'est pas exprimé par les basophiles, comparativement aux mastocytes (Stone et al., 2010). Bien que les éosinophiles soient aussi munis de granules, la présence de récepteurs de haute ou de faible affinité pour l'IgE reste controversée (Hogan et al., 2008).

Phase tardive. Lors de son arrivée dans les voies respiratoires, l'allergène donne des signaux à l'épithélium bronchique qui varient selon la nature de l'allergène et de son mode d'entrée. Dans les heures qui suivent l'exposition à l'allergène, on observe une production de cytokines et d'autres médiateurs par les cellules épithéliales qui polarisent et amplifient la réponse Th2. La TSLP et l'IL-33, cytokines clés dans ce processus, activent et programment les DCs à induire une réponse Th2 en régulant positivement l'OX40 ligand (OX40L) en plus d'interagir directement avec les mastocytes en stimulant la production de cytokines Th2 (Galli et al., 2008b). Les DCs migrent ainsi vers les ganglions médiastinaux et interagissent avec les cellules T de manière à polariser une réponse Th2. L'IL-4 et l'IL-13 produites par les cellules T augmentent la synthèse d'IgE. Ces cellules sont programmées pour retourner aux poumons en réponse à des cytokines et chimiokines produites par les cellules intrinsèques (Hammad and Lambrecht, 2008; Voehringer et al., 2006). Une fois au site inflammatoire, les cellules Th2 jouent leur rôle effecteur en produisant d'autres cytokines et chimiokines (**Figure 4**). L'IL-4 et l'IL-13, en plus de maintenir la synthèse d'IgE, induisent l'activation des DCs et des macrophages, l'hyperréactivité bronchique, le remodelage et la production d'éotaxine responsable de l'éosinophilie (Munitz et al., 2008). L'IL-5 joue un rôle primordial dans la différenciation, le développement, l'activation, la survie et la réponse des éosinophiles. Bien que les éosinophiles soient un marqueur de référence dans l'asthme allergique, leur rôle dans l'inflammation Th2 des voies respiratoires est questionnable. Ils contribuent au remodelage et au maintien de l'inflammation mais ne semblent pas essentiels à l'hyperréactivité bronchique (Rothenberg and Hogan, 2006). L'IL-9 est aussi sécrétée par les cellules Th2 et favorise la sécrétion d'IL-5 et d'IL-13 par

les cellules non T, en plus d'être responsable de la migration et de l'infiltration des mastocytes dans les voies respiratoires (Finkelman et al., 2010; Temann et al., 2002). La production de ces cytokines combinée à la libération de médiateurs par les cellules épithéliales et les autres membres de l'immunité innée, dont les mastocytes et les basophiles, maintiennent un environnement inflammatoire responsable des signes et symptômes de l'asthme allergique. En effet, le TNF- α et l'IL-5 sécrétés par les mastocytes activent les cellules de l'immunité innée tandis que l'IL-10, le TNF- α et le TGF- β affectent les cellules B, les cellules T et les DCs. D'autres médiateurs relâchés par les mastocytes influencent aussi les cellules structurales, c'est-à-dire les cellules

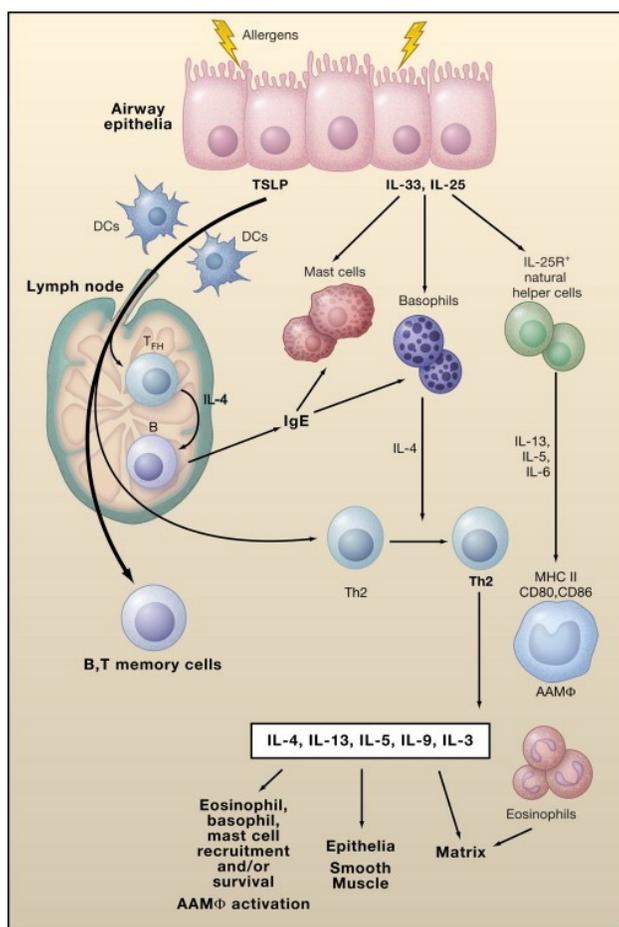


Figure 4. Phase tardive de l'asthme allergique.

Tiré de Locksley R.M., *Cell*, March 2010, issue 6, 777-83.

endothéliales vasculaires, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. Chez la souris, il a également été démontré que la TSLP induit le développement des cellules T et B et possiblement l'activation des macrophages et des éosinophiles (Galli et al., 2008a; Hammad and Lambrecht, 2008; Kato and Schleimer, 2007; Rochman and Leonard, 2008; Voehringer et al., 2006). De plus, l'IL-25 produite par les cellules épithéliales induit la production de cytokines Th2 et le recrutement de cellules inflammatoires, alors que les facteurs de croissance agissent sur les cellules structurales du poumon en plus de contribuer à l'activation et la survie des cellules de l'immunité innées (Barnes, 2008b; Barrett and Austen, 2009).

Soulignons le rôle essentiel des DCs non seulement lors de la phase de sensibilisation mais également au cours de la phase effectrice de l'asthme. Les DCs deviennent jusqu'à mille fois plus sensibles à l'allergène en présence d'IgE spécifiques liés aux récepteurs FcεRI (Maurer et al., 1998). D'ailleurs, la déplétion des DCs chez la souris au moment de la réexposition à l'allergène empêche le développement d'une réponse inflammatoire asthmatique (van Rijt et al., 2005). Chez les patients, les DCs myéloïdes s'accumulent dans les poumons en réponse à l'allergène (Jahnsen et al., 2001). Les produits microbiens ou les cytokines pro-inflammatoires sécrétées très tôt durant la cascade par les cellules épithéliales induisent la maturation des DCs pulmonaires, l'expression du CMH de classe II et de molécules de costimulation nécessaires à l'activation et la différenciation des cellules T. D'autres DCs sont rapidement recrutées de la circulation sanguine, avant même les neutrophiles et autres leucocytes. Leur migration est dirigée vers les poumons grâce à l'expression amplifiée de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et en réponse au gradient de chimiokines et autres molécules attractives, incluant le CCR2, le CCR6, le MMP9 (matrix metalloproteinase-9) et les défensines (Hammad and Lambrecht, 2007; Mellman and Steinman, 2001). La production de nouvelles chimiokines par les DCs est aussi stimulée : le CCL17 (TARC; thymus and activation-regulated chemokine), le CCL22 (MDC; macrophage-derived chemokine) et le CCL11 (éotaxine) qui attirent dans les poumons les cellules Th2, les basophiles et les éosinophiles (Beatty et al., 2007).

Étant donné que les DCs ne produisent pas d'IL-4, et que L'IL-4 est une cytokine essentielle au développement d'une réponse Th2, tant *in vivo* qu'*in vitro*, il est clair que d'autres cellules interviennent de manière précoce dans la réponse asthmatique. C'est le cas des cellules T naïves et des éosinophiles (Kuipers and Lambrecht, 2004). La phase tardive est finalement le reflet de l'action coordonnée de multiples types de cellules, structurales et immunes, intrinsèque et extrinsèques, déjà sur place ou nouvellement recrutées de la circulation.

Phase chronique. Plusieurs cytokines Th2 impliquées dans la réponse inflammatoire asthmatique contribuent au maintien de l'état d'activation du réseau de DCs pulmonaires. Combiné à la présence d'IgE sur les récepteurs FcεRI à la surface des DCs, des mastocytes et des basophiles, cet état peut jouer un rôle crucial dans l'amplification de la réponse et dans le maintien perpétuel de la réaction en boucle responsable de la chronicité de l'asthme (Lambrecht and Hammad, 2009). Des dommages tissulaires sont aussi impliqués, en réponse à cette boucle inflammatoire localisée. Ces lésions se combinent au processus de réparation épithéliale. L'amplitude de la réponse provoque une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale, alors que l'épithélium ne parvient plus à réparer tous les dommages subis. La première ligne de défense devient par conséquent beaucoup plus perméable et permissive, facilitant l'accès aux antigènes, pathogènes, polluants et irritants de toute sorte et favorisant le maintien de l'état inflammatoire chronique (Holgate, 2008; Ilowite et al., 1989). Il en résulte la formation d'une EMTU (epithelial-mesenchymal tropic unit), c'est-à-dire un environnement où se perpétue l'inflammation et qui est responsable d'importants changements structuraux associés à la chronicité de la maladie. Ces changements incluent l'épaississement de la paroi bronchique, le dépôt de protéines de matrice extracellulaire (fibronectine, collagène), la bronchoconstriction et l'hyperplasie des cellules caliciformes, responsables d'une surproduction de mucus. Ces changements créent un nouvel environnement favorable au recrutement, au maintien et à l'activation des cellules inflammatoires comme les monocytes, les macrophages, les neutrophiles et les DCs. Ces cellules, à leur

tour, produisent des cytokines proinflammatoires qui amplifient la réponse. On note également une accumulation sévère et persistante de mastocytes dans l'EMTU et dans les muscles lisses, source importante d'IL-13 et d'autres médiateurs qui influencent aussi la sévérité de l'inflammation, le remodelage et la fonction des muscles lisses, qui mène au développement d'hyperréactivité bronchique non spécifique et à un asthme sévère (Galli et al., 2008b; Holgate and Polosa, 2006) (**Figure 5**).

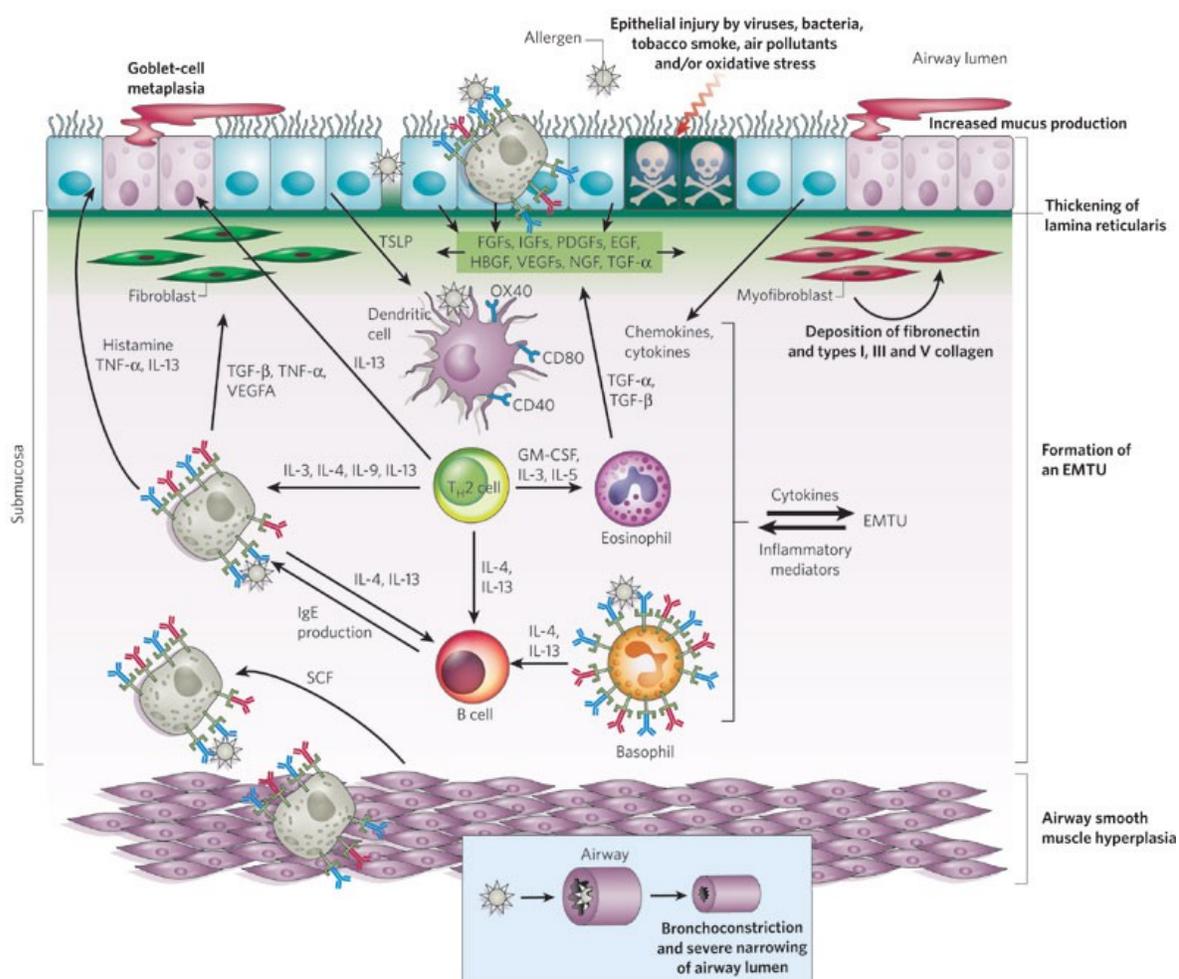


Figure 5. Phase chronique de l'asthme allergique.

L'exposition répétée et soutenue des voies respiratoires à l'allergène induit une inflammation pulmonaire chronique et des changements structuraux irréversibles. Tiré de Galli S.J. et al., July 2008, *Nature*, issue 454, 445-454.

1.3.4 Asthme intrinsèque

Environ 50% des patients asthmatiques ont un asthme non extrinsèque, c'est-à-dire un asthme non éosinophilique de type Th2, qualifié de non classique ou d'intrinsèque. Cette catégorie très hétérogène comporte entre autre l'asthme éosinophilique non allergique, l'asthme à composantes mixtes, l'asthme sévère à neutrophiles, l'asthme provoqué par l'aspirine et l'asthme occupationnel. De plus, la ligne est mince entre l'asthme et les MPOC (maladies pulmonaires obstructives chroniques, traduction de COPD, pour "chronic obstructive pulmonary disease") qui comprennent l'emphysème et la bronchite chronique. On distingue l'ensemble de ces maladies grâce à l'historique du patient, l'âge auquel les symptômes font leur apparition, au type d'inflammation pulmonaire, à la sévérité de la maladie et à la réponse aux traitements.

MPOC. Bien qu'elles n'entrent pas dans la famille de l'asthme, il est parfois difficile de distinguer les MPOC de certains phénotypes d'asthme intrinsèque. Caractérisée par une obstruction progressive et irréversible des voies respiratoires, la maladie atteint non seulement les bronches mais également les petites voies pulmonaires profondes et le parenchyme (Barnes, 2008b). Dans le cas de l'emphysème, la destruction de la paroi des bronchioles distales et des alvéoles est responsable d'une limitation importante des échanges gazeux (**Figure 6**). On observe chez les patients atteints de la maladie une infiltration de neutrophiles et de cellules T dans les poumons, une fibrose profonde et une hypersécrétion de mucus (Hogg, 2004). Contrairement à l'asthme classique, les muscles lisses et les vaisseaux sont peu ou pas touchés, les proportions de mastocytes, d'éosinophiles et d'IgE sont normales, et les lymphocytes ont des fonctions effectrices et cytotoxiques de type 1 (Cosio et al., 2009). Des cellules Th17 sont aussi présentes dans les poumons des patients avec de l'emphysème, contrairement aux individus sains (Shan et al., 2009). Le MPOC s'apparente à l'asthme sévère à neutrophiles, mises à part l'atteinte pulmonaire profonde et la réactivité bronchique normale. La majorité des

patients atteints de MPOC sont des fumeurs chroniques, la fumée de cigarette étant la cause primaire de la maladie (Rabe et al., 2007; Rennard and Vestbo, 2006).

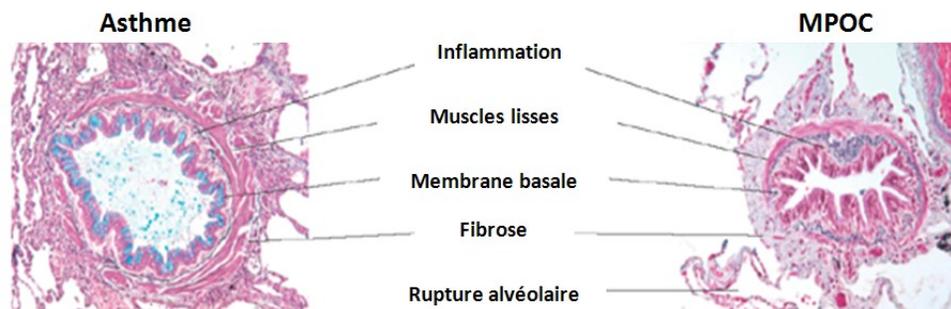


Figure 6. Comparaison de l'inflammation bronchique chez un patient asthmatique et un patient atteint de MPOC.

Adapté de Barnes P.J., *Nature Reviews Immunology*, March 2008, issue 8, 183-192.

L'asthme occupationnel. L'asthme occupationnel est causé par l'exposition à des particules en milieu de travail. Tel que mentionné plus tôt, plus de 300 produits sont à risque pour le développement de ce type d'asthme. Ces produits sont classés en deux catégories, c'est-à-dire les molécules à haut poids moléculaire et à faible poids moléculaire. De façon générale, les molécules du premier groupe proviennent de sources biologiques, comme par exemple la farine, ou encore les protéines animales. Ces produits induisent un asthme IgE-dépendant avec une inflammation de type Th2 et s'apparente à l'asthme extrinsèque (Maestrelli et al., 2009). Bien que les voies respiratoires constituent la principale route d'entrée des molécules impliquées et par conséquent le site d'initiation de la maladie, d'autres voies semblent aussi impliquées. C'est le cas de la route intradermale par exemple, qui pourrait être impliquée dans la phase de sensibilisation à une maladie pulmonaire (Redlich and Herrick, 2008). Les molécules à faible poids moléculaire sont plutôt d'origine chimique et mènent principalement au développement d'un asthme IgE-indépendant à composantes mixtes, Th1 et Th2 (Maestrelli et al., 2009). Certains produits chimiques irritants, comme le chlore, pourraient interagir directement avec l'épithélium bronchique, altérer la barrière épithéliale et ses fonctions et favoriser l'inflammation pulmonaire (Lemiere et al., 1997).

L'asthme occupationnel ne se développe évidemment pas chez tous les travailleurs en contact avec les produits à risque. Plusieurs facteurs peuvent favoriser l'éclosion de la maladie, entre autre des facteurs génétiques prédisposants ou des interactions gène-environnement particulières, les caractéristiques du produit, ainsi que l'intensité et la route d'exposition (Maestrelli et al., 2009).

L'asthme mixte. Généralement, la présence de neutrophiles est un indicateur d'un asthme agressif et difficile à contrôler. En effet, en plus de devoir ajuster leur mode de vie en fonction de leur maladie, les patients atteints d'un asthme sévère à neutrophiles sont les plus concernés par les soins et hospitalisations d'urgence et les crises sévères, parfois même mortelles, causées par l'asthme (Dolan et al., 2004). Ces malades font face à une pathologie multifactorielle hétérogène. Plusieurs facteurs peuvent entraîner le recrutement de neutrophiles et engendrer des dommages variables dans les voies respiratoires.

Chez les patients atteints d'asthme sévère dont la maladie a fait son apparition durant l'enfance, la pathologie s'apparente à l'asthme allergique classique et est distincte du MPOC. L'historique de ces patients ainsi que l'omniprésence des composantes Th2 suggèrent que l'asthme allergique soit à l'origine de la forme sévère de la maladie. Aux symptômes et à la physiologie de l'asthme classique s'ajoutent peu à peu d'autres facteurs aggravants. La chronicité s'installe, la maladie devient alors de plus en plus indépendante de l'allergène, on voit apparaître des neutrophiles et l'infiltration devient mixte (éosinophiles-neutrophiles). Des composantes additionnelles de l'inflammation de type Th1 et Th17 font leur apparition, incluant la production de TNF- α et d'IFN γ (Bogaert et al., 2009; Holgate and Polosa, 2006; Shan et al., 2009). Le TNF α , fortement surexprimé chez les patients atteints d'asthme sévère, amplifie la réponse inflammatoire asthmatique en activant différents facteurs de transcription. Il induit la production de nombreux médiateurs, incluant des cytokines et chimiokines

proinflammatoires, des molécules d'adhésion et des mucines, responsables du recrutement de neutrophiles, de monocytes et de macrophages, de l'activation et de la production d'autres cytokines par les lymphocytes T et les éosinophiles, de la libération d'histamines par les mastocytes en plus de causer l'hyperréactivité bronchique (Matera et al., 2010). L'IFN γ semble aussi impliqué dans l'hyperréactivité bronchique (Kumar et al., 2006). Tous ces facteurs contribuent à la chronicité, la sévérité et à la dégradation de la maladie, alors que la résistance aux traitements standards s'installe. Les marqueurs inflammatoires associés à l'asthme allergique (éosinophiles, cytokines Th2, IgE) sont généralement sensibles au traitement alors que les marqueurs d'asthme sévère, incluant les neutrophiles ainsi que les composantes Th1 et Th17 persistent malgré les traitements. Chez les patients où un asthme allergique est à la base de la maladie, il semblerait que l'exposition continue à l'allergène, spécialement ceux ayant des activités biologiques ou enzymatiques, ait une contribution majeure dans la dégénérescence de la maladie.

L'asthme à neutrophiles. Les patients qui développent plutôt un asthme à l'âge adulte sont souvent aux prises avec un phénotype sévère, une inflammation neutrophilique et sont réfractaires aux corticostéroïdes. Toutefois, leur maladie n'est pas d'origine allergique et s'apparente d'avantage au MPOC (Holgate and Polosa, 2006). Les cellules épithéliales semblent être directement impliquées dans le développement de l'asthme sévère à neutrophiles, tant chez les patients ayant développé la maladie durant l'enfance que tardivement à l'âge adulte. Différents facteurs, voire même combinaisons de facteurs, incluant la fumée de cigarette, d'autres polluants de l'air ou stress oxydatif, ainsi qu'à l'exposition à des pathogènes, interagissent directement avec les cellules épithéliales et déclenchent la cascade inflammatoire chronique. Il en est de même pour l'exposition soutenue à l'allergène dans le cas d'un asthme sévère qui inclut une composante allergique, tel que décrit plus tôt (Galli et al., 2008b). Dans la région submucosale, un grand nombre de facteurs de croissance sont alors libérés, comme l'EGF (epidermal growth factor), TGF α et β (transforming growth factor), HBGF (heparin-

binding like growth factor), FGF (fibroblast growth factor), IGF (insulin-like growth factor) et VEGF (vascular endothelial growth factor). D'une part cette combinaison de facteurs de croissance est responsable du remodelage tissulaire et de la genèse vasculaire et d'autre part du désordre de la fonction des cellules épithéliales et mésenchymateuses qui résulte en la formation d'une EMTU.

L'IL-17 est souvent présent dans les poumons et le sérum de patients atteints d'asthme sévère et lorsque c'est le cas, est corrélé avec la neutrophilie et la sévérité de la maladie (Alcorn et al., 2010). L'IL-17 promeut la production de nombreuses chimiokines et cytokines par les cellules épithéliales, endothéliales, les muscles lisses, les fibroblastes, les kératinocytes, les macrophages et les DCs (Nembrini et al., 2009; Oboki et al., 2008). L'environnement créé défavorise la réponse Th2 et oriente plutôt le développement d'une réponse Th17 caractérisée par la neutrophilie, typiquement retrouvée chez les patients où la maladie est sévère et difficile à contrôler (Laan et al., 1999). Depuis quelques années seulement, le rôle de la réponse Th17 est donc considéré et associé à la pathophysiologie de l'asthme non allergique ou intrinsèque.

1.4 Facteurs de risque

De nombreux facteurs et combinaisons de facteurs sont à l'origine de l'asthme. Il est évident depuis longtemps que le développement de la maladie implique des composantes héréditaires, bien qu'elles ne soient ni suffisantes ni nécessaires pour faire apparaître les symptômes de l'asthme. La génétique se combine à des facteurs environnementaux particuliers et des facteurs liés au patient. En effet, l'interaction gènes-environnement semble déterminante dans le risque de développer la maladie ainsi que pour la réponse aux traitements. Ceci dit, un certain polymorphisme peut se manifester seulement dans un contexte particulier, lorsqu'un facteur précis de l'environnement interagit avec le gène de susceptibilité en question. Généralement,

l'asthme fait son apparition au cours des premières années de la vie. C'est souvent même avant la naissance que les premiers facteurs de risque sont rencontrés par la transmission des gènes des parents, le mode de vie de la mère pendant la grossesse et plus tard avec l'environnement de l'enfant qui grandit. Plusieurs enfants entrent en rémission à l'adolescence ou au début de l'âge adulte, bien qu'ils restent plus à risque de voir leurs symptômes réapparaître plus tard. La maladie peut ainsi varier au cours de la vie du patient et les mécanismes qui régissent ces variations sont mal connus. À l'exception de l'asthme occupationnel, on connaît très peu les facteurs qui initient les formes plus tardives de la maladie chez l'adulte.

1.4.1 La génétique

Des études sur le génome ont mené à l'identification et la description d'une multitude de gènes de susceptibilité de l'asthme et de la réponse aux traitements, qui ont été classés dans 4 groupes distincts (**Figure 7**).

Parmi les gènes associés à l'asthme, le premier groupe comprend des gènes associés à *l'immunité innée et l'immunorégulation*. Il inclut des gènes de PRR (incluant les TLR2, TLR4, TLR6, TLR10, NOD1 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) et NOD2), les cytokines régulatrices IL-10 et TGF- β , le facteur de transcription STAT3 et des molécules impliquées dans la présentation antigénique comme le CMH de classe II. Le second groupe comprend des gènes responsables de la *différenciation et des fonctions effectrices des cellules Th2*, c'est-à-dire les gènes des cytokines IL-4, IL-13, IL-12p40 et IL-5, le récepteur de l'IgE et des facteurs de transcription Th2. Le troisième groupe implique *l'immunité mucoale et épithéliale* et inclut les gènes des chimiokines, des substances anti-microbiennes et des molécules impliquées dans l'intégrité de la barrière épithéliale. Les autres gènes de susceptibilité ont été découverts par clonage positionnel ; ils font partie du dernier groupe et sont associés à la fonction pulmonaire, au remodelage tissulaire et à la sévérité de la maladie (Vercelli, 2008).

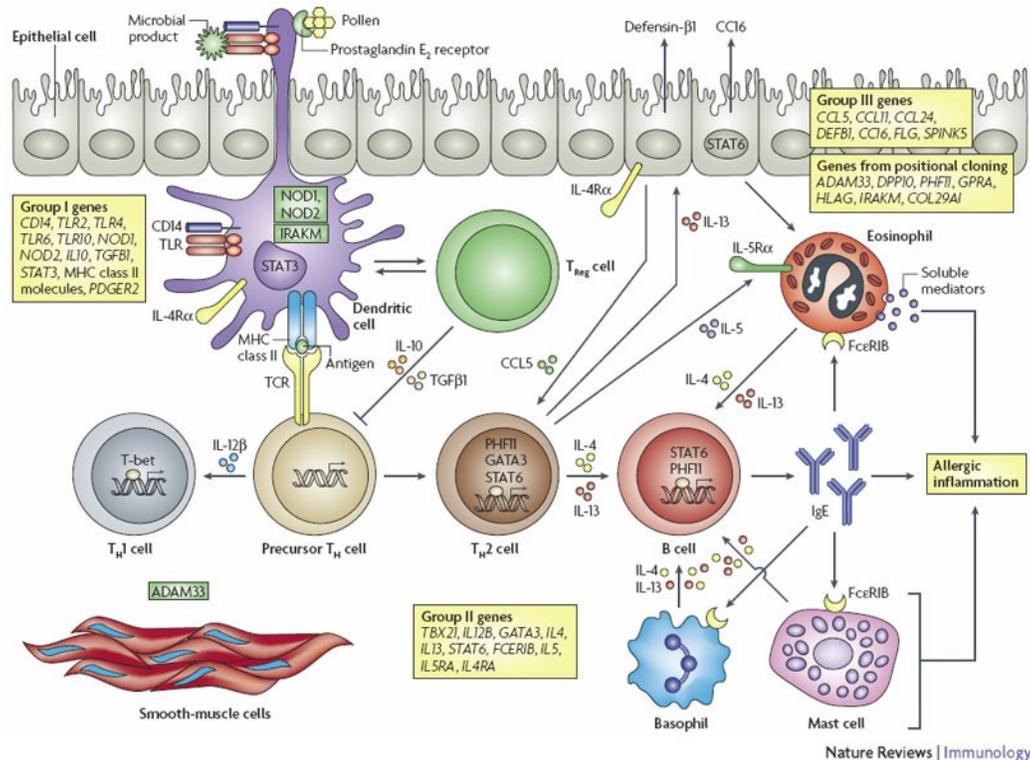


Figure 7. Gènes de susceptibilité de l'asthme.

Tiré de Vercelli D., *Nature Reviews Immunology*, March 2008, issue 8, 183-192.

1.4.2 Facteurs environnementaux

Il est évident que les facteurs génétiques ne peuvent expliquer l'augmentation rapide et sélective de la prévalence de l'asthme et de l'allergie dans les pays développés au cours des dernières décennies. Pour mieux comprendre ce phénomène, il faut se pencher sur les facteurs environnementaux qui, modifiés par la main de l'homme, ont changé drastiquement et rapidement.

Les facteurs environnementaux impliqués dans l'asthme incluent bien évidemment les allergènes contre lesquels les patients développent la maladie. Les plus fréquents sont les acariens ainsi que certains pollens et antigènes d'origine animale. D'autres molécules présentes dans l'air augmentent de façon non spécifique la fréquence et la sévérité de

l'asthme. D'une part, la fumée de cigarette est sans doute l'un des plus importants facteurs contribuant à la pathogénèse de la maladie, en entravant la réponse aux corticostéroïdes et en favorisant la réponse neutrophilique, les symptômes de la maladie et la détérioration de la fonction pulmonaire (Holgate and Polosa, 2006; James et al., 2005). D'autre part, les particules issues de la combustion du diesel causent également un stress oxydatif chez l'humain et l'animal. Ces deux polluants augmentent la production d'IgE et l'expression de cytokines Th2. L'exposition accrue au dioxyde d'azote, provoquée par l'utilisation du gaz naturel, le nombre accru de véhicules et par plusieurs processus industriels augmente la réactivité bronchique, aggravant ainsi la toux et d'autres symptômes respiratoires chez les asthmatiques. L'ozone, les moisissures, le pollen et l'humidité semblent aussi être des facteurs aggravants (Peden and Reed, 2010).

Dans le cas de l'asthme occupationnel, plus de 250 agents actifs ont été identifiés. Les produits les plus communément en cause sont les isocyanates (peinture de voitures), les produits de traitements capillaires utilisés en coiffure, la poussière de farine, les produits nettoyants corrosifs et le latex. De 5 à 15% des adultes asthmatiques, spécialement ceux qui ont développé la maladie tardivement, sont atteints d'asthme occupationnel (Peden and Reed, 2010; Subbarao et al., 2009). La maladie est différente d'un asthme allergique traditionnel et est aggravée par des constituants de l'environnement.

Depuis longtemps nous nous référons à la théorie de l'hygiène, qui stipule que l'exposition d'un enfant à différents microorganismes, pathogènes ou non, stimule le développement "normal" d'un système immunitaire et par conséquent, réduit le risque de développer de l'asthme. Cette théorie est basée sur l'équilibre Th1/Th2. Ce concept stipule que l'exposition bactérienne et virale favorisent le développement d'un profil inflammatoire Th1 et par conséquent, inhibent le développement de pathologies Th2 comme les allergies et l'asthme. Le changement des règles d'hygiène dans les pays

développés, par exemple, ont entraîné une réduction marquée de l'exposition microbienne et par conséquent, une désorganisation de la réponse inflammatoire protectrice de type Th1. Cette théorie a d'abord été associée aux désordres allergiques alors que plusieurs l'appliquent maintenant à d'autres maladies, dont l'autoimmunité (le diabète de type 1, la sclérose en plaque), certaines maladies inflammatoires de l'intestin, l'athérosclérose et certains cancers (Galli et al., 2008b; Rook, 2009).

Dans le contexte de l'asthme, plusieurs arguments défavorisent la "théorie de l'hygiène". En effet, le déséquilibre Th1/Th2, dû à une exposition réduite aux pathogènes et aux microbes environnementaux menant au développement d'un phénotype Th2, ne suffit pas à justifier la recrudescence de l'asthme au cours des dernières décennies. D'abord, il faut mentionner que les maladies Th1 et Th17, incluant le diabète, la sclérose en plaque et les maladies inflammatoires de l'intestin, sont également en forte hausse dans les pays développés (Rook, 2009). Des études supportent même une association entre le diabète de type 1 et l'asthme (Stene and Nafstad, 2001). De plus, l'INF- γ , une cytokine pro-Th1, semble être présente en quantité importante chez les patients asthmatiques (Krug et al., 1996). Le concept de régulation de la réponse Th1 par la réponse Th2 est également remis en question. Un défaut en IL-12 ou en INF- γ n'influence pas l'incidence des désordres allergiques comme l'asthme (Lammas et al., 2000). Finalement, il a été démontré que la réponse inflammatoire Th1 peut même agir en synergie avec la réponse Th2 impliquée dans l'asthme et augmenter l'intensité de la maladie. Les infections pulmonaires d'origine virale comme l'influenza amplifient la réponse asthmatique malgré le développement d'une réponse immune anti-virale de type Th1. Inversement, une forte réponse Th2 résultant d'une infection parasitaire est plutôt protectrice (Hansen et al., 1999; Jackson and Johnston, 2010). Ce dernier point a d'ailleurs été largement étudié dans le contexte de l'asthme puisqu'il est clair que l'exposition à certains helminthes est inversement corrélée à l'incidence d'asthme.

Les helminthes, communément appelés "vers parasites", sont des organismes pluricellulaires qui englobent les nématodes (vers ronds) et les plathelminthes (vers plats) (Hotez et al., 2008). Dans les pays sous-développés, la morbidité liée à ces parasites est très élevée, bien qu'ils soient associés à un faible taux de mortalité (Carvalho et al., 2009). Le contact entre les antigènes d'helminthes et l'hôte se fait principalement via les TLR et provoque une forte réaction inflammatoire Th2, caractérisée par un niveau élevé d'IgE, l'éosinophilie et l'infiltration de mastocytes. Contrairement à une réponse allergique, l'infection aux helminthes stimule la signalisation pro-inflammatoire résultant de la stimulation des TLR de manière à induire un phénomène anti-inflammatoire orienté, toujours via les TLR (Harnett and Harnett, 2010). Il en résulte l'induction de cellules T régulatrices, d'IgG4 et de cytokines anti-inflammatoires, incluant l'IL-10, le TGF- β . Les cellules T régulatrices, de pair avec l'IL-10 et le TGF- β sont impliquées dans l'inhibition de la réponse effectrice, entre autres, alors que les IgG4, Ig de type Th2, inhibent la dégranulation médiée par les IgE et la réponse allergique. Il est intéressant de noter que les gens infectés par les helminthes dans les pays sous-développés portent un niveau d'IgE-spécifiques dirigé contre les acariens semblable à celui des habitants des pays industrialisés. Par contre, ils ne présentent pas de réactivité cutanée à l'antigène en raison de la protection acquise lors de l'infection parasitaire (Flohr et al., 2009; Rook, 2009; Yazdanbakhsh et al., 2002). C'est cette réponse immunosuppressive qui est sans doute à l'origine de la protection contre l'asthme. Il y a plusieurs décennies, la réponse Th2 devait protéger contre l'invasion régulière du système par des parasites extracellulaires. L'explication évolutive se trouve sans doute ici : une susceptibilité accrue à l'asthme dans un milieu au niveau d'hygiène élevé serait un synonyme de survie dans un environnement parasitaire. Serions-nous simplement en train de subir les conséquences de notre unique habileté à modifier notre environnement? Ce changement environnemental s'effectuerait plus rapidement que les modifications génétiques nécessaires à l'adaptation à notre nouveau milieu.

De nombreuses autres corrélations soutiennent cette hypothèse. Par exemple, d'autres maladies infectieuses sévères comme la malaria et la tuberculose sont inversement reliées à l'allergie (Yazdanbakhsh et al., 2002). Peu importe le type de microorganisme (virus et bactéries, pathogènes ou non, saprophytes, commensaux, parasites, etc), l'induction continue d'une multitude de réponses inflammatoires génère un réseau varié de cellules T régulatrices et de DCs régulatrices, essentielles à l'équilibre immunitaire. La relation inverse entre l'asthme et l'exposition directe à l'environnement rural renforce également ce concept. L'exposition à un haut niveau d'endotoxine et à une variété importante de produits microbiens qui interagissent avec les TLR, tel que discuté pour les infections à helminthes, induisent une réponse protectrice d'autant plus importante lorsque la mère est exposée pendant la grossesse (Riedler et al., 2001; von Mutius and Radon, 2008). Le rapport direct entre la signalisation du TLR maternel et la protection de la progéniture contre le développement de l'asthme a d'ailleurs dernièrement été prouvé chez la souris (Conrad et al., 2009). Par conséquent, la communauté scientifique croit qu'il est maintenant plus approprié d'appuyer le concept de "la théorie de l'hygiène" par "l'équilibre inflammatoire régulateur" plutôt que par "l'équilibre Th1/Th2". Ainsi pourrait s'expliquer la prévalence inférieure d'asthme chez les enfants issus de grandes familles, les enfants ayant fréquenté les garderies, les habitants des centres ruraux ou des fermes ainsi que les populations des pays défavorisés.

1.4.3 L'hôte

Des facteurs directement liés à l'hôte sont aussi responsables du développement et de la gravité de la maladie. Bien que de nombreuses études se soient penchées sur le sujet, les conditions prénatales précises qui protègent du développement de l'asthme sont mal connues. Il a clairement été établi que l'exposition à la fumée de cigarette par la mère durant la grossesse altère la fonction pulmonaire et augmente la pathogénicité et la sévérité de l'asthme chez l'enfant de façon dose-dépendante et cet effet est amplifié par l'exposition post-partum (Peden and Reed, 2010; Subbarao et al., 2009). Elle a pour

conséquences l'augmentation d'IgE et d'IgG4 spécifiques, d'IL-4, d'IL-5, d'IL-13 et de la libération d'histamine en réponse à l'antigène (Diaz-Sanchez et al., 2006). Quant à l'effet de la diète de la mère pendant la grossesse et l'allaitement, la controverse règne toujours. Le stress et la prise d'antibiotiques, tant lors de la grossesse que chez l'enfant et l'adulte, semblent augmenter le risque de développer l'asthme selon plusieurs études (Subbarao et al., 2009). Alors que l'alimentation et la prise de probiotiques semblent influencer le développement de l'asthme chez la souris, aucune corrélation n'a jusqu'à présent été démontrée chez l'humain (Arvaniti et al., 2010; Ozdemir, 2010). Finalement, l'obésité, et non le manque d'exercice ou la diète qui souvent s'y rattache, est corrélée avec l'asthme et avec la résistance au traitement aux corticostéroïdes. En effet, une relation dose-dépendante entre l'incidence de l'asthme et l'index de masse corporelle a été décrite. On observe aussi une forte corrélation entre l'obésité et la réduction de la fonction pulmonaire. De plus, un état pro-inflammatoire systémique chronique serait à l'origine des problèmes métaboliques et cardiovasculaires liés à l'obésité. Plusieurs cytokines et médiateurs, dont la leptine, l'IL-6 et le TNF- α , sont augmentés chez le patient obèse et joueraient un rôle dans la résistance au traitement standard de l'asthme (Delgado et al., 2008; Sutherland, 2008). Cette relation est plus importante chez la femme que chez l'homme et augmente généralement avec l'âge, suggérant l'implication des hormones sexuelles et de la génétique. Des facteurs endocriniens semblent en effet impliqués dans la pathophysiologie de l'asthme. L'asthme sévère par exemple, est 2 à 3 fois plus fréquent chez les femmes et a été fortement associé avec le cycle menstruel alors qu'on observe une amélioration de l'état asthmatique pendant la grossesse (Brenner et al., 2005; Schatz, 1999).

La détérioration de l'asthme a longtemps été associée à des désordres psychologiques et psychiatriques. La dépression, l'anxiété, la panique et la peur par exemple, interfèrent avec le contrôle de la maladie (Lehrer et al., 2002). Sans être les seuls responsables des cas d'asthme sévère, les désordres psychologiques et psychiatriques peuvent influencer

le cours de la maladie et en combinaison avec les autres facteurs discutés, avoir des conséquences ponctuelles graves, voire même chroniques.

1.4.4 Les modifications épigénétiques

Le terme épigénétique réfère à des changements héréditaires de la structure de la chromatine qui ont pour conséquence de modifier la fonction des gènes, sans toutefois affecter la séquence d'ADN. Les modifications épigénétiques incluent la méthylation des ilots CpG de l'ADN, qui induit la répression de la transcription, ainsi que des modifications des histones entre autres, qui entraînent l'activation ou la répression de gènes (Szyf, 2009). Ces modifications sont impliquées dans l'expression de facteurs de transcription essentiels à l'établissement et au maintien Th1, Th2 et de cellules T régulatrices. La fumée de cigarette et la diète par exemple peuvent induire des modifications épigénétiques transmissibles. L'acide folique, supplément conseillé aux femmes enceintes pour protéger le fœtus de certains défauts, est une source riche en donneurs de méthyles et chez la souris, il a été démontré que l'hyperméthylation *in utero* augmentait la sévérité de l'asthme (Barnes, 2009; Hollingsworth et al., 2008). Il a été confirmé chez l'humain que la prise de suppléments d'acide folique pendant la grossesse corrèle avec le risque de développer l'asthme chez l'enfant (Whitrow et al., 2009). Le mode d'action des corticostéroïdes passe également par un processus de modification épigénétique; l'acétylation du récepteur des glucocorticoïdes est nécessaire à sa liaison à l'ADN et régule les gènes inflammatoires et anti-inflammatoires. La compréhension de ce mécanisme a permis d'identifier une source de résistance au traitement standard aux glucocorticoïdes chez les patients atteints d'un asthme sévère, de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC ou COPD pour "chronic obstructive pulmonary disease"), ou encore chez les fumeurs asthmatiques (Barnes, 2009). Depuis peu, des chercheurs s'intéressent aux changements épigénétiques afin de mieux comprendre les causes et mécanismes de plusieurs maladies, dont l'asthme. Ce

concept prometteur constitue un maillon important qui unit les différents facteurs de risque discutés dans cette section, en plus d'intégrer la théorie de l'hygiène.

1.5 Traitement

1.5.1 Traitement de l'asthme extrinsèque

De nombreux facteurs et combinaisons de facteurs entrent en jeu dans la pathophysiologie de l'asthme et par conséquent, il est difficile de trouver un traitement universel. Le traitement classique le plus répandu actuellement pour contrôler la maladie comprend trois volets. Étant donné que l'asthme est d'origine allergique, le contrôle de l'environnement est primordial afin d'éviter à tout prix la mise en place de la phase chronique et sévère de la maladie. Les patients asthmatiques doivent donc, lorsque possible, cibler et éliminer les allergènes contre lesquels ils ont développé une réaction et toutes autres molécules aggravantes comme la fumée de cigarette, la pollution et les produits forts volatils. Ensuite, ces patients sont généralement traités par des corticostéroïdes, qui diminuent l'inflammation Th2 en inhibant la production de cytokines, de chimiokines et de certaines molécules d'adhésion, dont l'expression est régulée par les facteurs de transcription NK-kB (nuclear factor-kappa B) et AP1 (activator protein 1) (Barnes and Adcock, 1998; Barnes et al., 1998; Holgate and Polosa, 2008). Finalement, des agonistes du (B)2-adrénorecepteurs, c'est-à-dire des agents broncho-dilatateurs, doivent souvent être inclus dans le traitement pour renverser la broncho-constriction lors d'une crise. Cette thérapie standard comporte plusieurs limites. Bien qu'il soit un bon immunomodulateur, le traitement aux corticostéroïdes n'est pas curatif, un traitement continu est donc nécessaire et il semble peu efficace chez les fumeurs (Chaudhuri et al., 2003) ou lorsque l'inflammation est aggravée par une infection virale (Harrison et al., 2004). De plus, environ 10% des patients sont réfractaires aux corticostéroïdes et nombreux sont ceux qui développent une résistance

aux médicaments broncho-dilatateurs (Barnes, 2004; Corry and Kheradmand, 2006; Devereux, 2006). Il a également été démontré que de fortes doses de corticostéroïde chez les asthmatiques augmentent les risques d'ostéoporose et de fractures (Goldstein et al., 1999). Il devient donc primordial de trouver de nouvelles thérapies efficaces et idéalement curatives pour contrôler voire même enrayer la maladie.

1.5.2 Traitement de l'asthme intrinsèque.

La plupart des patients atteints d'asthme intrinsèque qui ne répondent peu ou pas au traitement standard de l'asthme, c'est-à-dire la combinaison de corticostéroïdes en aérosol et de broncho-dilatateurs, sont atteints d'une forme sévère d'asthme. Les cliniciens et le patient sont alors tentés d'augmenter les doses, bien que ces agents aient tous deux des effets indésirables à forte concentration. La présence de neutrophiles, de TNF α et d'une réponse inflammatoire de type Th1 sont des indications d'un asthme réfractaire et il est primordial de trouver le traitement alternatif approprié. En effet, les corticostéroïdes ne parviennent pas à inhiber le TNF α et les cytokines Th1, en plus ils prolongent la survie et les fonctions effectrices des neutrophiles en interférant avec l'apoptose (Cazzola and Polosa, 2006; Cox, 1995). La résistance aux corticostéroïdes a aussi été associée à différentes anomalies, par exemple un défaut d'acétylation de l'histone-4 interférant avec l'activation de gènes anti-inflammatoires, une surexpression de l'isoforme β du récepteur des corticostéroïdes, qui compétitionne avec l'isoforme active α et par conséquent inhibe la réponse, ou encore un défaut de production d'IL-10 en réponse au traitement (Barnes, 2006; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006; Xystrakis et al., 2006).

Il n'existe pas de traitement universel contre l'asthme intrinsèque en raison de la complexité de la maladie. Il est primordial de détecter les causes de la maladie et le type d'infiltration afin de pouvoir adapter le traitement. Certains asthmatiques réfractaires aux corticostéroïdes répondent bien au traitement avec des antagonistes des récepteurs de

leukotriènes. Un excès de production de leukotriènes a en effet été noté chez les asthmatiques, même après traitement avec des corticostéroïdes, et impliqué dans la pathogénèse de la maladie. Il a été démontré que ces antagonistes ont des propriétés bronchodilatatrices et anti-inflammatoires. Ils semblent également plus efficaces lorsqu'ils sont donnés en combinaison avec les corticostéroïdes, malgré qu'il ne s'agisse pas d'un traitement universel contre l'asthme sévère (Currie et al., 2005). Un autre traitement ciblant le TNF α suscite de l'intérêt. Etanercept, une protéine de fusion du récepteur TNF soluble, améliore l'hyperréactivité bronchique et la qualité de vie des patients concernés en agissant sur les muscles lisses. Contre toute attente, la molécule a toutefois très peu d'effet sur l'inflammation et la réaction à ce traitement est plutôt hétérogène (Berry et al., 2006; Morjaria et al., 2008).

1.6 Modèles expérimentaux

Des considérations éthiques sévères limitent largement l'expérimentation d'agents dont on ne connaît pas l'efficacité ou la toxicité chez l'humain. Bien qu'ils présentent certaines limites, les modèles animaux ont permis jusqu'à maintenant une évolution remarquable de la compréhension de la pathophysiologie de l'asthme. Évidemment, la complexité de la maladie du patient asthmatique ne peut être reproduite dans aucun modèle animal puisqu'elle implique une combinaison de facteurs complexes et non contrôlés. Ces modèles permettent toutefois de décortiquer de manière rigoureuse chacun de ces facteurs et d'étudier leurs rôles respectifs dans la maladie en minimisant les biais.

Le modèle expérimental le plus ancien semble être celui du cochon d'inde, ou cobaye commun, utilisé depuis une centaine d'années pour l'étude de la maladie (Karol, 1994). Le cochon d'inde permet d'étudier l'hypersensibilité immédiate aux irritants, pour l'étude de l'asthme occupationnel. Malgré que sa réponse pharmacologique soit plus près de l'humain que celle des autres rongeurs, il est à présent moins utilisé que les

souris et les rats en raison du faible nombre de souches et de réactifs spécifiques disponibles pour l'étude (Ressmeyer et al., 2006; Zosky and Sly, 2007).

La souris et le rat sont sans aucun doute les animaux les plus utilisés en recherche et il en est de même pour l'étude de l'asthme. Ils sont peu dispendieux, se reproduisent rapidement, sont faciles à manipuler, tant sur le plan physique que génétique, et leur génome respectif est connu. Leur popularité vient aussi de l'abondance de réactifs et de la variété d'espèces disponibles dans les deux cas, bien qu'ils soient moindres chez le rat que chez la souris. Pour étudier l'asthme allergique, il est simple de sensibiliser les souris et les rats à plusieurs antigènes, incluant les allergènes fréquemment reconnus par l'humain. Par contre, l'exposition répétée qui mène au développement de la tolérance plutôt qu'à l'induction d'une maladie chronique, telle qu'observée chez l'humain, constitue une limite importante de ces modèles animaux. Les rats présentent un avantage sur les souris en raison de leur taille, en réduisant la contrainte de fragilité de l'animal. Les rats montrent en effet une plus grande stabilité sous anesthésie et les prélèvements sont plus volumineux et plus faciles à effectuer que chez la souris. Après l'induction d'asthme allergique, les rats répondent de façon non-spécifique à des agents qui induisent la bronchoconstriction mais également de façon aiguë spécifiquement à l'allergène inhalé, contrairement à la souris. L'efficacité et la toxicité des nouveaux médicaments sont souvent testées chez le rat avant de passer à l'essai clinique chez l'humain (Zosky and Sly, 2007). Les différents modèles murins pour l'étude de l'asthme sont détaillés dans la section suivante.

Des animaux de grande taille, c'est-à-dire le chien, le mouton et le singe, sont également disponibles et utilisés pour l'étude de l'asthme mais ils sont très coûteux et peu de réactifs sont disponibles, limitant les expériences possibles. Les chiens et les moutons présentent toutefois l'avantage d'être naturellement prédisposés à la réponse allergique à des allergènes cliniquement impliqués chez l'humain (Abraham et al., 1983; de Weck et al., 1997). Les deux espèces développent une réponse asthmatique similaire à celle observée

chez l'humain (Abraham, 1989; Redman et al., 2001). Le chien est un modèle particulièrement intéressant pour l'étude des changements de la fonction pulmonaire à long terme dans l'asthme (Zosky and Sly, 2007).

Les modèles décrits précédemment font tous référence à des animaux quadrupèdes. Anatomiquement parlant, cette différence est associée à une différence de posture, de pression appliquée sur les poumons, de structure et de disposition des voies respiratoires pouvant avoir une influence non négligeable sur la fonction respiratoire (Bettinelli et al., 2002). De ce point de vue, le singe reste le meilleur modèle animal pour l'étude de l'asthme. Il est d'ailleurs utilisé comme support aux essais cliniques chez l'humain et pour faire le pont entre les autres modèles animaux, les souris principalement, et le patient. Les singes sont physiologiquement, génétiquement et anatomiquement similaires à l'homme et reproduisent pratiquement toutes les caractéristiques de l'asthme allergique. De plus, les réactifs et les technologies utilisés pour l'homme peuvent être utilisés chez le singe, par exemple pour mesurer la fonction pulmonaire ou encore pour pratiquer une bronchoscopie (Coffman and Hessel, 2005). Les coûts associés à ce modèle sont toutefois faramineux et l'accès et les manipulations sont beaucoup plus complexes.

1.6.1 Modèles murins d'asthme

Les modèles murins sont des outils précieux pour l'avancement des connaissances de la pathophysiologie de l'asthme. Outre les points mentionnés précédemment, les modèles d'asthme chez la souris présentent de nombreux avantages et similitudes à la maladie chez l'humain mais comportent également certaines limites à prendre en considération. Le **Tableau I** regroupe les similitudes et les différences entre les modèles murins et l'asthme humain.

Tableau I. Caractéristiques de l'asthme chez l'humain et chez la souris.

		Homme	Souris
DIFFÉRENCES	Ramifications bronchiques	17 à 21	13 à 17
	Muscles lisses et Cartillages	De la trachée aux bronchioles	Trachée et bronche principale
	Hyper-réactivité bronchique	Antigène spécifique et méthacholine	Méthacholine
	Glandes à mucus	Trachée, voies intermédiaires	Trachée
	Épithélium bronchique	Complexe, multicouche	Monocouche
	Inflammation	Péribronchique	Péribronchique et périvasculaire
	Infiltrat	Éosinophiles ($\pm 5\%$)	Éosinophiles (50-80%)
SIMILITUDES	Cytokines	IL-4, IL-5, IL-13	IL-4, IL-5, IL-13
	Réponse T	Th2 et mémoire	Th2 et mémoire
	Infiltrat	Éosino, lymphocytes T peu de neutrophiles	Éosino, lymphocytes T peu de neutrophiles
	Immunoglobulines Dégranulation	IgE Mastocytes	IgE et IgG1 Mastocytes
	Remodelage, Hyperplasie, mucus	Présents	Présents

La principale contrainte du modèle murin est que la souris, contrairement à l'homme, ne développe pas spontanément l'asthme. Il est par contre facile d'induire la maladie puisque les souris sont sensibles à plusieurs antigènes, incluant les allergènes en cause chez l'humain. Une autre différence réfère à la physiologie pulmonaire, qui complexifie l'analogie des réponses entre les deux espèces. La trachée et l'ensemble des voies

respiratoires bronchiques couvrent 11% du volume pulmonaire chez la souris alors qu'ils n'occupent que 1% chez l'humain. De plus, le cartilage entre dans la composition de la paroi des voies respiratoires de la trachée aux bronchioles chez l'humain alors que chez la souris, la présence de cartilage est limitée à la trachée et aux bronches principales. Le nombre de ramifications bronchiques ainsi que la disposition des muscles lisses et des glandes à mucus sont également différents chez les souris et les humains (Finkelman and Wills-Karp, 2008; Hyde et al., 2009; Wenzel and Holgate, 2006). Ces différences physiologiques entraînent des divergences au niveau de l'hyperréactivité bronchique. Les souris ne développent pas d'hyperréactivité bronchique en réponse à l'allergène. Ce phénomène n'est observable que lorsque l'animal est soumis à des stimuli bronchoconstricteurs comme la méthacholine, qui permet tout de même de vérifier la gravité de la maladie comme chez l'humain. Un individu et une souris dits asthmatiques vont répondre à de faibles doses de métacholine par la bronchoconstriction. D'ailleurs, un autre biais est introduit par l'adaptation technologique qui permet de mesurer l'hyperréactivité bronchique chez la souris, qui diffère des méthodes et instruments utilisés pour un patient asthmatique (Kumar and Foster, 2002). Quelques distinctions peuvent aussi être faites lorsqu'on compare l'épithélium pulmonaire des deux espèces, plus précisément au niveau de la composition, la densité et les proportions de cellules épithéliales. L'épaisseur de l'épithélium est par exemple nettement supérieure chez l'homme, ayant possiblement un impact sur la manière dont la barrière épithéliale réagit face aux stimuli comme les antigènes inhalés, les virus et les polluants (Hyde et al., 2009; Wenzel and Holgate, 2006).

Malgré ces différences, plusieurs modèles murins ont été développés et ont avec succès permis l'avancement des connaissances dans le domaine de l'asthme. Le modèle classique implique l'immunisation systémique par voie intra-péritonéale avec l'albumine d'œuf (OVA) précipitée à l'hydroxyde d'aluminium (alun), un adjuvant de type Th2, suivie d'une série de rappels avec l'OVA au niveau des voies respiratoires, par inhalation, par voie nasale ou intra-trachéale. Ce protocole induit chez la souris une

maladie comparable en plusieurs points à celle caractérisée chez l'humain. Notons la réponse inflammatoire Th2, incluant l'infiltration massive des voies respiratoires par des éosinophiles, la production d'IgE, la dégranulation des mastocytes, la sécrétion des cytokines IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et la génération d'une réponse T CD4 mémoire. Le mode d'action exact de l'alun est encore inconnu, bien que certains mécanismes aient été identifiés. Il a été démontré que l'injection intra-péritonéale de l'alun induit un signal de danger endogène, l'acide urique, et le recrutement de monocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles. Les monocytes et les DCs péritonéales nouvellement activées migrent vers les ganglions médiastinaux, où ils induisent l'activation et l'expansion clonale de cellules T spécifiques. À leur arrivée dans les ganglions, les monocytes sont déjà différenciés en DCs matures aptes à présenter l'antigène. Le même groupe a d'ailleurs démontré que l'injection d'OVA-alun entraîne la présentation antigénique et la prolifération de cellules T spécifiques dans les ganglions drainant les poumons, les mLNs, aussi peu que 24 heures après l'injection intra-péritonéale (Kool et al., 2008; Lambrecht et al., 2009). Bref, l'immunisation intra-péritonéale, dite systémique, induit une réponse localisée au niveau des poumons.

D'autres modes d'immunisation ont également été étudiés, dans le but de rendre le modèle d'asthme murin plus "physiologique" puisque la sensibilisation à l'antigène chez les patients asthmatiques ne se fait pas par voie intra-péritonéale. L'immunisation locale par injections répétées via les voies intra-nasale et intra-trachéale a été étudiée. La réponse est initiée par les composantes de l'immunité innées. Un signal TLR comme le LPS ou encore l'utilisation d'un antigène avec des propriétés enzymatiques sensibilise efficacement les souris par voie intra-nasale (Boyce and Austen, 2005). Par contre, il a été démontré que l'inhalation répétée d'antigène soluble, spécialement l'ovalbumine, induit un état tolérogénique plutôt qu'inflammatoire (Tsitoura et al., 1999). La voie intra-nasale comporte un autre inconvénient majeur, c'est-à-dire que cette technique est imprécise quant aux volumes inhalés ou avalés par les souris. Pour remédier à ce problème, l'injection intra-trachéale a été adoptée par plusieurs groupes, dans leurs

modèles. Elle permet l'injection d'un volume plus grand que la voie intra-nasale, quoique moindre lorsque comparée à la voie intra-péritonéale. Cette méthode permet actuellement d'étudier le rôle des DCs dans la maladie, alors que les DCs sont générées *in vitro*, incubées avec l'antigène et injectées à la souris. Un profil Th2 semblable à celui obtenu par l'immunisation systémique est observé (Lambrecht et al., 2000).

Depuis quelques années seulement, des modèles d'asthme à neutrophiles ont été élaborés. D'abord, il a été démontré que l'inhalation d'ovalbumine chez les souris transgéniques ayant un TcR dirigé contre l'ovalbumine induit une neutrophilie au niveau des voies respiratoires sans induire de réponse Th2 et la production d'IgE (Nakae et al., 2007; Wilder et al., 2001). Des modèles de transfert adoptif ont également été mis au point. Le transfert de cellules Th17 polarisées *in vitro* ou encore l'injection intratrachéale d'ovalbumine combinée à une faible dose de LPS suivie d'un aérosol d'ovalbumine induit une inflammation pulmonaire neutrophilique accompagnée d'hyperréactivité bronchique et d'IL-17 (McKinley et al., 2008; Wilson et al., 2009b).

1.7 La molécule CD47 et ses partenaires

1.7.1 CD47

CD47, protéine non-classique de la famille des immunoglobulines, est exprimée de façon ubiquitaire à la surface des cellules. Cette protéine est constituée d'un domaine amino-terminal extracellulaire IgV fortement glycosylé, d'un domaine transmembranaire formé 5 segments hydrophobes ainsi que d'une courte portion intracellulaire. Sa portion carboxy-terminale cytoplasmique fait l'objet d'épissage alternatif, donnant lieu à 4 isoformes (Brown and Frazier, 2001; Lindberg et al., 1993) (**Figure 8**). Le CD47 a été initialement découvert en association avec l'intégrine $\alpha\beta3$, lui conférant le nom de "Integrin associated protein (IAP)" (Brown et al., 1990). En effet,

son domaine Ig lui permet d'interagir en *cis* avec plusieurs intégrines, mais également en *trans* avec le signal-regulatory protein (SIRP) et la thrombospondin-1 (TSP), modulant un large spectre de réponses cellulaires.

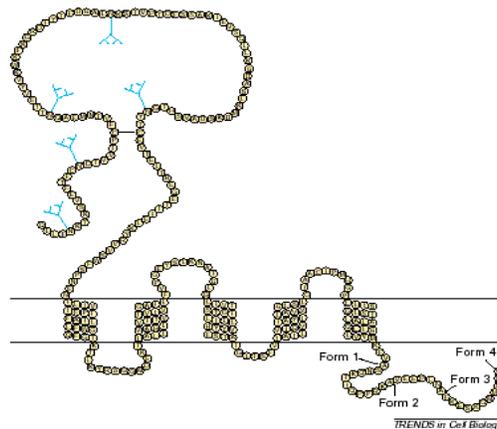


Figure 8. Structure du CD47.

Tiré de Brown E.J. and Frazier W.A., *Trends in Cell Biology*, March 2001, Issue 3, 130-135.

1.7.2 TSP

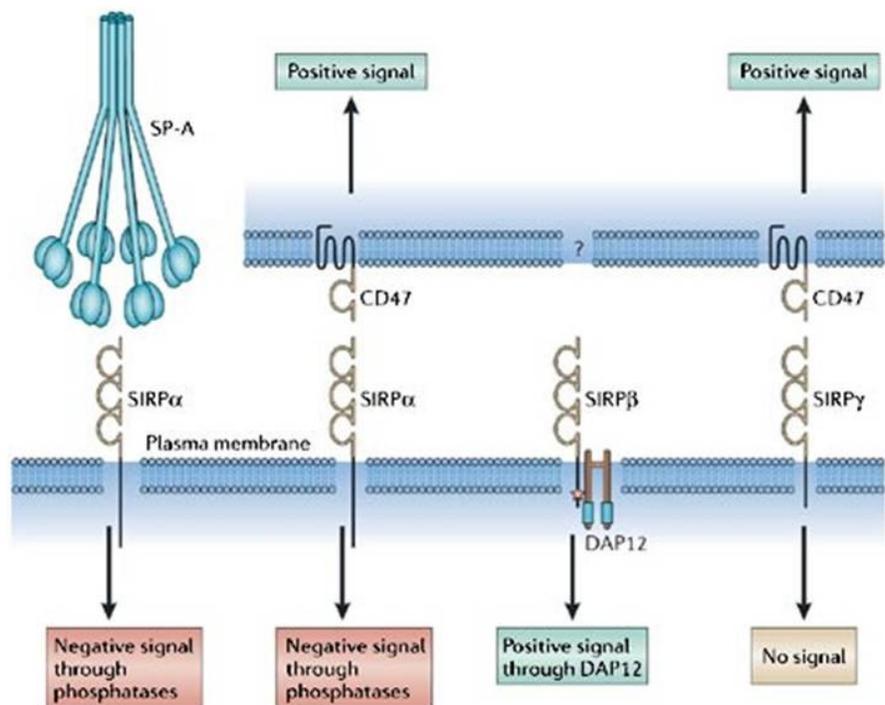
La TSP est une glycoprotéine homotrimerique d'environ 450 kDa de la matrice extracellulaire (Silverstein, 2002). À l'état de base, TSP est détectée de manière ubiquitaire à faible niveau alors que suivant un dommage tissulaire ou un signal inflammatoire, sa concentration augmente rapidement et transitoirement. Elle est produite et sécrétée par plusieurs types cellulaires, incluant les plaquettes, les cellules T, les monocytes, les macrophages et les DCs (Chen et al., 2000; Raugi et al., 1987; Sarfati et al., 2008).

La TSP interagit spécifiquement avec un large spectre de molécules, exprimées par différents types cellulaires, lui conférant de nombreux rôles et fonctions biologiques. Ses récepteurs comprennent le CD47, le CD36, ainsi que certaines intégrines, protéases et

protéines de la matrice extracellulaire. Plusieurs rôles de la TSP ont été décrits, entre autres dans la réparation tissulaire, l'angiogénèse, la prolifération et la survie cellulaire, l'adhésion, la migration, ainsi que l'apoptose (Chen et al., 2000; Sarfati et al., 2008; Silverstein, 2002).

1.7.3 SIRP

La famille SIRP comprend 3 récepteurs transmembranaires connus, le SIRP α , SIRP β et SIRP γ . Alors que leur portion extracellulaire constituée de 3 domaines Ig est conservée, ils diffèrent quant à leur domaine intracellulaire (Barclay and Brown, 2006; Matozaki et al., 2009) (**Figure 9**).



Nature Reviews | Immunology

Figure 9. Interactions entre les membres de la famille SIRP et leurs ligands.

Tiré de Barclay N., Nature Reviews Immunology, June 2006, issue 6, 457-464.

SIRP β , ou CD172b, est constitué d'une très courte portion cytoplasmique et ne possède aucun motif de signalisation. En effet, la transmission du signal passe par un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) de DAP12, une protéine dimérique à laquelle SIRP β est associé (Dietrich et al., 2000). Bien que SIRP β ait été décrit chez l'humain, la souris et le rat, aucune liaison avec CD47 n'a été observée et il reste jusqu'à ce jour un récepteur sans partenaire (Sarfati et al., 2008; Seiffert et al., 2001).

SIRP γ , aussi connu sous le nom de CD172g et SIRP β 2, n'a été identifié que chez l'humain, à la surface des lymphocytes T et des cellules NK. SIRP γ est lui aussi constitué d'une très courte région cytoplasmique, dépourvue de tyrosine ou d'une liaison à un quelconque motif de signalisation. Par contre, SIRP γ semble capable de se lier faiblement au CD47 et d'induire un signal positif (Brooke et al., 2004; Piccio et al., 2005).

SIRP α , le premier à avoir été identifié, porte aussi les noms CD172A, SHPS-1, Bit et p84. La spécificité de l'interaction du CD47 avec le SIRP α dépend d'un pont di-sulfure entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire (Rebres et al., 2001). Sa région amino-terminale hautement polymorphe ne semble pas impliquée dans sa liaison avec le CD47 (Barclay and Hatherley, 2008). Contrairement aux autres membres de sa famille, SIRP α possède une queue cytoplasmique composée de résidus tyrosines formant des motifs ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) qui une fois phosphorylés, recrutent les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui médient ses fonctions régulatrices négatives (Fujioka et al., 1996). SIRP α est exprimé par les cellules myéloïdes, c'est-à-dire les neutrophiles, les mastocytes, les macrophages, les DCs et les monocytes, ainsi que par les cellules endothéliales et les cellules épithéliales du poumon (Sarfati et al., 2008). En plus du CD47, le Surfactant-A (SP-A) et le Surfactant-D (SP-D) sont aussi des ligands connus de SIRP α . Ces protéines solubles se retrouvent dans les poumons et ont une implication biophysique lors de la respiration et un rôle dans la défense immunitaire pulmonaire (Chroneos et al., 2010). SP-A et SP-D se lient à SIRP α avec une plus grande affinité que le CD47, défavorisant l'interaction CD47-SIRP α (Gardai et al., 2003).

1.8 Fonctions immunologiques du CD47

L'ubiquité de l'expression du CD47 ainsi que son interaction avec plusieurs ligands, eux-mêmes pouvant interagir avec d'autres ligands, rendent l'étude de la liaison du CD47 complexe. Certaines cellules, comme les DCs, co-expriment par exemple le CD47, des intégrines, le SIRP α ainsi que la TSP.

1.8.1 CD47-TSP

L'interaction CD47-TSP exerce ses effets à plusieurs niveaux dans le système immunitaire. Lors de la réponse innée, cette liaison régule négativement l'activation des DCs de manière autocrine (Demeure et al., 2000; Doyen et al., 2003). L'engagement du CD47 par la TSP sur les monocytes inhibe également la production d'IL-12 et prévient leur différenciation en DCs chez l'humain, de façon à limiter la durée et l'intensité de la réponse inflammatoire (Armant et al., 1999). Au cours de la réponse immunitaire adaptative, la TSP interagit avec le CD47 exprimé à la surface des cellules T humaines, inhibe leur fonction et induit un état d'anergie (Avice et al., 2000; Avice et al., 2001). Elle mène aussi à la conversion de cellules T mémoires en cellules T régulatrices fonctionnelles. En ce sens, la TSP produite lors de l'inflammation réduit les dommages associés à une réponse immunitaire dirigée contre le soi ou encore contre des antigènes étrangers (Grimbert et al., 2006). Paradoxalement, la liaison CD47-TSP est impliquée dans l'arrêt des cellules T sur les cellules endothéliales inflammatoires, suggérant un rôle possible dans la boucle inflammatoire (Ticchioni et al., 2001). L'engagement du CD47 par TSP est également impliqué dans la voie caspase-indépendante de l'apoptose, contribuant à l'élimination des cellules immunes et par conséquent au contrôle de l'homéostasie (Sarfati et al., 2008). Il est difficile de savoir si l'interaction CD47-TSP induit une réponse pro-inflammatoire et/ou anti-inflammatoire en raison des propriétés pléiotropiques de la TSP. Ces propriétés varient sans doute en fonction du contexte inflammatoire et font l'objet de recherches.

Aucune étude n'a été rapportée quant à l'implication de l'interaction CD47-TSP dans l'asthme. Seules 2 publications décrivent l'implication de TSP-1 dans la maladie. En 1996, un groupe américain a démontré une augmentation du niveau de TSP sérique chez les animaux sensibilisés dans un modèle d'asthme allergique chez le mouton, sans doute en réponse au processus inflammatoire mis en branle au cours de la maladie (Huang et al., 1996). Bien qu'une corrélation directe ait été rapportée par ce groupe entre les manifestations cliniques de la dermatite atopique et le niveau de TSP sérique chez l'enfant, aucune étude du genre n'a été publiée pour l'asthme (Huang and Kao, 1993). Indépendamment, une étude publiée en 2001 suggère que la production de TSP-1, pendant un dommage dirigé contre les cellules épithéliales, stimule la libération et l'activation du TGF- β , causant la synthèse de collagène par les myofibroblastes, dans un modèle de culture de fibroblastes et de cellules épithéliales isolées de la trachée de cochon d'inde (Morishima et al., 2001). Somme toute, la TSP ne semble pas directement impliquée dans la pathophysiologie de l'asthme.

1.8.2 CD47-SIRP α : La tolérance du soi

Le CD47, exprimé à la surface de toutes les cellules, joue un rôle de marqueur du soi. En se liant à SIRP α , le CD47 donne un signal inhibiteur aux cellules phagocytaires SIRP α ⁺ afin d'éviter leur élimination. Ce signal est décrit dans la littérature comme un signal "don't eat me". Lors d'une transfusion chez la souris sauvage par exemple, les globules rouges CD47^{-/-}, comparativement aux globules rouges CD47^{+/+}, sont rapidement éliminés par les macrophages de la rate de souris CD47^{+/+}. En revanche, malgré qu'ils expriment SIRP α , les macrophages de la souris CD47^{-/-} n'éliminent pas ses propres globules rouges. Des expériences de chimères ont proposé que lorsque les macrophages de la souris déficiente en CD47 sont éduqués par les cellules non hématopoïétiques exemptes de CD47, elles sont incapables d'exercer leur fonction phagocytaire. Ainsi, l'absence du CD47 est primordiale pour induire la tolérance des macrophages face aux cellules CD47^{-/-} (Wang et al., 2007a). Il a été également démontré que lors d'une xénotransplantation, le

CD47 exprimé à la surface du greffon de porc n'interagit pas avec le SIRP α des macrophages humains. Par conséquent, le signal inhibiteur de la phagocytose n'est pas donné aux phagocytes humains, qui s'attaquent au greffon. Suite à la manipulation génétique ou encore grâce à une protéine de fusion humaine, l'expression du CD47 humain à la surface des cellules de porc réduisait leur élimination par les cellules humaines. Ce concept du soi montre l'implication de l'interaction CD47-SIRP α dans le rejet de greffe, tant lors de la xénotransplantation que pour la transplantation de cellules souches (Ide et al., 2007; Takenaka et al., 2007).

1.8.3 CD47-SIRP α : La migration des cellules de l'immunité innée

Plusieurs études ont montré le rôle de l'interaction CD47-SIRP α dans le contrôle de la migration de différentes cellules myéloïdes et par conséquent, dans la réponse inflammatoire. *In vitro* avec des cellules humaines, il a d'abord été démontré que des anticorps dirigés contre le CD47 inhibent la migration des neutrophiles au travers d'une monocouche de cellules épithéliales ou endothéliales. L'augmentation de l'expression de CD47 sur les cellules épithéliales, à l'inverse, favorise la migration des neutrophiles. D'autre part, l'anti-SIRP α interfère partiellement avec le passage des neutrophiles à travers les cellules épithéliales humaines. Ces résultats suggèrent l'implication de mécanismes dépendants et indépendants de SIRP α pour la régulation de la migration des neutrophiles par le CD47 (Sarfati et al., 2008). Des études *in vivo* chez la souris ont montré l'importance du CD47 dans la migration adéquate des polymorphonucléaires. Dans un modèle de péritonite où les neutrophiles sont essentiels au contrôle de la maladie, l'inoculation avec *Escherichia coli* entraînent, en moins de 2 jours, 100% de mortalité chez les souris déficientes en CD47 alors qu'aucune souris sauvage ne succombe à un tel traitement (Lindberg et al., 1996). Par ailleurs, dans des modèles d'infection pulmonaire, les souris déficientes en CD47 sont protégées contre les lésions pulmonaires aiguës induites par le LPS et contre la pneumonie à *E. coli*. Les auteurs de l'étude suggèrent que les neutrophiles jouent un rôle important dans l'induction d'une

réponse proinflammatoire pulmonaire destructrice, à l'origine des symptômes de la maladie et que l'absence du CD47 sur les neutrophiles permet le contrôle des maladies grâce au maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et endothéliale (Su et al., 2008). De la même façon, les souris CD47^{-/-} sont moins susceptibles de développer l'arthrite induite par *Staphylococcus aureus*, maladie au cours de laquelle les neutrophiles sont essentiels à l'initiation de la destruction des os et des cartilages (Verdrengh et al., 1999).

Le rôle de l'axe CD47-SIRP α dans la migration des DCs a également été exploré *in vivo* chez la souris. En effet, il a été démontré que la migration des cellules Langerhans, DCs de l'épiderme qui expriment CD47 et SIRP α , est négativement régulée par l'interaction des 2 molécules. La liaison du SIRP α par un anticorps anti-SIRP α ou avec le CD47-Fc ainsi que l'interaction du CD47 avec le SIRP α -Fc entravent la migration des DCs de l'épiderme aux ganglions drainants dans des expériences d'hypersensibilité de contact et de sensibilisation cutanée au FITC (Fukunaga et al., 2004; Fukunaga et al., 2006; Yu et al., 2006). Des expériences chez la souris déficiente en CD47 ont démontré un défaut de migration des DCs de la peau à l'état de base et sous des conditions inflammatoires menant à une réduction de la prolifération des cellules T. Le CD47 régule sélectivement le passage des DCs à travers les vaisseaux lymphatiques et la barrière endothéliale, étape essentielle à leur migration de la circulation vers les tissus (Hagnerud et al., 2006; Van et al., 2008). Le processus de migration des DCs est CCR7-indépendant et requiert l'expression du CD47 sur la DC et non sur l'endothélium (Van et al., 2008).

Le CD47 est aussi impliqué dans la migration des monocytes à travers l'endothélium du cerveau et l'épithélium de la barrière alvéolaire (de Vries et al., 2002; Rosseau et al., 2000). Le traitement des cellules épithéliales ou des monocytes avec un anticorps anti-CD47 inhibe la migration, montrant l'implication du CD47 sur les 2 types cellulaires (Rosseau et al., 2000).

1.8.4 CD47-SIRP α : La régulation de la réponse immune

Généralement, l'interaction du CD47 et du SIRP α entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T entraîne un signal inhibiteur bidirectionnel. *In vitro*, l'engagement du CD47 sur les cellules T activées par un anticorps dirigé contre le CD47 ou par un transfectant L-SIRP α inhibe l'expression du récepteur de l'IL-12 ainsi que la réponse à l'IL-12. Du côté de la cellule présentatrice d'antigènes, l'engagement de SIRP α à la surface des DCs myéloïdes par le CD47Fc prévient leur maturation et inhibe la production de cytokines par les DCs matures. L'interruption du contact entre les 2 molécules de surface inhibe la réponse T, c'est-à-dire la prolifération ainsi que la production d'IFN- γ (Demeure et al., 2000; Latour et al., 2001; Seiffert et al., 2001). Ainsi, l'interaction du CD47 sur les cellules T avec le SIRP α sur les DCs joue un rôle régulateur, en favorisant le maintien de l'homéostasie et en limitant la réponse inflammatoire. Les mêmes conclusions peuvent être tirées à partir d'expériences chez la souris, alors que le CD47 a été associé à la régulation de la réponse Th1 *in vitro* et *in vivo* (Bouguermouh et al., 2008).

1.9 Les souris déficientes en CD47

Le CD47 étant exprimé à la surface de toutes les cellules et impliqué dans de nombreuses interactions et processus biologiques, nous serions intuitivement portés à croire que l'ablation du CD47 aurait des conséquences remarquables. Contre toute attente, les souris Balb/c déficientes en CD47 sont tout à fait viables, se développent normalement et ne présentent aucun défaut de croissance, de fertilité et de longévité. L'analyse histologique des organes ne présente aucune anomalie (Lindberg et al., 1996).

Une investigation plus approfondie de ces souris est nécessaire pour y déceler des différences avec les souris sauvages. Ce sont d'ailleurs ces différences qui ont permis de

comprendre le rôle biologique du CD47. La déficience en CD47 chez la souris est par exemple associée à un défaut de la mémoire cérébrale et à une réduction du potentiel de mémoire à long-terme (Chang et al., 1999). En plus des points mentionnés dans les sections précédentes, plusieurs traits immunologiques sont propres à la souris CD47^{-/-}. D'abord, les souris Balb/c CD47^{-/-} présentent un portrait Th1 d'anticorps à l'état de base et après immunisation, comparativement aux souris Balb/c sauvages qui ont plutôt un phénotype Th2. L'hypersensibilité de contact est d'ailleurs aggravée chez ces souris (Bouguermouh et al., 2008). À noter que les souris CD47^{-/-} sur un fond B6 ne présentent pas de biais Th1 et l'hypersensibilité de contact est plutôt diminuée (Hagnerud et al., 2006). Notre groupe a aussi démontré que le CD47 est nécessaire à la régulation sélective de l'homéostasie des Treg CD103⁺Foxp3⁺, plus précisément pour leur prolifération et expansion. En effet, ces cellules s'accumulent avec l'âge chez la souris déficiente en CD47, sans toutefois que leur fonction suppressive soit affectée. Bien qu'on note une augmentation de la production d'auto-anticorps sériques dirigés contre l'ADN chez les souris CD47^{-/-} âgées, aucune maladie autoimmune ne se développe spontanément chez ces souris (Van et al., 2008). Par contre, dans un modèle transgénique où la déficience en CD47 est combinée à un génotype prédisposant au développement du diabète, on observe une augmentation considérable de l'incidence du diabète (Dugas et al., 2010).

Tel que discuté plus tôt, le CD47 donne un signal négatif au SIRP à la surface des macrophages pour la phagocytose. Toute cellule n'exprimant pas le CD47, signal du soi, est éliminée, à l'exception des cellules CD47^{-/-} chez la souris CD47^{-/-}. Cette fonction constitue une limite à ce modèle; lors des expériences de transferts adoptifs, les cellules CD47^{+/+} et CD47^{-/-} peuvent être transférées à des souris CD47^{-/-} alors que seules les cellules CD47^{+/+} peuvent être transférées à des souris CD47^{+/+}. Finalement, il reste encore beaucoup à apprendre des souris CD47^{-/-}, outil qui a permis jusqu'à ce jour

d'élucider de nombreuses implications du CD47 et de ses interactions dans la réponse immunitaire.

1.10 Mise en contexte de mon travail

Les études du laboratoire portent sur les différents rôles *In vivo* et *In vitro* de la molécule CD47 et de ses ligands dans la réponse immunitaire innée et adaptative. À l'aide d'une souris déficiente en CD47, notre laboratoire a démontré que le CD47 freine le développement d'une réponse de type TH1, en plus d'être impliqué dans la migration des cellules dendritiques. Nous avons donc initialement spéculé sur l'implication du CD47 et de son interaction avec le SIRP α dans la pathophysiologie de l'asthme allergique. Nous avons par conséquent mis sur pied un modèle murin pour vérifier nos hypothèses, dans l'espoir de découvrir une cible thérapeutique contre une maladie largement étudiée mais qui s'avère toujours sans traitement efficace. Nos travaux portant sur l'asthme allergique ont mené à deux publications. La première porte sur la caractérisation de la sous-population de DCs SIRP α immunogénique et son implication dans la maladie alors que la seconde montre l'efficacité et la spécificité du traitement dirigé contre cette population cellulaire.

La seconde partie du projet visait à étudier le rôle de la population de DC SIRP α dans l'asthme sévère non allergique, une maladie encore peu connue. Nous avons développé un modèle murin qui nous a permis d'approfondir les mécanismes impliqués dans l'asthme non-allergique. Du coup, nous avons découvert une population de cellules Th2/Th17 analogue à celle récemment démontrée chez les patients atteints de la maladie en plus d'élucider pour la première fois le mécanisme de conversion de ces cellules.

L'ensemble de ces résultats sont présentés sous forme d'articles dans la section suivante.

2. RÉSULTATS

2.1 Article I : Le contrôle sélectif de la migration des DC SIRP α^+ par le CD47 est essentiel au développement de l'inflammation allergique Th2.

Marianne Raymond, Manuel Rubio, Geneviève Fortin, Karim Hamdy Shalaby, Hamida Hammad, Bart N. Lambrecht et Marika Sarfati

Journal of Allergy and Clinical Immunology, December 2009; 124(6):1333-42.

Contribution des auteurs

- Marianne Raymond : Conception, réalisation et analyse de l'ensemble des expériences à l'exception de la figure 3a). Contribution majeure à la rédaction du manuscrit.
- Manuel Rubio : Assistance lors de la conception, la réalisation et l'analyse des résultats.
- Karim Hamdy Shalaby : Réalisation et analyse de l'hyperréactivité bronchique (figure 3a).
- Geneviève Fortin, Hamida Hammad et Bart N. Lambrecht : Assistance technique et contribution intellectuelle pour l'analyse des résultats et la révision du manuscrit.
- Marika Sarfati : Conception, supervision et analyse des résultats ainsi que rédaction du manuscrit.

Résumé

Contexte: Les DCs sont essentielles à l'initiation et au maintien de la réponse Th2 dirigée contre les antigènes inhalés, qui conduit au développement des désordres allergiques. Deux sous-populations de DCs non plasmacytoïdes ($CD11b^{low}CD103^+$ et $CD11b^{high}CD103^-$) se trouvent dans les poumons. Toutefois, l'identification et les propriétés fonctionnelles de la sous-population de DCs responsable de la réponse Th2 doivent être clarifiées. Il est connu que le CD47, ligand de SIRP- α , contrôle la migration des DCs de la peau.

Objectif: Nous avons investigué le rôle de l'interaction CD47/SIRP α dans la migration des DCs des voies respiratoires et dans le développement de l'inflammation pulmonaire allergique.

Méthodes: Nous avons caractérisé les populations de DCs dans les poumons et les ganglions médiastinaux des souris BALB/c $CD47^{-/-}$ et $CD47^{+/+}$ dans un modèle d'asthme allergique expérimental. Les souris ont d'abord été immunisées par la voie systémique (ovalbumine-alun injecté par la voie intra-péritonéale) ou localement (ovalbumine-DCs injectées par la voie intra-trachéale) et ont ensuite été exposées à des inhalations d'ovalbumine. Nous avons également évalué les conséquences de l'administration de la molécule de fusion SIRP α -Fc sur le développement de la maladie chez la souris BALB/c.

Résultats: SIRP α identifie sélectivement les DCs $CD11b^{high}CD103^-$ qui s'accumulent préférentiellement dans les ganglions médiastinaux durant l'inflammation pulmonaire. De plus, l'accumulation des DCs $CD103^-SIRP\alpha^+$, la réponse Th2 et la maladie pulmonaire sont réduites chez les souris $CD47^{-/-}$. Le transfert adoptif de DCs $CD103^-SIRP\alpha^+ CD47^{+/+}$, contrairement aux DCs $CD47^{-/-}$, induit une forte réponse Th2 chez les souris $CD47^{-/-}$ ainsi

qu'une inflammation pulmonaire. Finalement, l'administration de la molécule SIRP α -Fc protège les souris BALB/c de l'inflammation des voies respiratoires.

Conclusion: La migration des DCs pulmonaires CD11b^{high}CD103⁻SIRP α ⁺ est contrôlée par l'expression de CD47 et la manipulation de la voie CD47/SIRP α réprime la réponse inflammatoire Th2 pathogénique initiée par les DCs CD103⁻SIRP α ⁺.

**Selective control of SIRP- α^+ airway DC trafficking through CD47 is critical
for the development of Th2-mediated allergic inflammation**

Marianne Raymond MSc¹, Manuel Rubio BSc¹, Geneviève Fortin BSc¹, Karim Hamdy Shalaby BSc², Hamida Hammad PhD³, Bart N. Lambrecht MD, PhD³ and Marika Sarfati MD, PhD¹

¹ Immunoregulation Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Research Center, Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

² Meakins-Christie Laboratories, McGill University, Montreal, Québec, Canada.

³ Laboratory of immunoregulation, University of Ghent, Ghent, Belgium.

Address correspondence to Dr. Marika Sarfati, Immunoregulation, Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame (Pavillon Mailloux, M4211K), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

This work was supported by the Canadian Institute for Health and Research (CIHR Grant, MOP-53152).

Total word count: 3,461.

Key Messages.

- ✓ CD11b^{high}CD103⁻ DCs express SIRP- α ⁺ and are critically implicated in the development of Th2-mediated airway allergic inflammation.
- ✓ CD47 expression on immunogenic SIRP- α ⁺ DCs regulates their trafficking.
- ✓ Blocking CD47/SIRP- α interaction prevents the development of airway allergic inflammation.

Capsule summary.

Immunogenic airway DCs are identified as SIRP- α ⁺ and their trafficking is selectively governed by self-CD47 expression. Manipulation of the CD47/SIRP- α axis protects from Th2-mediated experimental allergic airway inflammation.

Key words. Dendritic cells, migration, CD103, allergic inflammation, Th2, CD47, SIRP α

Abbreviations.

AHR, airway hyperresponsiveness; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; BMDC, bone marrow derived DC; CPM, count per minute; DC, dendritic cell; IP, intraperitoneal; IT, intratracheal; mLN, mediastinal lymph node; OVA, ovalbumine; pDC, plasmacytoid DC; SIRP α , signal regulatory protein alpha; Th2, T helper type 2; Tg, transgenic; Treg, regulatory T cell.

2.1.1 Abstract

Background: Dendritic cells (DCs) are essential for the initiation and maintenance of T helper type 2 (Th2) responses to inhaled antigen that lead to the establishment of allergic diseases. Two subpopulations of non plasmacytoid DCs (i.e. CD11b^{low}CD103⁺ and CD11b^{high}CD103⁻) are found in lung/airway tissues. Yet, the identification and migratory properties of the DC subset that contributes to Th2-mediated responses remain to be clarified. CD47, a SIRP- α partner, reportedly governed skin DC migration.

Objective: We here thought to investigate the role of CD47/SIRP- α interactions in airway DC trafficking and the development of allergic airway inflammation.

Methods: We characterized the DC influx into lungs and mediastinal lymph nodes (mLNs) in CD47^{-/-} and CD47^{+/+} BALB/c mice using experimental models of allergic asthma. Mice were systemically (i.p. OVA/Alum) or locally (i.t. OVA-loaded-BMDCS) immunized and challenged by OVA aerosol. We also evaluated the consequences of SIRP- α -Fc fusion molecule administration on the induction of airway disease in BALB/c mice.

Results: SIRP- α selectively identified the CD11b^{high}CD103⁻ DC subset that predominantly accumulated in mLNs during airway inflammation. However, CD103⁻SIRP- α ⁺ DC trafficking, Th2 responses and airway disease were impaired in CD47^{-/-} mice. Importantly, the adoptive transfer of CD103⁻SIRP- α ⁺CD47^{+/+} but not CD47^{-/-} DCs elicited a strong Th2 response in CD47^{-/-} mice. Finally, the administration of SIRP- α -Fc molecule protected BALB/c mice from allergic airway inflammation.

Conclusions: Lung CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs migration is governed by self-CD47 expression and manipulation of the CD47/SIRP- α pathway suppresses CD103⁻SIRP- α ⁺ DC-driven pathogenic Th2 responses and airway inflammation.

2.1.2 Introduction

Allergic asthma is characterized by elevated serum IgE and the production of pro-inflammatory type 2 cytokines both in the bronchial tissues and the draining LNs¹⁻⁵. Dendritic cells (DCs) play a central role in the induction and perpetuation of Th2-driven allergic airway inflammation⁶. Conditional gene depletion of airway CD11c⁺ DCs before aerosol challenge, or even in mice with established airway inflammation, abolishes asthma features⁷. Compounds that include sphingosine-1-phosphate (S1P) and prostacyclin analogs inhibit asthma development by directly manipulating DC function and migration⁸⁻¹².

Different lung DC subsets have been identified with distinct anatomical localizations and functions¹³. Plasmacytoid DCs (CD11c^{low}CD11b⁻GR1⁺B220⁺120G8⁺, pDCs) are found in the lung interstitium and conducting airways and dictate Th cell fate to innocuous antigens by stimulating the generation of regulatory T cells (Treg)^{14, 15}. The adoptive transfer of pDCs protects them from developing asthma¹⁶. The non-plasmacytoid DCs (CD11c^{high}CD11b⁺, mDCs) promote the differentiation of naïve T cells and the activation of Th2 effector cells¹⁷. The mDCs are further subdivided into CD11b^{high}CD103⁻ and CD11b^{low}CD103⁺ DC subsets¹⁸⁻²⁰. While both are specialized in presenting innocuous antigen, which of these two DC subpopulations contributes to the induction and exacerbation of airway inflammatory responses remains to be clarified. CCR6 and CCR2 regulate DC precursor and monocyte transmigration into lungs early after an inflammatory insult²¹, while airway DC trafficking to mLNs is rather controlled by CCR7 expression at steady state²²⁻²⁴. However, other chemokine receptors are likely involved in lung DC trafficking since appreciable Th2-responses can still be mounted in *p/t* mutant mice, a strain displaying a disruption of CCR7 ligands^{25, 26}. Therefore, the identification of immunogenic airway DC subsets and the molecules that control lung egress is crucial to unravel novel therapeutic targets for Th2-mediated disorders.

CD47 is a marker of self that is ubiquitously expressed on the surface of immune and non-immune cells.²⁷ Through interactions with its two ligands coexpressed on DCs, SIRP- α and thrombospondin, CD47 is implicated in the negative regulation of the immune response^{28, 29}. By contrast, CD47 expression on skin myeloid DCs positively governs *in vivo* DC migration toward draining LNs, while CD47^{-/-} DCs express normal levels of CCR7³⁰⁻³². By performing a series of complementary approaches *in vivo*, we here identify CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs as the primary immunogenic DC subset that migrates out of tissues to promote Th2 responses in mLNs and drive airway disease. Using CD47^{-/-} mice and BALB/c mice treated with SIRP- α -Fc fusion molecule, we provide evidence that CD47/SIRP- α interactions are implicated in the pathogenesis of DC-driven allergic airway inflammation and demonstrate that CD47/SIRP- α interactions may be targeted to alter the development of Th2-mediated responses.

2.1.3 Materiel and Methods

Mice

The CD47^{-/-} mice were backcrossed onto CD47^{+/+}BALB/c mice for 16 to 18 generations. Control BALB/c mice and BALB/c expressing DO11.10 (OVA-specific) TCR (Tg) were purchased from Charles River Labs. 6 to 8 week old female mice were used in all experimental protocols as approved by the Canadian Council on Animal Care and maintained under specific pathogen free conditions.

A mouse model of asthma by systemic IP immunization

CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice were sensitized by IP injection of 10µg OVA (Sigma, Grade V) adsorbed to 1mg Imject Alum (Pierce) on days 0 and 5. On days 12, 16 and 20, mice were challenged for 30 minutes with a 0.5% OVA aerosol (Sigma, Grade V). In some experiments, CD47^{+/+} mice were treated IP with 50µg of control human CD47-Fc³¹ or 50µg of murine SIRP-α-Fc (Novartis, Basel, Switzerland) on days 0 and 5. BALF was collected 4 times with 0.5ml physiologic saline and lung and mLN were isolated. Lungs were cut into small pieces and cultured for 24h in culture medium (RPMI 1640 (Wisent Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 500U/ml Penicillin, 500µg/ml Streptomycin, 10mM HEPES buffer and 1mM 2-ME). MLN cells (4x10⁶ cells/ml) were cultured with OVA (100µg/ml) for 72h in culture medium.

Preparation of BMDCs and DC/T cell cocultures.

BM cell suspensions were obtained from femurs and tibias of CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice and cultured in culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum and 20ng/ml GM-CSF (PeproTech) for 13 days. The medium was refreshed every 3 days. BMDCs were pulsed with 100µg/ml LPS-low OVA (Sigma, Grade V) on day 12 of the culture. For co-culture experiments, 5x10⁴ CD47^{+/+} or CD47^{-/-} BMDCs were cultured with 1x10⁵ DO11.10 TCR transgenic (Tg) CD47^{-/-}CD4⁺T cells for 5 days with 1 µg/ml OVA peptide (residues 323–339 of chicken OVA, Peptides International) under Th2 polarizing conditions (IL-4,

20ng/ml and anti-IFN- γ , 1 μ g/ml). After washing, cells were restimulated with PMA and ionomycin.

Mouse models of airway inflammation induced by the adoptive transfer of BM-DCs

Mice sensitized IP with OVA/Alum received intratracheal (IT) injections of 1×10^6 OVA-pulsed BMDCs. In a second model, mice were instilled with 1×10^6 OVA-pulsed BMDCs and challenged with OVA aerosol.

Migration assays

CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice were instilled IT with 0.1% FITC-conjugated carboxylate YG microspheres (0.5 μ m, 2.5% solid-latex, Polysciences Inc.). 24 or 48 hours later, BALF was performed and mLNs were collected and treated with liberase (0.4mg/ml, Roche). For some experiments, CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice were passively transferred with 2×10^6 CFSE-labeled- Tg CD4⁺ T cells one day prior OVA/Alum IP immunization in presence or absence of SIRP- α -Fc or control Fc molecule. On day 2, LNs were analyzed for CFSE cell dilution (Mean Fluorescence intensity (MFI)). Anti-clonotypic mAb KJ126 PE (BD Biosciences) was used with anti-CD4 APC (BD Biosciences) to retrace divided and undivided Tg cells.

Airway Histology

After BALF was performed, OCT compound was injected into the lungs through the lavage canula. Lungs were frozen in OCT compound and 5 μ m sections were prepared for H&E and PAS staining and examined by light microscopy.

Determination of AHR

Mice were anesthetized with xylazine hydrochloride (NovaPharm) followed by sodium pentobarbital (CEVA). AHR was measured using a small animal mechanical ventilator (FlexiVent, Scireq). Upon initiating ventilation, mice were paralyzed (pancuronium

bromide, Sabex) and exposed to aerosolized saline followed by increasing doses of aerosolized metacholine (Sigma).

Flow cytometry

Total BAL cells were stained for 30 minutes with anti-CCR3 PE (R&D systems), anti-CD3 FITC (clone 145-2C11) and anti-B220 FITC (R&D systems), as described in *Van rijt L.S. et al.*³³. To characterize the DC subsets, mLNs and lungs were treated with liberase (0.4mg/ml, Roche). Lung cell suspensions were treated with NH₄Cl for red blood cell lysis before staining with the following antibodies: anti-CD11c FITC, anti-CD11b FITC, anti-I-Ad/I-Ed PE, 120G8 FITC, CD103 PE, anti-CD47 FITC, biotinylated-anti-CD103- and biotinylated-anti-SIRP- α mAbs followed by SA-APC or PerCp (BD Biosciences), anti-GR1, anti-B220 FITC (R&D systems), anti-CD11c APC (clone N418), anti-CD11b PE (Caltag). In lungs, autofluorescent alveolar macrophages were excluded from the analysis gates using empty PE-Texas Red or PerCp (FL3) channel. For Treg, cells were first stained with anti-CD4 APC and anti-CD25 FITC (BD Biosciences), fixed, permeabilized and stained with anti-Foxp3 PE (kit from eBiosciences). All the data were acquired on a FACSCalibur or Cantoll Flow Cytometer using Cellquest or *DIVA* software (BD Biosciences).

Cytokine and Ig measurements

IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ (BD Biosciences), IL-13 and (R&D Systems) were measured in mLNs supernatants by ELISA. Total and OVA-specific IgE and IgG1 production were quantified in the serum by ELISA.

Proliferation

For the last 18 hours of culture, mLN cells were pulsed with 1 μ Ci of 3[H] thymidine (Amersham Biosciences) and harvested for liquid scintillation counting. Data are expressed as counts per minute (CPM).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using unpaired student's T test and the non-parametric Mann-Whitney U test. Mean \pm SEM or SD when mentioned. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

2.1.4 Results

CD11b^{high}CD103⁻ DCs that express SIRP- α are mobilized during airway inflammation.

The identification and migratory properties of the lung DC subset that contributes to Th2 responses remains unclear. Since CD47 expression on SIRP- α ⁺ skin DCs but not on lymphatic vessels positively controls their trafficking to LNs³¹, we first evaluated the level of SIRP- α and CD47 expression on the two major airway DC subsets. To this end, we used an experimental model of chronic allergic asthma induced by OVA (**Fig 1a**), which is characterized by lung cellular infiltration, mucus production and eosinophil accumulation in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (**Fig 1b and c**). We here showed, for the first time, that CD11b^{high}CD103⁻ but not CD11b^{low}CD103⁺DCs were identified by SIRP- α expression in lungs as well as in the mLN of naïve and sensitized mice (**Fig 1d and e**). In fact, the great majority (> than 98%) of the CD11b^{high}CD103⁻DC subpopulation expressed SIRP- α . Interestingly, CD103⁺SIRP- α ⁻ and CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs displayed similar amounts of CD47. We next demonstrated that the characteristic influx of CD11c⁺DCs into the lungs and mLN in sensitized mice was specifically attributed to an increase in the percentage and absolute numbers of the CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DC subset (**Fig 1f and g**). In contrast, the frequency and numbers of CD11b^{low}CD103⁺SIRP- α ⁻ DCs were not augmented upon development of airway inflammation. On the basis of these findings, we hypothesize that CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs are implicated in the development of Th2-mediated airway allergic inflammation and that their recruitment to mLN is regulated by CD47.

CD47 governs airway CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DC migration during experimental asthma.

Therefore, to gain mechanistic insight into the role of CD47/SIRP- α interactions in allergic airway inflammation, we induced experimental asthma in CD47^{-/-} mice and examined the distribution of CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs in their lungs and mLN. We observed a decrease in bronchial AHR (**Fig 2a**) that occurred together with a significant reduction in

pulmonary cellular inflammation, mucus secretion (**Fig 2b**) the total number of inflammatory cells in the BALF (**Fig 2c**). Among CD11c⁺MHC Class II⁺ cells, mDCs were recruited in lower numbers in CD47^{-/-} as compared to CD47^{+/+} mLNs, while pDC accumulation was comparable in both strains of mice (**Fig 3a**, left panel). Accordingly, the mDC/pDC cell ratio was strongly enhanced in the mLNs of sensitized CD47^{+/+} mice as compared to CD47^{-/-} mice (**Fig 3a**, right panel). Among the mDC subsets examined, we found a drastic reduction in the percentage and absolute numbers of CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs in CD47^{-/-} mice (**Fig 3b**). The trafficking of the CD103⁺SIRP- α ⁻ DC subset to mLNs appeared to be independent of CD47. The impaired homing to mLNs of CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs was unlikely to be attributed to altered DC precursor recruitment from the bloodstream into the lungs, since DC subsets accumulated in similar proportions and numbers in the inflamed lungs of both CD47^{-/-} and CD47^{+/+} mice (**Fig 3c**).

CD47 is required for DC migration from lung to mLNs at steady state.

Since we observed a significant reduction in the frequency and absolute numbers of CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs in the mLNs of sham-treated CD47^{-/-} mice (**Fig 3b**), we evaluated DC trafficking over time in draining mLNs of mice that were instilled intratracheally with FITC-conjugated microspheres (**Fig 3d**). We observed a reduction in the percentage of CD11c⁺CD11b^{high}CD103⁻FITC⁺ cells that accumulated in the mLNs of CD47^{-/-} mice as compared to CD47^{+/+} mice, demonstrating an altered migration of CD47^{-/-} CD11b^{high}CD103⁻ DC carrying Ag at steady state (**Fig 3e**). BALF isolated from the two strains of mice contained a similar proportion of DCs that have phagocytosed fluorescent beads, suggesting that the absence of CD47 did not interfere with Ag uptake by interstitial DCs recovered in the lavage (**Fig 3f**). Taken all, these results have provided the first evidence that CD47 promotes CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DC homing to mLNs in naïve and sensitized mice that developed airway disease.

CD47 promotes CD103⁻SIRP- α ⁺ DC-mediated Th2-mediated responses.

Since the DCs are essential to the development of Th2 responses *in vivo*, we next examined the OVA-specific T cell responses in mLN of CD47^{+/+} and CD47^{-/-} sensitized mice. Although the proportion of CD4⁺ T cells (**Fig 4a, left panel**) and different CD4⁺ T cell subsets (data not shown) were comparable in the two groups of mice, the proliferation of cells isolated from CD47^{-/-} mLN was significantly reduced following *ex vivo* re-stimulation with OVA (**Fig 4a, right panel**). Accordingly, the production of Th2 cytokines was strongly suppressed in CD47^{-/-} mice (**Fig 4b**). The inhibition of the Th2 response in CD47^{-/-} mice was not linked to an altered proportion of naturally occurring CD4⁺Foxp3⁺ cells, nor to an immune deviation towards Th1 or adaptive regulatory T cells (Tr1) since both IFN- δ and IL-10 secretion were inhibited (**Fig 4c and d**). Total IgE and OVA-specific IgE and IgG1 Ab responses were significantly diminished in CD47^{-/-} mice, an indication of their compromised capacity to mount a systemic Th2 response (**Fig 4e and f**). The decreased IgE levels readily seen at day 12 after sensitization immediately before OVA challenge (**Fig 4e, d12**), pinpointed an early defect in the recruitment of DC precursors from the periphery to the mLN of CD47^{-/-} mice, resulting in impaired Th priming. To validate this point, CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice were passively transferred with CFSE-labeled CD47^{+/+} CD4⁺ Tg T cells 1 day prior IP OVA-alum immunization (**Fig 4g**). At day 2, no T cell proliferation was observed in other lymph nodes (i.e. inguinal LN) since the IP delivery of OVA-Alum primes adaptive Th2 responses directly in the mLN, bypassing the spleen³⁴. The proportion of divided CD47^{+/+} Tg T cells was significantly reduced in CD47^{-/-} compared to CD47^{+/+} mLN (**Fig 4h**, 0.55 vs 0.23%, $p < 0.05$). Accordingly, the frequency of undivided cells and the MFI of CFSE KJ126⁺ cells were significantly increased in CD47^{-/-} mice (**Fig 4h**, $p < 0.01$). These data suggest that impaired local and systemic Th2 responses seen in CD47^{-/-} mice are linked to a defective CD103⁻ SIRP- α ⁺ DC homing to mLN.

In vivo Ag delivery by local transfer of CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs restores CD47^{-/-} T helper cell function.

To establish direct causative links between defective DC trafficking and impaired Th2 responses, we next show that local delivery of Ag by two intratracheal injections of OVA/LPS^{low}-pulsed bone marrow-derived DCs (BMDCs), in the absence of aerosol challenge, was sufficient to restore a Th2 response in OVA-sensitized CD47^{-/-} mice (**Fig 5a**). Notably, the BMDCs are CD11b⁺CD103⁻SIRP- α ⁺ (See **Figure 1a in the Online Repository**), supporting the concept that BMDCs may function like immunogenic CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α lung DCs¹⁶. The amounts of IL-4, IL-5 and IL-13 elicited by BMDCs in CD47^{-/-} and CD47^{+/+} mice were 8 to 20 fold higher than those induced in IP OVA-sensitized and aerosol challenged mice (**Fig 5b**). Accordingly, the OVA-specific IgE response and eosinophils numbers in the BALF were comparable in the two hosts (**Fig 5c and d**). We conclude that CD47^{-/-} T cells were capable of mounting a robust Th2 response *in vivo* and that airway CD47⁺CD103⁻SIRP- α ⁺ DC recruitment to mLN was sufficient to drive a Th2 response in otherwise protected immunized CD47^{-/-} mice.

CD47 expression is required on CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs to promote a Th2-mediated airway inflammation.

We further analyzed the relative contribution of CD47 expression on BMDCs to their trafficking into mLN and ability to directly prime or reactivate effector Th2 cells. To this end, naïve CD47^{-/-} mice were sensitized with a single intratracheal administration of CD47^{+/+} and CD47^{-/-} OVA-loaded BMDCs and challenged by OVA aerosol (**Fig 6a**). Both phenotype and Th2 polarizing capacity were found to be independent of CD47 expression on the BMDCs (See **Figure 1 in the Online Repository**). We found that CD47^{-/-} mice instilled with CD47^{-/-}SIRP- α ⁺BMDCs displayed no cellular infiltration or mucus production in lungs (**Fig 6b**) and lower IL-5 and IL-13 secretion *in vivo* when compared to hosts immunized with CD47^{+/+} BMDCs (**Fig 6c**). Taken collectively, CD47 expressed by CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs themselves governs their trafficking to mLN to promote the development and maintenance of Th2-driven allergic airway inflammation.

The interruption of CD47/SIRP- α protects BALB/c mice from Th2-driven airway inflammation.

Because CD47 on CD103⁻SIRP- α ⁺ airway DCs and not on lymphatic cells appear as a critical molecule in the initiation and perpetuation of Th2 immunity, it may therefore be harnessed therapeutically to reduce lung inflammation and ameliorate airway disease. BALB/c mice administered SIRP- α -Fc on days 0 and 5 of OVA immunization (**Fig 7a**) had very few or no inflammatory cell infiltration of the lung tissues after OVA aerosol challenge (**Fig 7b**). A strong reduction of inflammatory cells in the BALF (**Fig 7c**) occurred together with a drop in serum OVA-specific IgE (**Fig 7d**) and a drastic inhibition in Th2 cytokine production in the mLNs (**Fig 7e**). The protection from airway inflammation was not correlated with an increase in IL-10 nor IFN- γ release, which in fact were also suppressed in treated mice (data not shown). Moreover, the administration of SIRP- α -Fc led to significant changes in the proportion of divided and undivided CFSE-labeled Tg T cells in the mLNs of OVA-immunized mice (**Fig 7f**, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively), underscoring the impaired DC-driven Th responses seen in sensitized and challenged CD47^{-/-} mice (**Fig 4h**). These data demonstrate that CD47/SIRP- α interruption at primary Ag sensitization largely prevents Th2 responses in mLNs as well as IgE-dependent airway inflammation.

2.1.5 Figures

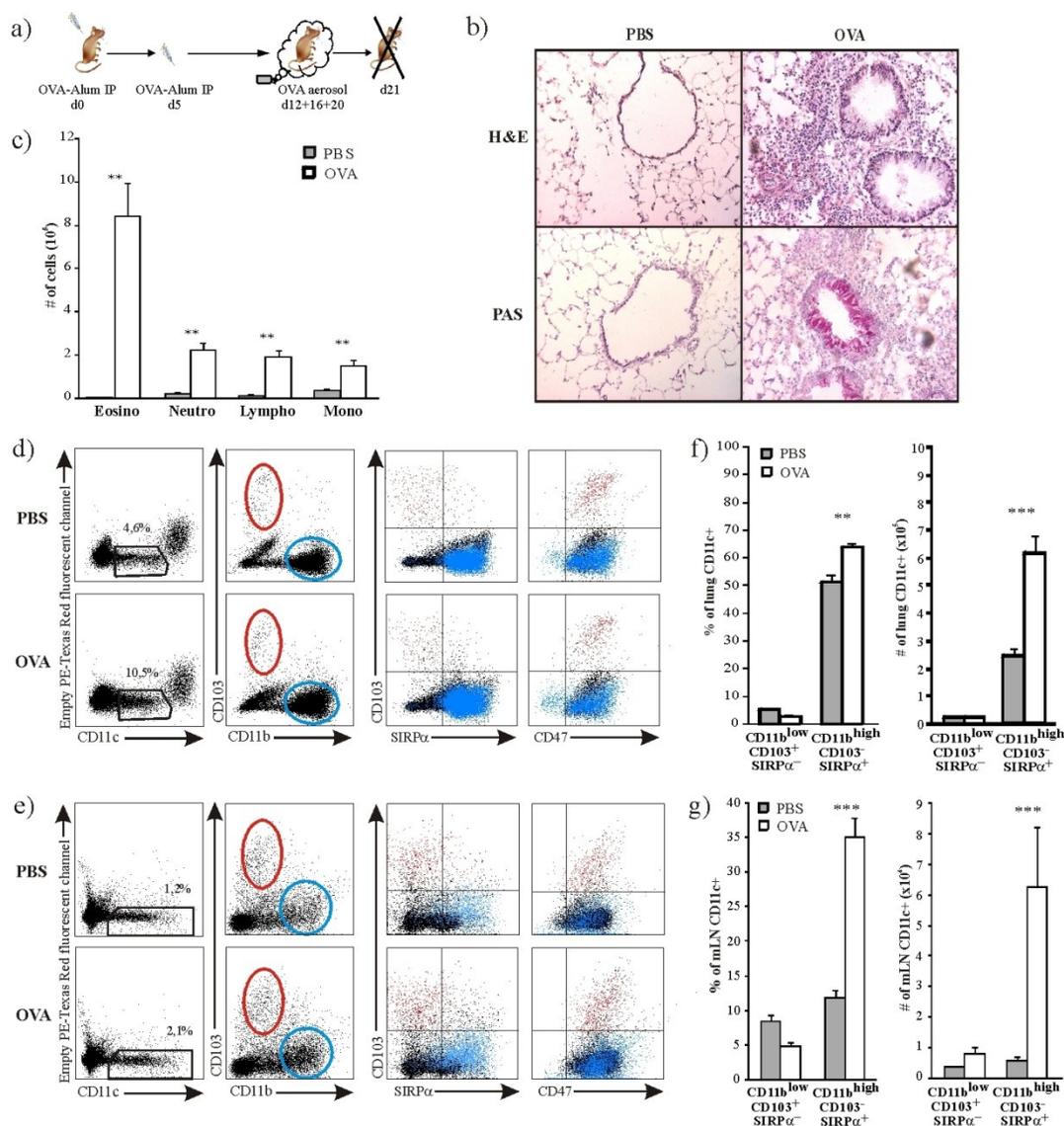


Figure 1.1 CD11b^{high}CD103⁻DCs preferentially expressed SIRP- α and are recruited during allergic airway inflammation.

(a) Immunization procedure. (b) Lung sections stained with H&E and PAS. (c) BALF cell numbers. CD103 and CD11b expression gated on CD11c⁺ DCs in (d) lungs and (e) mLNs. SIRP- α and CD47 expression gated on CD11c⁺CD11b^{low}CD103⁺ (red) and CD11c⁺CD11b^{high}CD103⁻ (blue) cells. Percentage and absolute numbers of (f) lung and (g) mLN DC subsets, mean \pm SEM (5 to 10 mice/group).

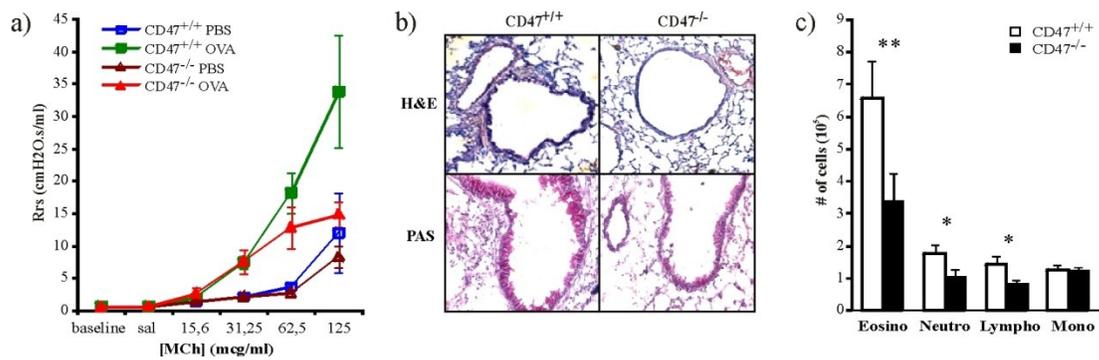


Figure 1.2 CD47 deficiency reduces the severity of experimental allergic asthma.

(a) Resistance to various doses of methacholine of CD47^{+/+} and CD47^{-/-} sensitized and challenged mice. (b) Lung sections stained with H&E and PAS. Data are representative of 5 individually analyzed lungs. (c) BALF cell numbers. Mean \pm SEM (5 to 10 mice/group).

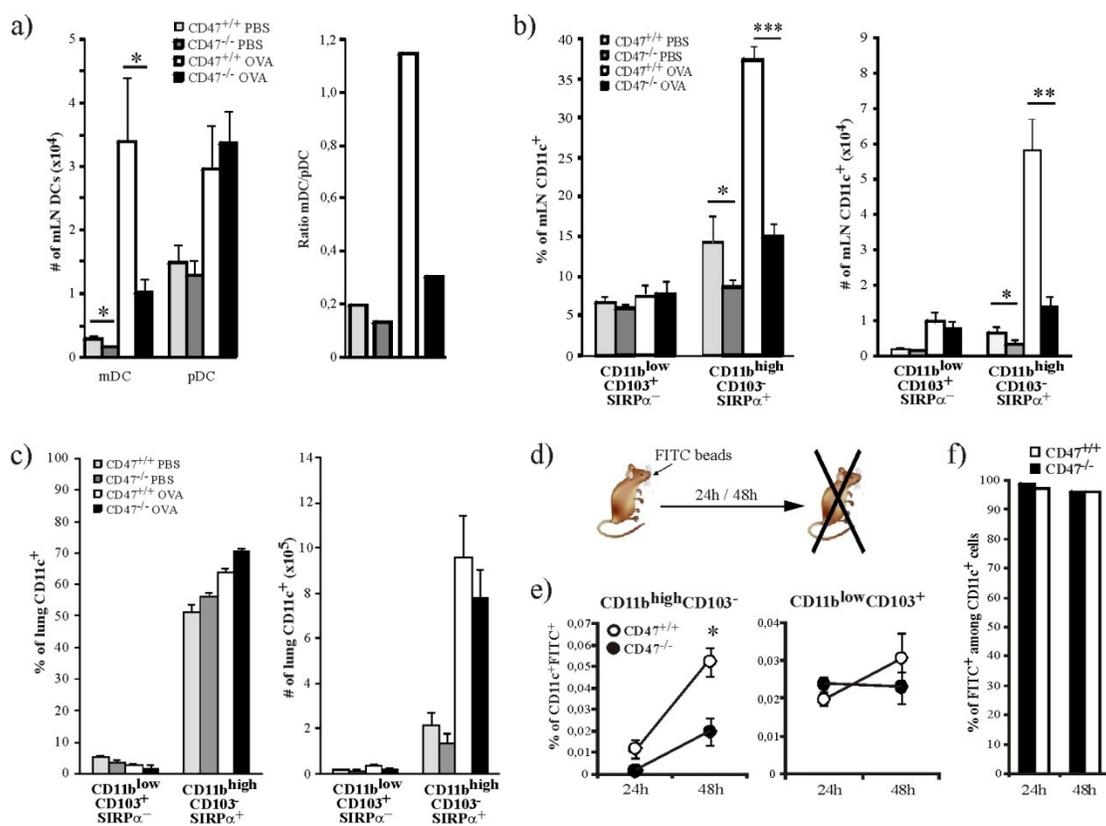


Figure 1.3 CD47 selectively controls airway CD11b^{high}CD103⁻SIRP- α ⁺ DC migration at steady state and during allergic airway disease.

(a) CD11chigh/I-A⁺ (mDCs) and CD11clow/B220+120G8⁺ (pDCs) (left panel) and mDC/pDC ratio (right panel). Percentage and absolute numbers of DCs subsets (gated on CD11c⁺) in (b) mLN and (c) lung (8 to 10 mice/group). (d) Naive CD47^{+/+} and CD47^{-/-} mice injected IT with FITC-conjugated microspheres and CD11c⁺FITC⁺ cells in (e) mLN and (f) BALF. Mean \pm SEM (3 mice/group).

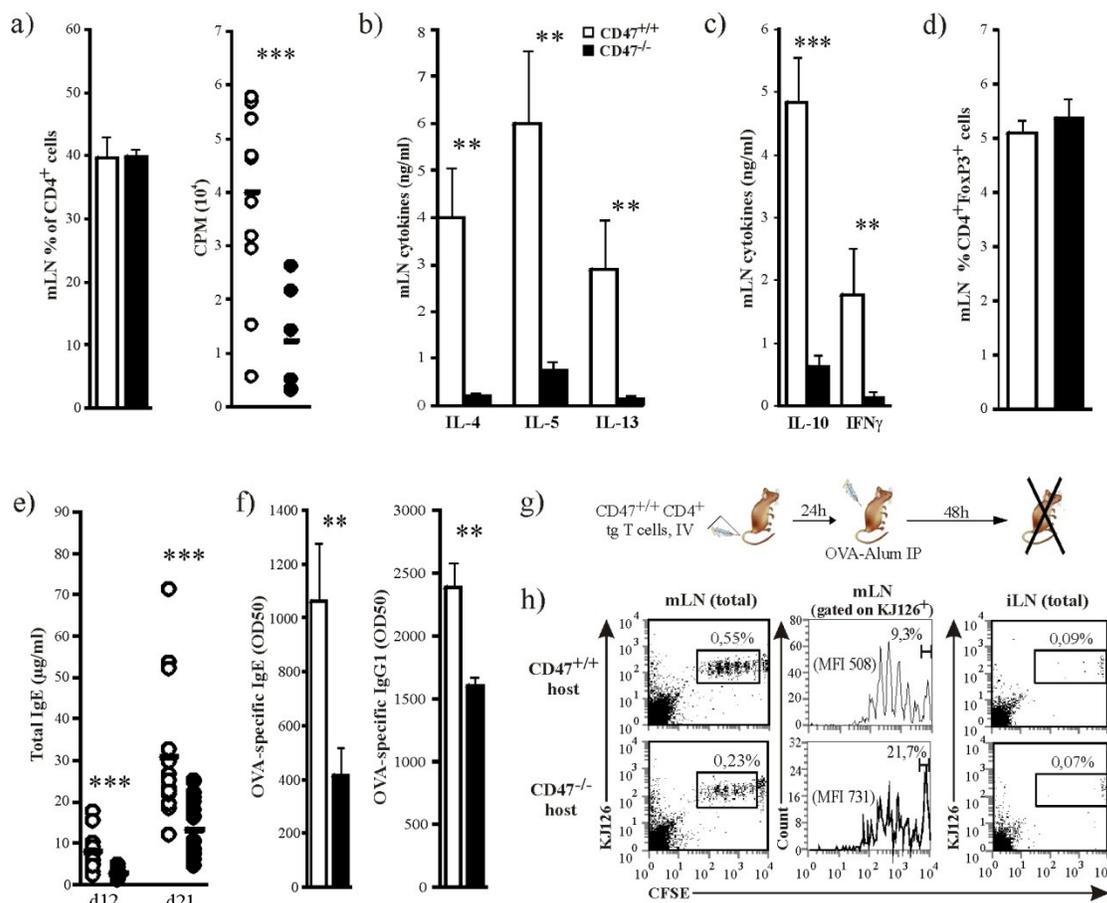


Figure 1.4 CD47 regulates airway SIRP- α DC-driven Th2 responses.

(a) Percentage of CD4⁺T cells in mLN. Proliferation and (b,c) cytokine release after OVA restimulation in vitro. (d) CD4⁺FoxP3⁺T cells. (e) Total and (f) OVA-specific Ig in sera (5 to 20 mice/group). (g,h) Following adoptive transfer and immunization, CFSE-labelled Tg cells were retraced in mLNs (divided (left), MFI and undivided cells (middle)) and iLNs (Mean of 5 to 7 mice/group).

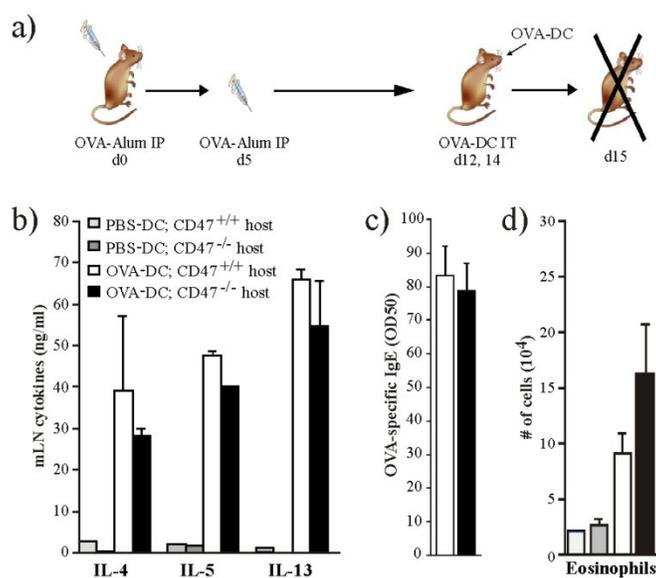


Figure 1.5 Local delivery of SIRP- α^+ CD47^{+/+} DCs elicits a strong Th2 response in CD47^{-/-} mice.

(a) Sensitized mice were instilled IT with OVA- or PBS-pulsed BMDCs. (b) IL-4, IL-5 and IL-13 production were measured in the supernatant of mLN cell cultures. (c) Serum levels of OVA-specific IgE and (d) number of eosinophils in the BALF. Mean \pm SEM (4 to 8 mice/group).

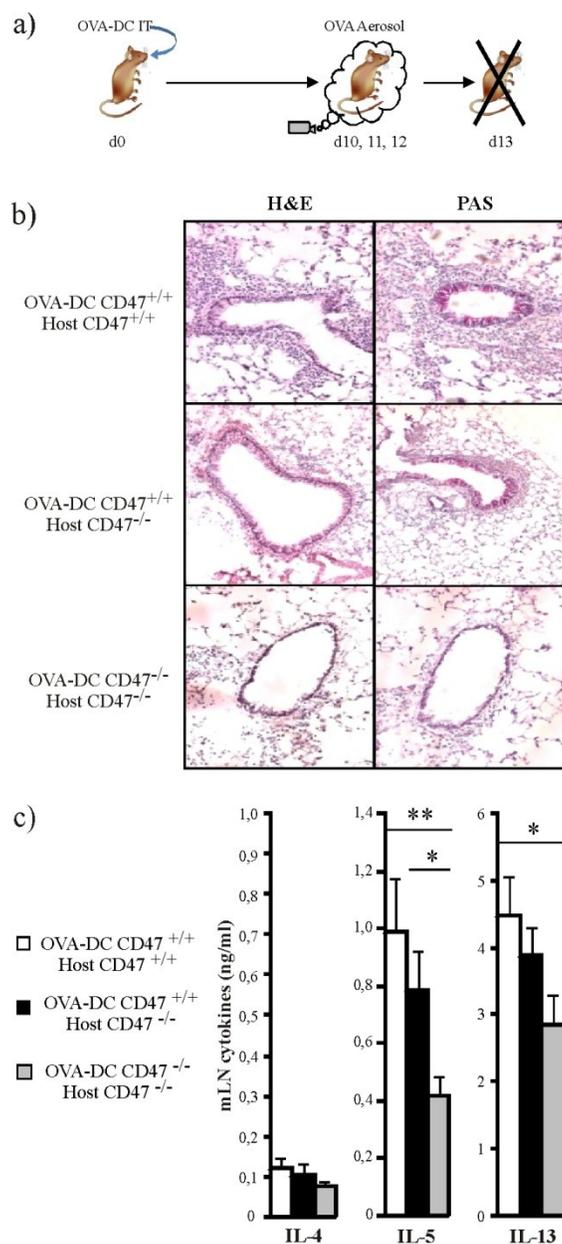


Figure 1.6 CD47 expression on SIRP- α DCs is required to promote Th2-mediated airway inflammation.

(a) OVA-pulsed BMDCs sensitized mice received 3 OVA-aerosol challenges. (b) Lung sections stained with H&E and PAS. One representative of 5 individually analyzed lungs. (c) IL-4, IL-5 and IL-13 levels in the supernatants of mLN cell cultures after *in vitro* restimulation with OVA. Mean \pm SEM (8 mice/group).

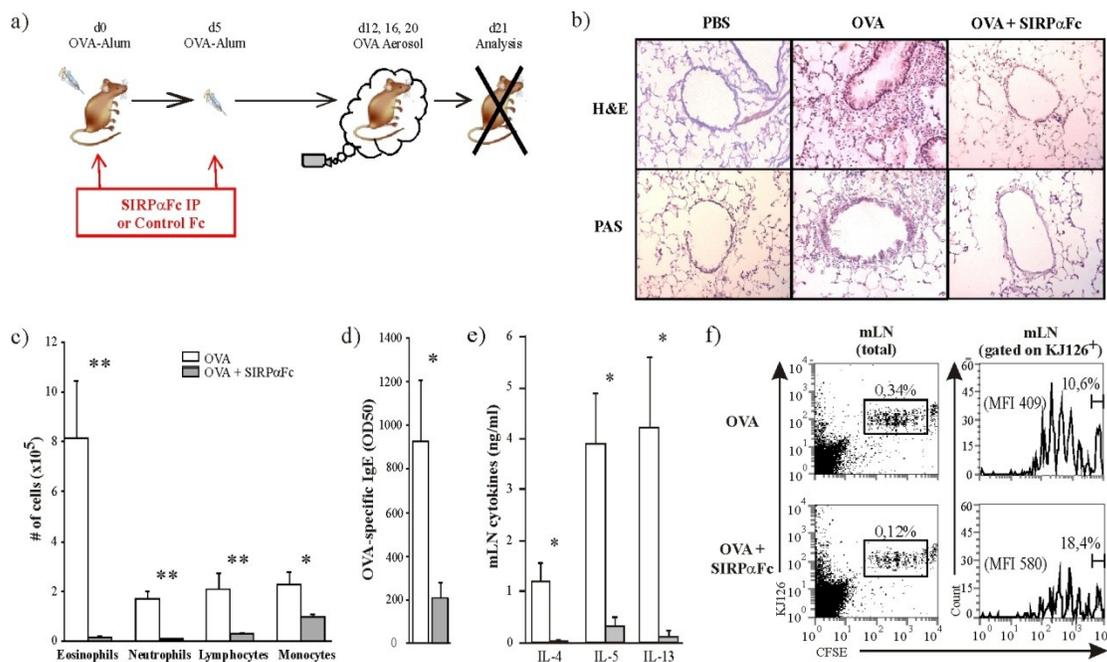


Figure 1.7 Targeting CD47 protects BALB/c mice from Th2-mediated airway allergic inflammation.

(a) Immunization and treatment procedure (b) Lung sections stained with H&E and PAS. (c) BALF cell numbers. (d) OVA-specific IgE in sera and (e) Th2 cytokine release in mLN culture (4 to 8 mice/group) (f) CFSE-labelled Tg cells retraced in mLNs following adoptive transfer and immunization with or without SIRPαFc treatment (Mean of 5 to 6 mice/group).

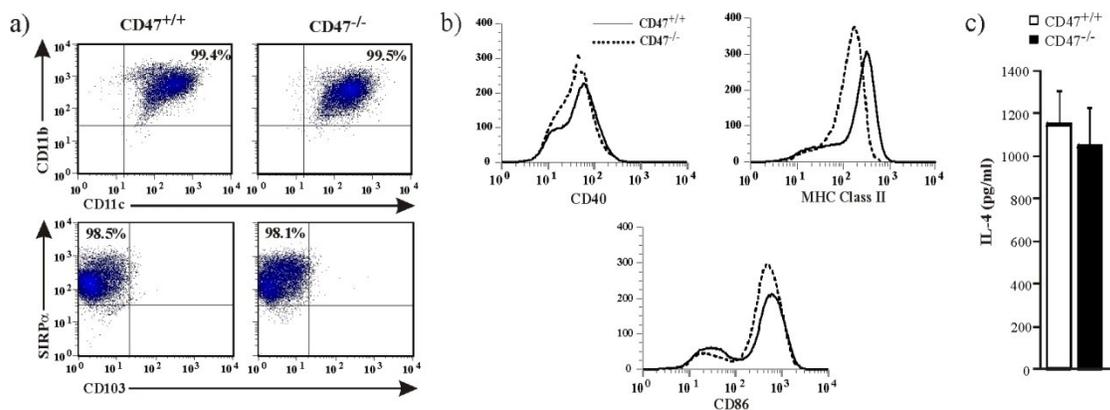


Figure 1.8 (Supplementary Fig 1) Phenotype and functional properties of BMDCs.

(a,b) Phenotype of OVA-pulsed CD47^{+/+} or CD47^{-/-} BMDCs. Shown is one representative experiment out of 3. (c) CD47^{+/+} or CD47^{-/-} BMDCs were cultured with Tg CD47^{-/-}CD4⁺T cells in the presence of OVA peptide under Th2 polarizing conditions (IL-4 and anti-IFN- γ) and IL-4 secretion was measured in the supernatant. Mean \pm SD of 3 independent experiments.

2.1.6 Discussion

Our present findings provide evidence that CD47 and SIRP- α are critically involved in the development of Th2-mediated chronic allergic inflammation. We show that SIRP- α is preferentially expressed on the lung CD11b^{high}CD103⁻ DC subset, whose accumulation in the draining mLN is governed by CD47. We further demonstrate that CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs promote pathogenic Th2 responses and airway disease. First, CD47-deficiency significantly inhibits CD103⁻SIRP- α ⁺ DC-driven Th2 responses and attenuates airway disease. Second, the local delivery of CD103⁻SIRP- α ⁺CD47^{+/+}DCs elicits strong Th2 responses and lung cellular infiltration in CD47-deficient mice, establishing causative links between CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs, perpetuation of Th2 responses and allergic disease. Finally, disruption of CD47 and SIRP- α interactions by SIRP-Fc administration at primary Ag sensitization protects BALB/c mice from Th2-mediated airway inflammation.

DCs have a pathophysiological role, beyond the sensitization phase, in the perpetuation of Th2-mediated airway inflammatory responses by restimulating resting central memory T cells and promoting the differentiation of a new wave of naïve T cells into effector T cells^{35,36}. We here propose that a divergence in tasks is operated by the CD103⁺SIRP- α ⁻ and CD103⁻SIRP- α ⁺ DC subpopulations. These two mDC subsets originate from distinct precursors and appear to maintain a stable phenotype with no conversion of CD103⁻ into CD103⁺ DC and vice versa³⁷. When the airways of sensitized mice are exposed to airborne allergens in the presence of Toll-like receptor agonists (i.e. OVA contaminated by low dose of LPS), CD103⁻ DCs are the major chemokine-producing cells recruited from the bloodstream into lung tissues²¹. Although both DC precursors are abundantly recruited to CD47^{-/-} inflamed lung tissues, our results point towards selective impeded egress of airway CD103⁻SIRP- α ⁺ DCs which, combined with impaired recruitment of inflammatory CD47^{-/-} DCs directly from the bloodstream, results in their decreased accumulation in the mLN. In fact, CD47 expressed on the DCs positively regulated CD103⁻SIRP- α ⁺ DC trafficking to mLN, although it did not significantly alter

the migration of CD103⁺ DCs and pDCs under steady state or inflammatory conditions. Through the expression of tight junction proteins, CD103⁺ DCs are equipped to extend their pseudopods into the bronchiolar luminal space to capture Ag²⁰ and it was recently established that lung CD11b^{low}CD103⁺ DCs display tolerogenic properties³⁸.

We here show, for the first time, that airway CD11b^{high}CD103⁻ DCs are positively identified by SIRP- α while expressing similar quantities of CD47 as CD103⁺ DCs. Notably, SIRP- α is expressed on CD8⁻ splenic, dermal and thymic DCs^{32, 39}. CD47 expression controls the mobilization of SIRP- α ⁺ cells, including neutrophils, epidermal DCs, dermal DCs, marginal zone splenic DCs^{31, 32, 40}. Of interest, SIRP- α is found on human alveolar macrophages, mast cells and basophils⁴¹. How CD47 expression on the SIRP- α ⁺ DCs precisely controls the *in vivo* transendothelial migration and whether it regulates other innate SIRP- α ⁺ cell trafficking and function remain to be clarified.

Th2 cytokines produced by effector T cells (i.e. IL-4 and IL-13), although dispensable to the initiation of airway hyperreactivity and recruitment of the first wave of innate cells to the lungs, are required and intimately linked to the induction of IgE and IgG1 antibody responses *in vivo*⁴². The primary and secondary Ag-specific type 2 humoral and cellular immune responses were significantly impaired in CD47-deficient mice and SIRP- α -Fc-treated mice. The altered Th2 responses does not reflect an intrinsic CD4⁺ T cell defect since local delivery of OVA-loaded SIRP- α ⁺CD47^{+/+} DCs elicit the release of large quantities of Th2 cytokines by CD47^{-/-} T cells *in vivo*. Also, the reduced OVA-specific IgE response could not be attributed to a B-cell intrinsic defect since *in vitro* IL-4-activated purified B cells isolated from CD47^{+/+} or CD47^{-/-} mice produced comparable amounts of IgG1 and IgE²⁹. While the total IgG response to corpusculate T cell-independent Ags was reduced in the C57BL/6 CD47^{-/-} mice³², IP or SC immunization with OVA in CFA induced type-1 biased cellular responses as well as enhanced Ag-specific IgG2 antibody production in BALB/c CD47^{-/-} mice²⁹. However, Ag-specific T cell IFN- δ production was reduced in the mLN of OVA/Alum immunized and challenged mutant or

SIRP- α Fc-treated mice. Considering that acute Th1 responses may aggravate Th2-dependent allergic pulmonary disease *in vivo*⁴³, the combined decreased Th2 and Th1 responses along with the unaltered proportion of Foxp3⁺ regulatory T cells conferred CD47^{-/-} or treated BALB/c mice a protection from airway inflammation.

Collectively, we here demonstrate for the first time that the manipulation of CD47/SIRP- α pathway inhibits CD103⁻SIRP- α ⁺DC-driven pathogenic Th2 responses and airway inflammation.

Acknowledgments: We thank Sylvie Dussault, Anna Daisy and Lisa-Marie Chevanel for technical assistance for histology.

2.1.7 References

1. Herrick CA, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:405-12.
2. Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, DeKruyff RH, et al. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 2001; 167:4668-75.
3. Wills-Karp M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:255-81.
4. Oettgen HC, Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:429-40.
5. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; 454:445-54.
6. Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:193-204.
7. van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, et al. In vivo depletion of lung CD11c⁺ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 2005; 201:981-91.
8. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Vos N, Hoogsteden HC, et al. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J Clin Invest* 2007; 117:464-72.
9. Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Muller T, Soullie T, et al. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 2006; 116:2935-44.
10. Czeloth N, Bernhardt G, Hofmann F, Genth H, Forster R. Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells. *J Immunol* 2005; 175:2960-7.
11. Lan YY, De Creus A, Colvin BL, Abe M, Brinkmann V, Coates PT, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 modulates dendritic cell trafficking in vivo. *Am J Transplant* 2005; 5:2649-59.
12. Sawicka E, Zuany-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A, Brinkmann V, Kemeny DM, et al. Inhibition of Th1- and Th2-mediated airway inflammation by the sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720. *J Immunol* 2003; 171:6206-14.
13. von Garnier C, Filgueira L, Wikstrom M, Smith M, Thomas JA, Strickland DH, et al. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 2005; 175:1609-18.
14. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007; 204:105-15.

15. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 2006; 7:652-62.
16. de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, et al. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004; 200:89-98.
17. Oriss TB, Ostroukhova M, Seguin-Devaux C, Dixon-McCarthy B, Stolz DB, Watkins SC, et al. Dynamics of dendritic cell phenotype and interactions with CD4⁺ T cells in airway inflammation and tolerance. *J Immunol* 2005; 174:854-63.
18. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Kremmer E, Forster R. CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Immunol* 2007; 178:6861-6.
19. Jakubzick C, Tacke F, Ginhoux F, Wagers AJ, van Rooijen N, Mack M, et al. Blood Monocyte Subsets Differentially Give Rise to CD103⁺ and CD103⁻ Pulmonary Dendritic Cell Populations. *J Immunol* 2008; 180:3019-27.
20. Sung SS, Fu SM, Rose CE, Jr., Gaskin F, Ju ST, Beaty SR. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 2006; 176:2161-72.
21. Beaty SR, Rose CE, Jr., Sung SS. Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 2007; 178:1882-95.
22. Hintzen G, Ohl L, del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Pabst O, Kocks JR, et al. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 2006; 177:7346-54.
23. Cook DN, Bottomly K. Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:234-9.
24. Hammad H, Lambrecht BN, Pochard P, Gosset P, Marquillies P, Tonnel AB, et al. 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; 169:1524-34.
25. Grinnan D, Sung SS, Dougherty JA, Knowles AR, Allen MB, Rose CE, 3rd, et al. Enhanced allergen-induced airway inflammation in paucity of lymph node T cell (plt) mutant mice. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118:1234-41.
26. Jakubzick C, Tacke F, Llodra J, van Rooijen N, Randolph GJ. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 2006; 176:3578-84.
27. Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001; 11:130-5.
28. Sarfati M, Fortin G, Raymond M, Susin S. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr Drug Targets* 2008; 9:842-50.

29. Bouguermouh S, Van VQ, Martel J, Gautier P, Rubio M, Sarfati M. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol* 2008; 180:8073-82.
30. Fukunaga A, Nagai H, Noguchi T, Okazawa H, Matozaki T, Yu X, et al. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J Immunol* 2004; 172:4091-9.
31. Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S, Gautier P, Rubio M, Levesque M, et al. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 2006; 25:5560-8.
32. Hagnerud S, Manna PP, Cella M, Stenberg A, Frazier WA, Colonna M, et al. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 2006; 176:5772-8.
33. van Rijt LS, Kuipers H, Vos N, Hijdra D, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *J Immunol Methods* 2004; 288:111-21.
34. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008; 205:869-82.
35. Kool M, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:701-10.
36. Hammad H, Lambrecht BN. Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol* 2007; 93:265-78.
37. del Rio ML, Rodriguez-Barbosa JI, Bolter J, Ballmaier M, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, et al. CX3CR1⁺ c-kit⁺ bone marrow cells give rise to CD103⁺ and CD103⁻ dendritic cells with distinct functional properties. *J Immunol* 2008; 181:6178-88.
38. Shao Z, Bharadwaj AS, McGee HS, Makinde TO, Agrawal DK. Fms-like tyrosine kinase 3 ligand increases a lung DC subset with regulatory properties in allergic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:917-24 e2.
39. Lahoud MH, Proietto AI, Gartlan KH, Kitsoulis S, Curtis J, Wettenhall J, et al. Signal regulatory protein molecules are differentially expressed by CD8⁻ dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177:372-82.
40. Parkos CA, Colgan SP, Liang TW, Nusrat A, Bacarra AE, Carnes DK, et al. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 1996; 132:437-50.
41. Florian S, Ghannadan M, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Hauswirth AW, Schernthaner GH, et al. Evaluation of normal and neoplastic human mast cells for expression of CD172a (SIRPalpha), CD47, and SHP-1. *J Leukoc Biol* 2005; 77:984-92.

42. Voehringer D, Reese TA, Huang X, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 2006; 203:1435-46.
43. Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol* 2004; 5:337-43.

2.2 Article II : Cibler SIRP α protège de l'inflammation pulmonaire allergique de type 2.

Marianne Raymond, Vu Quang Van, Manuel Rubio, Karl Welzenbach and Marika Sarfati

European journal of immunology, Octobre 2010; Manuscrit sous presse, DOI: 10.1002/eji.201040797

Contribution des auteurs

- Marianne Raymond : Conception de l'ensemble des expériences comprises dans ce manuscrit. Réalisation et analyse des expériences *in vivo* à l'exception de la figure 5c) et d). Contribution majeure à la rédaction du manuscrit.
- Vu Quang Van : Réalisation et analyse des résultats de la figure 5c) et d). Assistance technique et contribution intellectuelle pour l'analyse des expériences *in vivo*.
- Manuel Rubio : Contribution majeure à la conception, réalisation et analyse des expériences *in vitro*.
- Karl Welzenbach : Distribution de réactifs, contribution intellectuelle pour l'analyse des résultats et la révision du manuscrit.
- Marika Sarfati : Conception, supervision et analyse des résultats ainsi que rédaction du manuscrit.

Résumé

L'interaction entre le système immunitaire inné et adaptatif joue un rôle crucial dans l'établissement des désordres allergiques. CD47 et son ligand SIRP α contrôlent la migration cellulaire. Nous avons rapporté précédemment que l'administration de DCs SIRP α ⁺ CD47^{+/+} et non CD47^{-/-} induisent l'inflammation des voies respiratoires et une réponse Th2 chez les souris CD47^{-/-}, normalement résistantes. Nous démontrons dans cette étude que l'administration précoce de la molécule de fusion CD47-Fc inhibe l'accumulation des DCs SIRP α ⁺ dans les ganglions médiastinaux, le développement de la réponse Th2 systémique et locale, ainsi que l'inflammation des voies respiratoires chez les souris BLAB/c immunisées. Les études mécanistiques démontrent que la liaison de SIRP α par le CD47-Fc n'influence pas la capture et la présentation antigénique ainsi que l'activation et la fonction effectrice *in Vitro* des cellules Th2 transgéniques DO11.10 spécifiques à l'antigène. Toutefois, l'administration *in vivo* du CD47-Fc ou des DCs traitées au CD47-Fc inhibe la prolifération des cellules T transgéniques, mettant en évidence la contribution du défaut de migration des DCs dans l'altération de la réponse Th. En conclusion, nous proposons que l'axe CD47/SIRP α pourrait être exploité *in vivo* pour supprimer la migration des DCs SIRP α ⁺ pulmonaires vers les ganglions médiastinaux et par conséquent, la réponse Th2 et l'inflammation des voies respiratoires.

Targeting SIRP- α protects from type 2 -driven allergic airway inflammation.

Marianne Raymond¹, Vu Quang Van¹, Manuel Rubio¹, Karl Welzenbach² and Marika Sarfati¹

¹Immunoregulation Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Research Center CRCHUM, Montréal, Canada.

²Novartis Pharma AG, Autoimmunity, Transplantation and Inflammation, Basel, Switzerland

Key words: CD47, SIRP- α , dendritic cells, Th2, airway inflammation

Address for correspondence to Dr. Marika Sarfati, Immunoregulation, Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital Notre-Dame (Pavillon Mailloux, M4211K), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

Nonstandard abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; BMDC, bone marrow-derived dendritic cells; mLN, mediastinal lymph node; PAS, periodic acid-Schiff; SIRP α , signal regulatory protein alpha; i.t., intratracheal(ly).

2.2.1 Abstract

The interplay between innate and adaptive immune responses is essential for the establishment of allergic diseases. CD47 and its receptor, signal regulatory protein alpha (SIRP- α), govern innate cell trafficking. We previously reported that administration of CD47^{+/+} but not CD47^{-/-} SIRP- α ⁺ bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) induced airway inflammation and Th2 responses in otherwise resistant CD47-deficient mice. We here show that early administration of a CD47-Fc fusion molecule suppressed the accumulation of SIRP- α ⁺ DC in mediastinal lymph nodes (mLN), the development of systemic and local Th2 responses as well as airway inflammation in sensitized and challenged BALB/c mice. Mechanistic studies highlighted that SIRP- α ligation by CD47-Fc on BMDC did not impair Ag uptake, Ag presentation and Ag-specific DO11.10 Tg Th2 priming and effector function *in vitro*, whereas *in vivo* administration of CD47-Fc or CD47-Fc-pretreated BMDC inhibited Tg T cell proliferation, pinpointing that altered DC trafficking accounts for defective Th priming. We conclude that the CD47/SIRP- α axis may be harnessed *in vivo* to suppress airway SIRP- α ⁺ DC homing to mLN, Th2 responses and allergic airway inflammation.

2.2.2 Introduction

Allergic disorders result from aberrant Th2 responses to common environmental Ag [1]. Allergic asthma is characterized by increased IgE production and the accumulation of Th2 effector/memory cells in the bronchial tissues. Cytokine release by innate cells combined with the accumulation of Th2 cells in lung tissues, are largely responsible for the massive local recruitment of eosinophils, basophils and other precursors which ultimately promote airway hyper responsiveness (AHR) and mucus secretion [2-5].

DC are critical players in the initiation and maintenance of airway inflammation [6]. Three lung DC subsets have been identified in the conductive airways and the lung parenchyma with distinct functions [7]. The non-plasmacytoid SIRP- α^+ DC (CD11c^{high}CD11b⁺CD103⁻SIRP- α^+) induce Th2 polarization as well as the activation of Th2 effector cells, while the CD103⁺ DC (CD11c^{high} CD11b^{low}CD103⁺SIRP- α^-) and the plasmacytoid DC (CD11c^{low}CD11b⁻Gr-1⁺B220⁺120G8⁺, pDC) may promote tolerance [8-11]. Hence, when pDC are depleted, OVA-sensitized mice develop a severe asthma [12].

Initial triggering of allergic asthma appears to occur at the bronchial epithelial surface. Exposure of epithelial barrier to allergens with endogenous endotoxin or protease activity triggers a TLR4-dependent program that results in the activation of DC, basophils and mast cells releasing IL-4 and IL-13, which promote Th2-mediated airway inflammation [13]. Agents that pharmacologically manipulate DC precursors recruitment from bloodstream to lung tissues as well as DC migration from airways to mLN, impair the induction as well as the perpetuation of Th2 responses and successfully alleviate airway inflammatory responses [14]. For instance, sphingosine 1-phosphate receptor antagonist FTY720 alters migratory behavior of airway DC, inhibits DC/T stable interactions with naïve T cells and effector Th2 cells and suppresses airway disease development [15]. Indeed, the number and activation status of lung DC during secondary challenge appears essential for controlling allergic inflammation. In experimental model of asthma, allergen challenge results in the accumulation of CD11b⁺

DC in the lungs and the mLN [16]. CCR2 and not CCR6 are implicated in the attraction of immature Th2 cell-inducing DC to the lungs while CCR7 is involved in their egress en route to regional LN [17-19].

CD47 is expressed on all hematopoietic cells and serves as a counter-receptor for SIRP- α while SIRP- α expression is restricted to myeloid and neuronal cells [20]. We recently reported that airway SIRP- α^+ DC trafficking to mLN is critical for the development of Th2-mediated airway allergic inflammation, which are both impaired in CD47-deficient mice. CD47 expression on murine CD11b⁺ SIRP- α^+ DC positively governs cell trafficking [8, 21] whereas SIRP- α ligation by a CD47-Fc fusion molecule inhibits human DC migration *in vitro* [22]. We here demonstrate that *in vivo* administration of a CD47-Fc fusion molecule inhibited local and systemic Th2 responses and protected BALB/c mice from airway inflammation. We explored the mode of action of the CD47-Fc protective effect and showed that SIRP- α targeting by CD47-Fc did not interfere with Th2 priming and re-stimulation *in vitro* but impaired SIRP- α^+ DC accumulation in mLN and compromised Ag-specific CD4⁺T cell proliferation *in vivo*.

2.2.3 Materials and Methods

Mice

Female BALB/c and DO11.10 TCR transgenic (Tg) mice (6 to 8 weeks old) were purchased from Charles River and Jackson Laboratory, respectively and maintained under specific pathogen free conditions. All experiments were approved by the Ethics committee of CRCHUM and met the standards required by the Canadian Council on Animal Care.

A mouse model of asthma by systemic i.p. immunization

BALB/c mice were sensitized on days 0 and 5 by i.p. injection of 10 μ g OVA adsorbed to 1mg Imject Alum (Pierce) in the absence or presence of 100 μ g of murine CD47-Fc (a fusion protein constructed with murine CD47 extracellular domain plus a mutated human IgG1-Fc with low FcR binding activity) or control human CD47-Fc (Ctrl-Fc) molecules [21]. On days 12, 16 and 20, mice were challenged for 30 minutes with a 0.5% OVA aerosol (Sigma, Grade V). Mice were sacrificed 24 hours after the last challenge.

Serum Ig measurement

Serum was isolated from whole blood on day 21 and OVA-specific IgE levels were determined by ELISA technique.

Airway Histology

After BAL was performed, 1ml OCT compound was injected into the lungs through the lavage canula. Lungs were frozen in OCT compound and 5 μ m sections were prepared for H&E or PAS staining.

Preparation of BMDC and DC/T-cell cocultures

As previously reported [8], SIRP- α ⁺ BMDC were obtained from femur and tibia bone marrow cells suspension and cultured for 13 days in culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum and 20 ng/ml GM-CSF (PeproTech, USA). The medium was

refreshed every 3 days and cells were pulsed on day 12 with 100 µg/ml or 1 µg/ml ovalbumine (Grade V; Sigma). PBS-loaded-BMDC were used as negative control. OVA-loaded BMDC were co-cultured, in presence or absence of 10µg/ml of CD47-Fc or ctrl-Fc, either with purified naïve CD4⁺ Tg T cells (EasySep (StemCell)) under Th2 polarizing conditions (IL-4 (40ng/ml) and anti-IFN-γ (10µg/ml)) (primary culture) or with Th2-polarized cells (secondary culture). As a positive control, PBS-loaded BMDC were cocultured with T cells in presence of OVA peptide (0,4µg/ml, Peptides International). After 5 days, T cells were re-stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (5ng/ml) and ionomycin (500ng/ml) for 5 hours and stained for intracytoplasmic cytokine expression. For some experiments, BMDC were pre-treated with 10µg/ml of CD47-Fc or ctrl-Fc during the last 24 hours of culture with OVA protein and co-cultured with naïve CD4⁺ Tg T cells or Th2 polarized cells. All co-cultures were performed in 96 well plates in RPMI1640 (Wisent Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 500U/ml Penicillin, 500µg/ml Streptomycin, 10mM HEPES buffer and 1mM 2-ME.

Proliferation measurement

To assess T cell proliferation 1µCi 3[H] thymidine (Amersham Biosciences, UK) was added during the last 16 hours of a 4 days culture. Triplicate culture cells were harvested into glass fiber filters and the radioactivity was counted using liquid scintillation. Data are expressed as count per minute. In some experiments, CFSE-labeled naïve CD4⁺ Tg T cells were used for co-cultures and cell proliferation was detected by flow cytometry by monitoring CFSE dilution.

Adoptive transfer experiments

BALB/c mice were passively transferred with 2×10^6 CFSE-labeled-CD4⁺ Tg T cells one day prior immunization. Mice were immunized i.p. either with OVA/Alum together with CD47-Fc or ctrl-Fc or with 1×10^6 OVA-loaded BMDC pre-treated with CD47-Fc or ctrl-Fc. Two days after immunization, mLN and inguinal LN were collected and analyzed for CFSE cell dilution. Cells were stained with anti-clonotypic KJ126mAb (BD Biosciences) in

combination with anti-CD4 (BD Biosciences) to retrace CFSE-labeled CD4⁺ KJ126⁺ Tg T cells. Data were acquired with a FACSAriaII (BD Biosciences).

Flow cytometry

Total BAL cells were stained with anti-CCR3, anti-B220 (R&D systems) and anti-CD3 (clone 145-2C11) and analyzed by flow cytometry according to van Rijt et al [35] method, as shown in supplementary figure 1. For DC analysis, mLN were treated with Liberase at 0.4mg/ml (Roche) before staining. Autofluorescent alveolar macrophages were excluded from the analysis gates using an empty fluorescent channel. The following mAbs were used for cell phenotype analysis: Anti-CD4, anti-CD11b, anti-CD103, anti-SIRP- α , anti-I-Ad/I-Ed, anti-DO11.10 TCR, 120G8 (BD Biosciences), anti-CD11c and anti-B220 (R&D systems). Gating strategy to discriminate DCs subpopulations was defined as described in [8]. For intracellular staining, cells were fixed, permeabilized and stained with anti-IL-4, anti-IL-13 anti-IFN- γ and anti-Foxp3 (eBiosciences) after surface staining with anti-CD4. All the data were acquired on a FACSAria II (BD Biosciences).

Cytokine and chemokine measurement

Lungs were rinsed in PBS supplemented with antibiotics, cut into small pieces and cultured in flat-bottom 24 well plates for 24h in 1ml RPMI1640 (Wisent Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 500U/ml Penicillin, 500 μ g/ml Streptomycin, 10mM HEPES buffer and 1mM 2-ME. MLN cells (4×10^6 cells/ml) were cultured in flat-bottom 96 well plates and re-stimulated with OVA (100 μ g/ml) for 72h. IL-4, IL-5, IFN- γ (BD Biosciences), IL-13 and CCL11/eotaxin (R&D Systems) were measured by ELISA techniques in culture supernatants of lung explants and OVA-stimulated mLN.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using unpaired student's T test and the non-parametric Mann-Whitney U test. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

2.2.4 Results

CD47-Fc protects BALB/c mice from Th2-mediated airway inflammation.

We previously demonstrated that CD47-deficient mice are protected from allergic airway inflammation [8]. We here evaluated the impact of CD47-Fc fusion protein on the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice. Mice administered with CD47-Fc but not ctrl-Fc on days 0 and 5 of OVA immunization showed decreased mucus secretion by goblet cells (PAS staining) and very few inflammatory cells infiltrating lung tissues (H&E) when examined 24 hr after the last OVA aerosol challenge (day 21) (**Fig 1A**). CD47-Fc treatment reduced the total cell counts in the BALF as well as the numbers of eosinophils, neutrophils and lymphocytes analyzed by flow cytometry (**Fig 1B** and Suppl Fig 1). We next examined cytokine and chemokine expression in the culture supernatants of lung explants of CD47-Fc-treated mice and found that IL-5, IL-13 and eotaxin release was significantly decreased, whereas IL-4 expression remained unchanged (**Fig 1C and D**). We also found a reduction in the proportions of CD4⁺ T cells that infiltrated the lung tissues in CD47-Fc-treated mice (**Fig 1E**).

The reduction in airway inflammation occurred together with an inhibition of systemic and local Th2 responses (**Fig 2**). CD47-Fc administration resulted in a drop in serum OVA-specific IgE (**Fig 2A**) and inhibited IL-4 and IL-5 release by OVA-re-stimulated mLN cells (**Fig 2B**). The production of IL-13 as well as the proportion of CD4⁺ T cells secreting IL-13 was significantly suppressed in CD47-Fc-treated mice (**Fig 2B and C**), whereas the compound did not promote Th1 (IFN- γ) (**Fig 2D**) and Tr1 (IL-10) responses (not shown). The frequency of Foxp3⁺ regulatory T cells was comparable in untreated and CD47-Fc-treated mice (**Fig 2E**). These data indicate that the early *in vivo* administration of CD47-Fc prevents the late Th2-associated airway inflammation in sensitized and challenged BALB/c mice without deviating the immune response towards Th1 or inducing regulatory T cells.

Th2 cell priming and effector functions are not impaired by CD47-Fc in vitro.

We first explored *in vitro* the potential mechanisms behind the CD47-Fc inhibitory effect of the Th2-responses seen in sensitized and challenged BALB/c mice. DC drive Th2 cell differentiation and amplify Th2 responses. We thus postulated that CD47-Fc suppressed DC/ naïve CD4⁺ T cell priming and/or DC stimulation of a new round of division of circulating memory CD4⁺ T cells. To test this hypothesis, OVA-loaded SIRP- α ⁺ BMDC were co-cultured with purified naïve CD4⁺ Tg T cells under Th2 conditions in the presence of CD47-Fc or ctrl-Fc. BMDC were more than 98% CD11c⁺CD11b⁺CD103⁻SIRP- α ⁺ [8]. We found that CD47-Fc added to the primary culture did not prevent Ag-specific T cell proliferation as assessed by CFSE cell dilution (**Fig 3A**) and Th2 (IL-4 and IL-13) cell differentiation (**Fig 3B**). Polarized Th2 Tg T cells were next co-cultured with OVA-BMDC in the presence of CD47-Fc or ctrl-Fc. CD47-Fc added during the secondary culture did not modify Th2 cytokine expression (**Fig 3C**). These data suggest that the inhibition of Th2 responses induced by CD47-Fc *in vivo* is likely not attributed to the ability of CD47-Fc to alter DC/T interactions, Th2 polarization and Th2 cell effector function.

CD47-Fc treatment alters SIRP- α ⁺ DC migration in vivo.

Migration of airway SIRP- α ⁺ DC to the mLN is essential for the priming of naïve T cells and the initiation of Th2 responses [8]. We next examined how the early CD47-Fc administration affected the late accumulation of CD11c^{high} CD11b⁺ MHC class II^{high} DC (mDC) and pDC in the mLN of sensitized and challenged mice. We found a reduction in the mDC/pDC ratio (**Fig 4A**), which correlated with a selective decrease in the accumulation of SIRP- α ⁺ DC in the mLN of CD47-Fc-treated mice (**Fig 4B**). CD47-Fc treatment did not modify the proportion of pDC (data not shown). To support the hypothesis that altered DC trafficking to mLN is mechanistically linked to a reduced Th cell priming, BALB/c mice were passively transferred with CFSE-labeled CD4⁺ Tg T cells 1 day prior OVA-alum i.p. immunization together with CD47-Fc. CFSE cell dilution was examined in mLN after 2 days (**Fig 4C**). At this early time point, no T cell proliferation was observed in non-draining lymph nodes (i.e. inguinal LN) [23]. The administration of

CD47-Fc resulted in a decrease in the proportion of CFSE-labeled Tg T cells among CD4⁺ T cells without reducing the frequency of total CD4⁺ T cells in the mLN of OVA-immunized mice.

We next examined whether CD47-Fc delivers a signal to SIRP- α ⁺ DC to alter their functional properties, which include Th cell stimulatory capacity *in vitro* and *in vivo*. To this end, BMDC were loaded with OVA protein in the presence of CD47-Fc or Ctrl-Fc and then co-cultured with naïve CD4⁺Tg T cells or established Th2 cells (**Fig 5A and B**). Alternatively, OVA-loaded BMDC were administered i.p., in the absence of adjuvant, to BALB/c mice passively transferred with CFSE-labeled CD4⁺ Tg T cells and cell division was examined two days later (**Fig 5C and D**). Ligation of SIRP- α on BMDC did not preclude *in vitro* Ag uptake and presentation, Th2 priming and re-stimulation since CD47-Fc and Ctrl-Fc-pretreated OVA-BMDC induced similar Tg T cell proliferation (**Fig 5A**) and Th2 cytokine expression in primary and secondary cultures (**Fig 5B**). In contrast, we found a 4 to 5 fold reduction in the frequency and absolute numbers of proliferating Tg T cells in the mLN of mice that were injected with CD47-Fc-pre-treated OVA-BMDC when compared to mice administered with Ctrl-Fc-pre-treated OVA-BMDC (**Fig 5C and D**). The mLN cellularity was not significantly altered. Of note, CD47-Fc pretreatment did not affect BMDC cellular viability. CD47-Fc and Ctrl-Fc-pretreated OVA-BMDC expressed similar quantities of CD86, MHC Class II and CCR7 (data not shown). These data indicate that SIRP- α ligation on BMDC impairs, by a yet unknown mechanism, SIRP- α ⁺DC trafficking and thus Th priming in the mLN.

Taken all, these data suggest that the altered homing of SIRP- α ⁺ DC to mLN accounts for the defective Th2 cell priming, the altered recruitment of innate and effector T cells to lung tissues, which both contribute to the decreased local and systemic Th2 responses seen in CD47-Fc-treated mice.

2.2.5 Figures

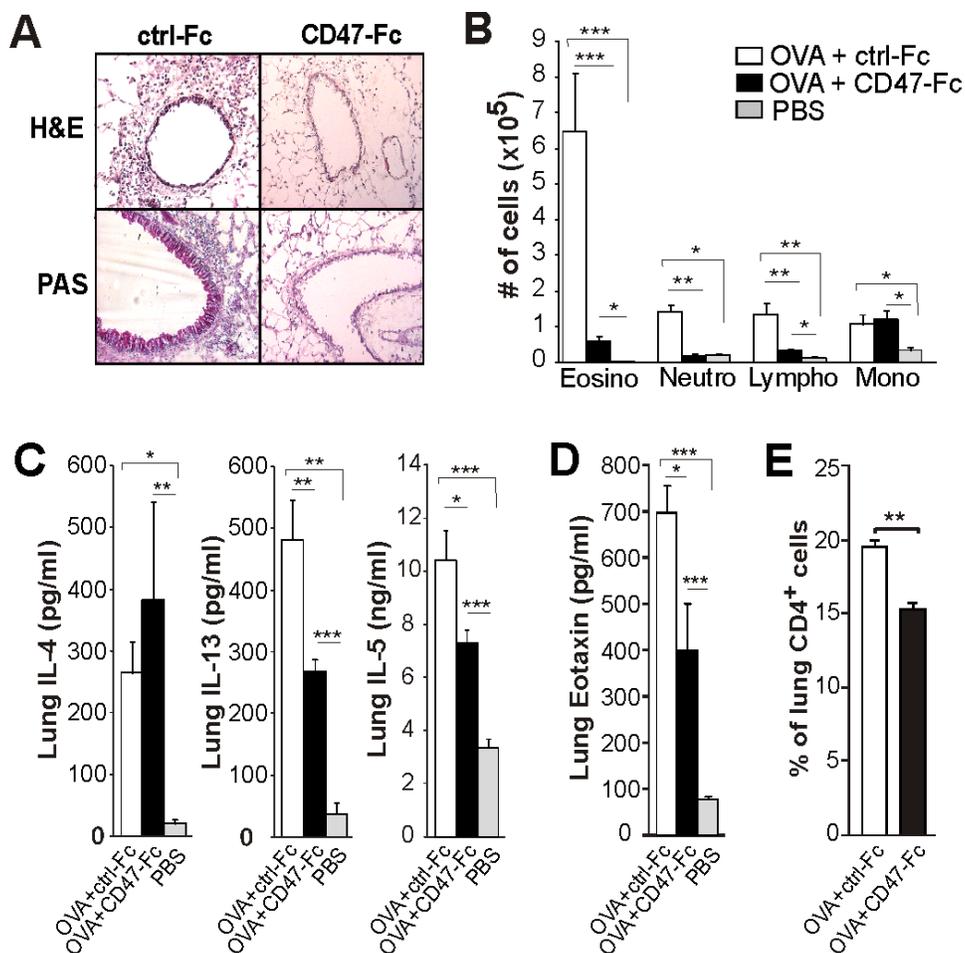


Figure 2.1 CD47-Fc delivered at priming inhibits airway inflammation.

BALB/c mice were injected i.p. on days 0 and 5 with PBS (Control, grey bars) or OVA/Alum in the presence of CD47-Fc (black bars) or ctrl-Fc (open bars). Mice were OVA-aerosol challenged on day 12, 16, 20 and sacrificed at day 21. (A) Lung sections stained with H&E and PAS (magnification 1 x). Data are one representative of 3 to 5 mice per group. (B) Differential BALF cell numbers. (C) IL-4, IL-5, IL-13 and (D) eotaxin release in lung explants. (E) Proportion of CD4⁺ T cells in lung tissues. Data show mean \pm SEM (n=4 to 8 mice per group) of 3 independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (U-test).

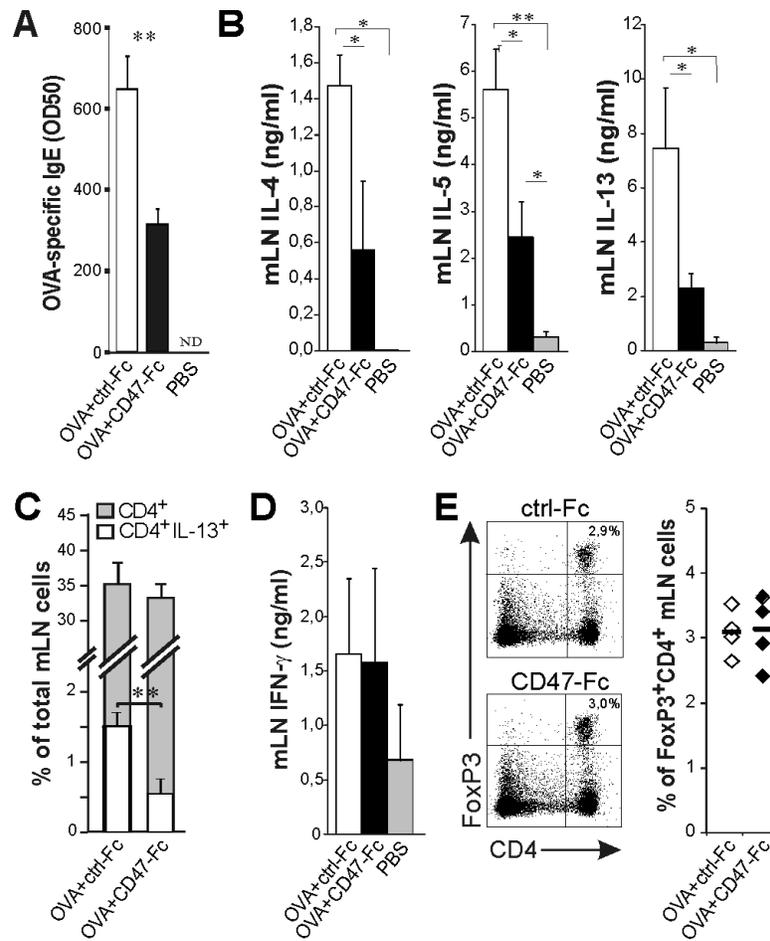


Figure 2.2 CD47-Fc delivered at priming suppresses late Th2 responses *in vivo*.

BALB/c mice were injected i.p. on days 0 and 5 with PBS or OVA/Alum in the presence of CD47-Fc or ctrl-Fc and OVA-aerosol challenged as in figure 1. (A) Serum level of OVA-specific IgE at day 21. (B) IL-4, IL-5 and IL-13 release in the supernatants of OVA-stimulated mLN cells. (C) Proportions of CD4⁺ T cells and IL-13-producing CD4⁺ T cells in mLN. (D) IFN- γ release in the supernatants of OVA-stimulated mLN cells. (E) Proportion of Foxp3⁺CD4⁺ T cells in total mLN. Data show mean \pm SEM (n=4 to 8 mice per group) of 3 independent experiments. ND; non detectable. *p<0.05, **p<0.01 (U-test)

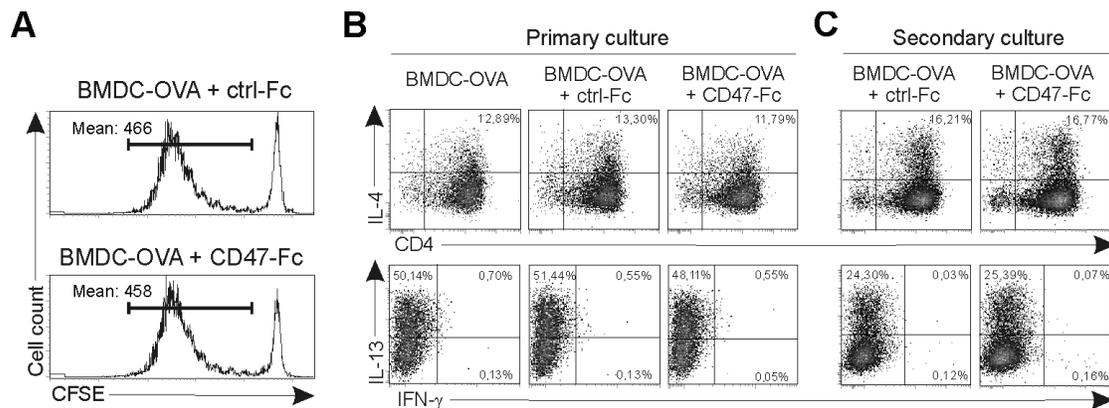


Figure 2.3 CD47-Fc does not impair Th2 priming and effector function *in vitro*.

(A-B) OVA-loaded BMDC were co-cultured with purified naïve CD4⁺KJ126⁺ T cells under Th2 polarizing conditions for 5 days in the absence or presence of CD47-Fc or ctrl-Fc (primary culture). (A) T cell proliferation measured by CFSE dilution. (B) IL-4, IL-13 and IFN- γ expression gated on CD4⁺ T cells after re-stimulation with PMA/ionomycin. (C) OVA-loaded BMDC were co-cultured with Th2 polarized cells for 5 days in absence or presence of CD47-Fc or ctrl-Fc (secondary culture). IL-4, IL-13 and IFN- γ expression after gating on CD4⁺ T cells. Dot plot are one representative of 3 independent experiments.

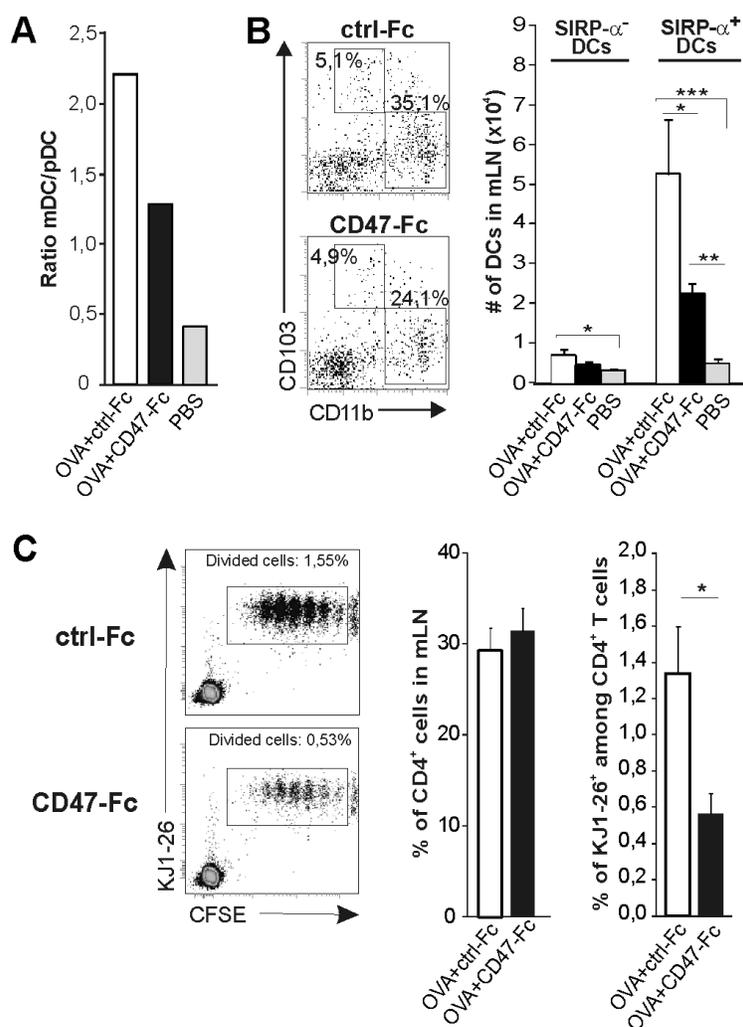


Figure 2.4 CD47-Fc alters SIRP α^+ DC migration to mLN and Th cell priming *in vivo*.

(A-B) BALB/c mice were injected i.p. on days 0 and 5 with PBS (grey bars) or OVA/Alum in the presence of CD47-Fc (black bars) or ctrl-Fc (open bars) and OVA-aerosol challenged as in figure 1. MLN were examined for (A) the proportion of CD11c^{high}I-A⁺ (mDC) and CD11c^{low}B220⁺120G8⁺ (pDC), expressed as mDC/pDC ratio. (B) Frequency and absolute numbers of DC subpopulations, gated on CD11c⁺ cells. Mean \pm SEM (n=4 to 6 mice per group) of 2 independent experiments. (C) BALB/c mice were passively transferred with CFSE-labeled CD4⁺Tg T cells a day prior i.p. OVA-alum immunization in the presence of CD47-Fc or ctrl-Fc. CFSE cell dilution was examined in mLN after 2 days (left panel). Frequency of CD4⁺ T cells and KJ126⁺ T cells among CD4⁺ T cells (middle and right panels). Mean \pm SEM (n= 9 to 11 mice per group) of 3 independent experiments. *p<0.05. **p<0.01, ***p<0.001 (B; U-test, C; t-test).

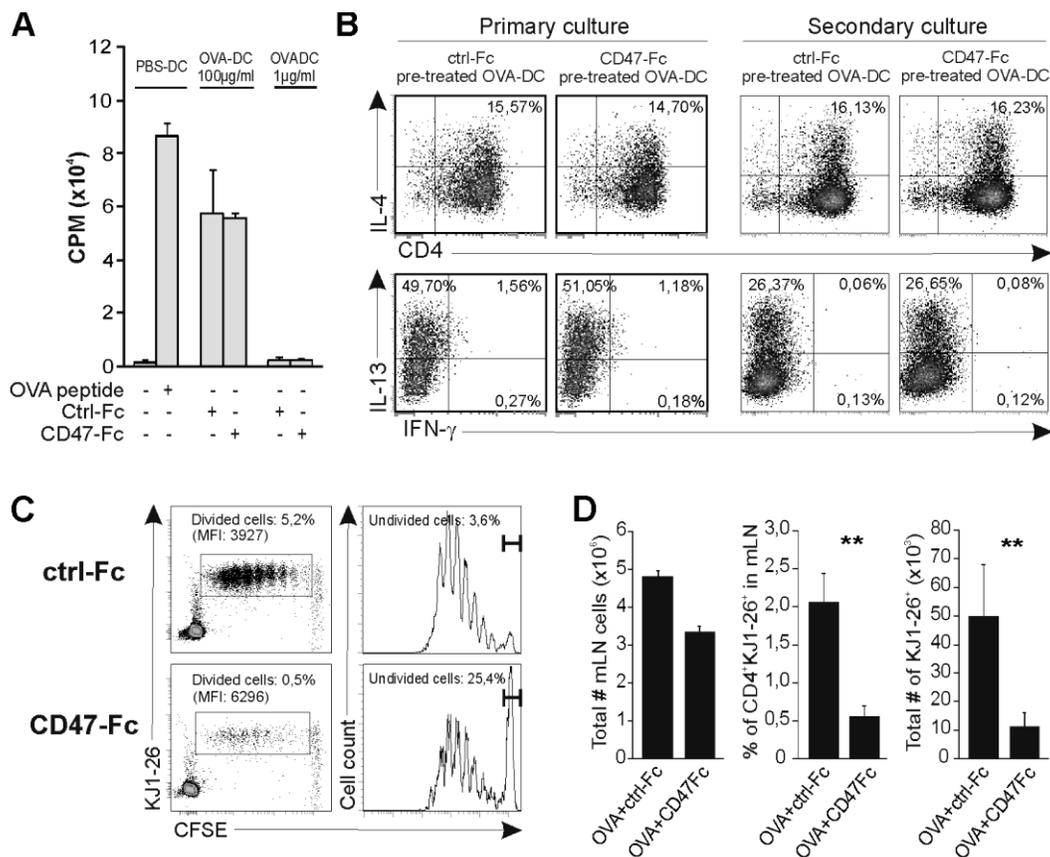


Figure 2.5 SIRP- α ligation on BMDC *in vitro* impairs Th cell priming *in vivo*.

(A-B) BMDC were loaded with 100µg/ml or 1µg/ml OVA and pre-treated with CD47-Fc or ctrl-Fc and co-cultured for 5 days with either purified naïve CD4⁺KJ126⁺ T cells under Th2 polarizing conditions (primary culture) or Th2 polarized cells (secondary culture). (A) Proliferation measured by thymidine incorporation (CPM; count per minute) at day 4. PBS-loaded BMDC alone were used as negative control and as positive control in the presence of OVA-peptide. Mean \pm SD of one representative out of 2 independent experiments (B) IL-4, IL-13 and IFN- γ expression gated on CD4⁺ T cells after PMA/iono restimulation. Dot plot are one representative of 3 independent experiments. (C-D) BALB/c mice were passively transferred with CFSE-labeled CD4⁺ TgT cells a day prior i.p. injection of CD47-Fc or Ctrl-Fc-pre-treated OVA-loaded BMDC. (C) CFSE cell dilution was examined in mLN after 2 days. (D) LN cellularity, frequency and absolute numbers of CD4⁺ KJ126⁺ T cells. Mean \pm SEM (n= 6 to 9 mice per group) of 3 independent experiments. **p<0.01 (t-test).

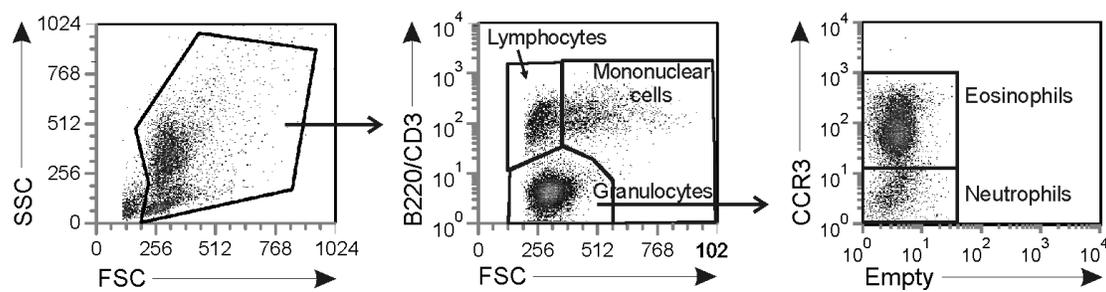


Figure 2.6 (Supplementary Figure 1) Differential cell count in BALF using flow cytometry.

BALF cells were stained with anti-CCR3, anti-B220 and anti-CD3 and analyzed by flow cytometry. After gating on live cells (left panel), granulocytes, lymphocytes and other mononuclear cells were detected using FSC and B220/CD3 staining (middle panel). After gating on granulocytes, eosinophils were distinguished from neutrophils by CCR3 expression (right panel). Shown is one representative of 3 independent experiments.

2.2.6 Discussion

Our current findings provide evidence that CD47 and SIRP- α are critically involved in the induction of type 2-mediated chronic allergic inflammation and that the CD47/SIRP- α axis can be harnessed by CD47-Fc to suppress Th2 responses. We demonstrate that the early CD47-Fc administration suppresses the late local and systemic Th2 responses and protects mice from developing airway inflammation. The following observations pinpoint towards an impairment of SIRP- α^+ DC recruitment to mLN as one mechanism implicated in the *in vivo* inhibition of Th priming and suppression of the Th2 responses seen in CD47-Fc treated mice. First, the reduction in Th2 cytokine expression is linked to a selective decrease in the accumulation of SIRP- α^+ DC in the mLN in sensitized and challenged CD47-Fc-treated mice. Second, *in vivo* Ag-specific Tg T cell proliferation is reduced in mice that have been injected i.p. with OVA-Alum together with CD47-Fc as well as in mice injected i.p. with CD47-Fc-pretreated BMDC. In contrast, CD47-Fc did not impair *in vitro* functional BMDC properties that include Ag presentation, DC/T interactions, Th2 polarization and Th2 effector function.

The current findings dovetail the concept that enhanced DC migration regulates LN vascular growth and Ag-specific T cell responses [24-26]. Hence, a two-fold decrease in the number of activated BMDC that were injected subcutaneously and migrated to the LN, results in up to fourfold decrease in the number of activated T cell blasts recovered from the draining LN [25]. Therefore, a two-fold reduction in SIRP- α^+ DC numbers seen in the mLN of CD47-Fc-treated mice (Fig 4B) may account for the defect in Th priming (Fig 4C) and Th2 responses (Fig 2).

The decrease in the accumulation of SIRP- α^+ CD103⁻ but not SIRP- α^- CD103⁺ DC in the mLN of CD47-Fc-treated mice extends on previous observations that the CD47/SIRP- α axis controls the mobilization of SIRP- α^+ myeloid cells, which is defective in CD47-deficient mice. CD47-mediated regulation of innate cell trafficking includes neutrophils, epidermal DC, dermal DC, marginal zone splenic DC, airway and intestinal pathogenic CD103⁻ SIRP- α^+ DC [8, 21, 27-29]. Nonetheless, the precise mechanisms whereby CD47/SIRP- α interactions regulate the function of innate SIRP- α^+ cells and/or

transendothelial trafficking remain to be further investigated. Since SIRP- α is expressed on myeloid DC and endothelial cells, a signal delivered to SIRP- α as well as CD47/SIRP- α blockade represent two non-mutually exclusive pathways to interfere with the development and maintenance of airway inflammation.

The combined results of our *in vitro* and *in vivo* studies concurred with the hypothesis that CD47-Fc diminishes airway DC trafficking without altering Ag-presenting function, which results in impaired Th2 priming. Recent reports demonstrated that basophils are early producers of IL-4 that migrate to mLN whereby they may trump DC in their Ag-presenting function and ability to initiate naïve T cell differentiation towards Th2 [30]. However, a cooperation between DC and basophils appears to be required to drive Th2 responses [31]. In our experimental model, we failed to detect basophils in mLN, either at an early time point after immunization (day 3, i.p. OVA/Alum) or in mice with established disease (day 21, immunized and challenged) in both untreated and CD47-Fc-treated mice.

Th2 cytokines (IL-4 and IL-13) produced by effector T cells are required and intimately linked to the induction of IgE and IgG1 antibody responses *in vivo* [32], while they are dispensable to the initiation of airway hyperreactivity and the recruitment of the first wave of innate cells to the lungs, This may underscore the decrease in systemic (OVA-specific IgE) and local Th2 responses seen in the mLN of CD47-Fc-treated and protected BALB/c mice. We also found that CD47-Fc treatment reduced IL-13 and eotaxin release in lungs, eosinophils and lymphocyte cell numbers in BALF and thus airway inflammation. In fact, IL-13/IL-13R α 1 interactions lead to eotaxin generation, increased airway resistance and mucus production, the key pathogenic components associated with asthma severity [33]. Furthermore, immediately after allergen challenge, eotaxin recruits eosinophils that attract Th2 effectors and promote their lung accumulation [34]. Collectively, we demonstrate that the manipulation of the CD47/SIRP- α pathway by CD47-Fc suppresses Th2 responses and airway inflammation at least by impairing the migration of pathogenic SIRP- α ⁺DC to the mLN. We propose that targeting the

CD47/SIRP- α axis may offer previously unknown therapeutic perspectives for allergic asthma.

Acknowledgments: We thank Sylvie Dussault, Lisa-Marie Chevanel and Anna Daisy for technical assistance for histology. This work was supported by the Canadian Institute for Health and Research (CIHR Grant, MOP-53152).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

2.2.7 References

- 1 Paul, W. E. and Zhu, J., How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 2010. 10: 225-235.
- 2 Herrick, C. A. and Bottomly, K., To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 405-412.
- 3 Walter, D. M., McIntire, J. J., Berry, G., McKenzie, A. N., Donaldson, D. D., DeKruyff, R. H. and Umetsu, D. T., Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 2001. 167: 4668-4675.
- 4 Wills-Karp, M., Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999. 17: 255-281.
- 5 Galli, S. J., Tsai, M. and Piliponsky, A. M., The development of allergic inflammation. *Nature* 2008. 454: 445-454.
- 6 Hammad, H. and Lambrecht, B. N., Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 2008. 8: 193-204.
- 7 von Garnier, C., Filgueira, L., Wikstrom, M., Smith, M., Thomas, J. A., Strickland, D. H., Holt, P. G. and Stumbles, P. A., Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 2005. 175: 1609-1618.
- 8 Raymond, M., Rubio, M., Fortin, G., Shalaby, K. H., Hammad, H., Lambrecht, B. N. and Sarfati, M., Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2009. 124: 1333-1342 e1331.
- 9 Ito, T., Yang, M., Wang, Y. H., Lande, R., Gregorio, J., Perng, O. A., Qin, X. F., Liu, Y. J. and Gilliet, M., Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 2007. 204: 105-115.
- 10 Medoff, B. D., Seung, E., Hong, S., Thomas, S. Y., Sandall, B. P., Duffield, J. S., Kuperman, D. A., Erle, D. J. and Luster, A. D., CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol* 2009. 182: 623-635.
- 11 del Rio, M. L., Rodriguez-Barbosa, J. I., Kremmer, E. and Forster, R., CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 2007. 178: 6861-6866.
- 12 de Heer, H. J., Hammad, H., Soullie, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M. A., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N., Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 2004. 200: 89-98.
- 13 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.
- 14 Hammad, H. and Lambrecht, B. N., Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol* 2007. 93: 265-278.

- 15 Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Muller, T., Soullie, T., Willart, M. A., Hijdra, D., Hoogsteden, H. C. and Lambrecht, B. N., Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 2006. 116: 2935-2944.
- 16 Jakubzick, C., Tacke, F., Llodra, J., van Rooijen, N. and Randolph, G. J., Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 2006. 176: 3578-3584.
- 17 Robays, L. J., Maes, T., Lebecque, S., Lira, S. A., Kuziel, W. A., Brusselle, G. G., Joos, G. F. and Vermaelen, K. V., Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J Immunol* 2007. 178: 5305-5311.
- 18 Weckmann, M., Collison, A., Simpson, J. L., Kopp, M. V., Wark, P. A., Smyth, M. J., Yagita, H., Matthaei, K. I., Hansbro, N., Whitehead, B., Gibson, P. G., Foster, P. S. and Mattes, J., Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med* 2007. 13: 1308-1315.
- 19 Hintzen, G., Ohl, L., del Rio, M. L., Rodriguez-Barbosa, J. I., Pabst, O., Kocks, J. R., Krege, J., Hardtke, S. and Forster, R., Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 2006. 177: 7346-7354.
- 20 Matozaki, T., Murata, Y., Okazawa, H. and Ohnishi, H., Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 2009. 19: 72-80.
- 21 Van, V. Q., Lesage, S., Bouguermouh, S., Gautier, P., Rubio, M., Levesque, M., Nguyen, S., Galibert, L. and Sarfati, M., Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 2006. 25: 5560-5568.
- 22 Braun, D., Galibert, L., Nakajima, T., Saito, H., Quang, V. V., Rubio, M. and Sarfati, M., Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals. *J Immunol* 2006. 177: 8550-8559.
- 23 Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M. A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H. and Lambrecht, B. N., Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 2008. 205: 869-882.
- 24 Soderberg, K. A., Payne, G. W., Sato, A., Medzhitov, R., Segal, S. S. and Iwasaki, A., Innate control of adaptive immunity via remodeling of lymph node feed arteriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. 102: 16315-16320.
- 25 MartIn-Fontecha, A., Sebastiani, S., Hopken, U. E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F., Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003. 198: 615-621.

- 26 Webster, B., Ekland, E. H., Agle, L. M., Chyou, S., Ruggieri, R. and Lu, T. T., Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. *J Exp Med* 2006. 203: 1903-1913.
- 27 Parkos, C. A., Colgan, S. P., Liang, T. W., Nusrat, A., Bacarra, A. E., Carnes, D. K. and Madara, J. L., CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 1996. 132: 437-450.
- 28 Hagnerud, S., Manna, P. P., Cella, M., Stenberg, A., Frazier, W. A., Colonna, M. and Oldenborg, P. A., Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 2006. 176: 5772-5778.
- 29 Fortin, G., Raymond, M., Van, V. Q., Rubio, M., Gautier, P., Sarfati, M. and Franchimont, D., A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *J Exp Med* 2009. 206: 1995-2011.
- 30 Sokol, C. L., Chu, N. Q., Yu, S., Nish, S. A., Laufer, T. M. and Medzhitov, R., Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 2009. 10: 713-720.
- 31 Tang, H., Cao, W., Kasturi, S. P., Ravindran, R., Nakaya, H. I., Kundu, K., Murthy, N., Kepler, T. B., Malissen, B. and Pulendran, B., The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat Immunol* 2010.
- 32 Voehringer, D., Reese, T. A., Huang, X., Shinkai, K. and Locksley, R. M., Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 2006. 203: 1435-1446.
- 33 Munitz, A., Brandt, E. B., Mingler, M., Finkelman, F. D. and Rothenberg, M. E., Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. 105: 7240-7245.
- 34 Jacobsen, E. A., Ochkur, S. I., Pero, R. S., Taranova, A. G., Protheroe, C. A., Colbert, D. C., Lee, N. A. and Lee, J. J., Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 2008. 205: 699-710.
- 35 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.

2.3 Article III : Reprogrammation *in vivo* des cellules Th17 en Th17/Th2 par les DC SIRP α dans les poumons en conditions inflammatoires

Marianne Raymond, Manuel Rubio, Vu Quang Van, and Marika Sarfati

Manuscrit en préparation.

Contribution des auteurs

- Marianne Raymond : Conception de l'ensemble des expériences comprises dans ce manuscrit. Réalisation et analyse des expériences *in vivo*. Contribution à la rédaction du manuscrit.
- Manuel Rubio : Contribution majeure à la conception, réalisation et analyse des expériences *in vitro*.
- Vu Quang Van : Assistance technique et contribution intellectuelle pour l'analyse des expériences.
- Marika Sarfati : Conception, supervision et analyse des résultats ainsi que rédaction du manuscrit.

Résumé

Les cellules dendritiques jouent un rôle crucial dans l'élaboration de la réponse immune adaptative. Des manipulations *in vitro* parviennent à reprogrammer les lignées de cellules Th2 et Th17 en cellules Th1, mettant en évidence la notion de la plasticité des différentes populations de cellules T effectrices CD4⁺. Jusqu'à présent, la conversion des cellules mémoires Th17 en cellules Th2 ou *vice et versa* n'a pas été mis en évidence dans les tissus. Nous démontrons que l'administration répétée de cellules dendritiques inflammatoires chargées d'antigènes (OVA-DC), injectées localement ou systémiquement, génère des cellules T CD4⁺IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺ antigène-spécifiques (Th17⁺Th2⁺) qui expriment GATA-3 dans les poumons et les ganglions drainants. L'administration de l'antigène par aérosol n'est pas nécessaire à l'induction de la réponse pulmonaire Th17⁺Th2⁺ suggérant que les signaux livrés à la barrière épithéliale ne sont pas obligatoires pour initier la réponse. Les souris immunisées développent une inflammation pulmonaire IgE-indépendante résistante au traitement avec des corticostéroïdes, caractérisée par une infiltration mixte de neutrophiles et d'éosinophiles dans le lavage bronchoalvéolaire. Les cellules dendritiques inflammatoires des poumons ont la capacité de reprogrammer les lignées de cellules Th17 en cellules qui expriment des cytokines Th2 et suffisent à induire un phénotype Th17⁺Th2⁺ *in vitro* à partir de cellules T CD4⁺ isolées des poumons de souris immunisées. Pour conclure, nous avons démontré l'existence *in vivo* de cellules Th17⁺Th2⁺ qui expriment GATA-3 dans les poumons inflammés. De plus, nous proposons que l'immunisation avec des cellules dendritiques inflammatoires, indépendamment de la voie d'immunisation, induit l'inflammation chronique des voies respiratoires associée à la réponse Th17⁺Th2⁺.

SIRP α DCs drive Th17 reprogramming into Th17/Th2 cells in lungs under inflammatory conditions

Marianne Raymond, Vu Quang Van, Manuel Rubio, and Marika Sarfati

Immunoregulation Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Research Center CRCHUM, Montréal, Canada.

Address correspondence to Dr. Marika Sarfati, Immunoregulation, Laboratory, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame (Pavillon Mailloux, M4211K), 1560 Sherbrooke Street East, Montreal, Quebec H2L 4M1, Canada.

2.3.1 Abstract

Dendritic cells (DCs) are crucial to orchestrate the adaptive immune response. Extensive *in vitro* manipulation reprograms Th2 and Th17 cell lines into Th1 cells, leading to the concept of CD4⁺Th cell subset plasticity. So far, memory Th17 cell conversion into Th2 or *vice versa* has not been evidenced in tissues. We here show that repetitive administration of Ag-loaded inflammatory DCs (OVA-DC), locally or systemically, elicits the development of Ag-specific IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺ CD4⁺ T cells (Th17⁺Th2⁺) that express GATA-3 in inflamed lungs and draining lymph nodes. An Ag aerosol challenge is dispensable to drive pulmonary Th17⁺Th2⁺ responses, suggesting that signals delivered to the epithelial barrier are not the obligatory primary events. The immunized mice develop an IgE-independent and steroid resistant airway inflammation with a mixed neutrophil and eosinophil infiltrates in the BALF. Lung inflammatory DCs reprogram Th17 cell lines to express Th2 cytokines and are sufficient to induce Th17⁺Th2⁺ phenotype in lung CD4⁺ T cells isolated from OVA-DC-immunized mice. In conclusion, we demonstrate the *in vivo* existence of Th17⁺Th2⁺ cells that express GATA-3 in inflamed tissues and further propose that repeated immunization with inflammatory DCs dominates over the route of DC administration to promote Th17⁺Th2⁺-associated chronic lung inflammation.

2.3.2 Introduction

Different CD4⁺ Th cells provide hosts with a variety of specific immune responses against infectious pathogens. Based on their functions and cytokine profile, terminally differentiated CD4⁺ Th cells are classified into distinct lineages, with Th1-Th2 paradigm dominating the field. Th17, Th2 and Th1 confer protection against fungi, extracellular and intracellular microbes, respectively (Zhu et al., 2010). Primary function of regulatory T cells is to ensure the immune system homeostasis (Feuerer et al., 2009).

The concept of functional plasticity of CD4⁺ Th cell subsets has recently emerged. (Bluestone et al., 2009; Zhou et al., 2009a) Regulatory T cells can convert into aggressive Th17, Th1 or Th2 cells (Wan and Flavell, 2007; Zhou et al., 2009b), Th17 into Th1 and not *vice versa* while a recent report demonstrated a conversion of Th2 into Th1 (Hegazy et al., 2010). Although the physiological consequences of this flexibility remain to be determined, it is interpreted as a mean to orchestrate adaptive immune responses to multiple and highly variable microbes. Because CD4⁺ Th subsets mediate immune pathology in addition to their beneficial roles to the hosts, the acquisition of the capacity to produce new cytokines may as well be viewed as a mechanism to regulate immunopathology. By producing IL-10, Th2 cells dampen the inflammatory response and minimize pathology (O'Garra and Vieira, 2007). In contrast, when converted into Th1, Th17 cells enhance immune response and aggravate immune-mediated disease (Lee et al., 2009).

Th2 cells and their cytokines IL-4, IL-5 and IL-13, are univocally implicated in allergic disorders that are characterized by intense eosinophil infiltrates, mucus secretion and airway remodeling. (Paul and Zhu, 2010) The presence of neutrophils in the airways of asthmatic patients is considered an indicator of severe and refractory asthma (Dolan et al., 2004). IL-17 level is positively correlated to neutrophilic airway inflammation and to disease gravity, suggesting a role for Th17 in severe neutrophilic human asthma (Alcorn

et al., 2010). Presence of IL-17 in sputum is also associated with airway hyperresponsiveness to methacholine challenge (Barczyk et al., 2003). In contrast, the functions of Th17 cells in Th2-mediated allergic airway inflammation have led to conflicting results in mice (Oboki et al., 2008). However, a growing number of evidences support their implication in steroid-resistant neutrophilic asthma. In OVA-specific TCR transgenic DO11.10 and OTII mice, OVA inhalation without prior sensitization induces neutrophilic inflammation and Th17 cells without Th2 cell recruitment and increased serum IgE levels (Nakae et al., 2007). A neutrophil-dominant mouse model of asthma induced by T cell transfer also points towards a role for IL-17 in disease severity. Transfer of *in vitro* polarized Th17 cells into BALB/c mice followed by aerosol challenge induces airway neutrophilia, enhanced chemokine secretion and AHR after OVA inhalation and mice exhibit resistance to corticosteroid treatments (McKinley et al., 2008).

Airway epithelial cells and DCs are primarily involved in the initiation of Th response through a direct interaction with inhaled antigens. Activated DCs mature and migrate to the mLN, where they present Ag to naive T cells, and in presence of IL-4 or IL-6, DCs promote the differentiation into Th2 or Th17 cells, respectively (Krishnamoorthy et al., 2008; Lambrecht and Hammad, 2009). Among the different DC subsets present in lungs, myeloid CD103-SIRP α + DCs have been identified as the primary immunogenic DC that drives pathogenic Th2 airway inflammation (Raymond et al., 2009). In the present study, we examined temporal development of Th2 and Th17 responses in the airways and draining lymph nodes and showed that repetitive injection of inflammatory DCs, locally or systemically, induced severe airway inflammation that correlated with the development of Th cells that produce IL-17, IL-4 and IL-13 and express GATA-3 in lung tissues. Our *in vitro* studies also suggest that Th17 cells, and not Th2, are reprogrammed into Th17+Th2+ cells.

2.3.3 Materials and Methods

Mice

Female BALB/c mice were purchased from Charles River and BALB/c DO11.10 TCR and CD45.1 Tg mice were purchased from Jackson Laboratory. 6 to 8 weeks old female mice were used and maintained under specific pathogen free conditions. All the experimental protocols were approved by the Ethic Committee of CRCHUM and the Canadian Council on Animal Care.

Mouse model of airway inflammation

BALB/c mice were sensitized IT or IV injection with 1×10^6 PBS or OVA (10 μ g/ml, Sigma, Grade V)-pulsed BMDCs. In some experiments, BMDCs were pulsed with OVA-endograde (10 μ g/ml, Profos AG) or LPS (500pg/ml, Sigma). Mice were challenged at day 12 and 15 with the respective DC used for immunization and sacrificed 1 or 3 days after the last DC injection. BALF was collected 4 times with 0.5ml physiologic saline and lung and mLN were isolated.

Migration assays

OVA-DCs (2×10^6) were labeled with CFSE and injected IV into naive mice. 48 hours later, CFSE⁺ CD11c⁺ classII⁺ DCs were retraced in iLN, mLN and lungs.

Airway Histology

After BALF was performed, OCT compound was injected into the lungs through the lavage canula. Lungs were frozen in OCT compound and 5 μ m sections were prepared for H&E and PAS staining and examined by light microscopy.

Preparation of BMDCs

BM cell suspensions were obtained from femurs and tibias of BALB/c or BALB/c CD45.1 mice and cultured in culture medium supplemented with 5% fetal bovine serum and

20ng/ml GM-CSF (PeproTech) for 13 days. The medium was refreshed every 3 days. BMDCs were pulsed with 100µg/ml LPS-low OVA (Sigma, Grade V) on day 12 of the culture.

Cytokine and Ig measurements

For lung explants, lungs were cut into small pieces and cultured for 24h in culture medium (RMI1640 (Wisent Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 500U/ml Penicillin, 500µg/ml Streptomycin, 10mM HEPES buffer and 1mM 2-ME). MLN cells (4×10^6 cells/ml) were cultured with OVA (100µ/ml) for 72h in culture medium. IL-4, IL-5 (BD Biosciences), IL-6, IL-13, IL-17, IL-25, CCL11/eotaxin and (R&D Systems) were measured in mLN and lung culture supernatants by ELISA. Total IgE production was quantified in serum by ELISA.

Flow cytometry analysis

Total BAL cells were stained with anti-CCR3 (R&D systems), anti-CD3 (clone 145-2C11) and anti-B220 (R&D systems), as described in *Van rijt L.S. et al.* (van Rijt et al., 2004). Cytokine expression in CD4⁺T cells was measured by intracytoplasmic staining after re-stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (5ng/ml) and ionomycin (500ng/ml) in the presence of brefeldin (10µg/ml) for the last 5 hours. Cells were first stained for extracellular markers (anti-CD4, BD Biosciences), fixed, permeabilized, and stained with the following intracellular markers: IL-13, IL-17, IL-4, IFN γ (Biolegend) and/or GATA3 (eBioscience). All data were acquired on a FACS Aria (BD Biosciences).

Sorting

In some experiments lung DCs were FACS sorted and co-cultured with lung T cells. Lungs were treated with liberase (0.4mg/ml, Roche) and lung cell suspensions were treated with NH₄Cl for red blood cell lysis before staining with the following antibodies: anti-CD4 (BD), anti-CD45.1, anti-CD45.2 (Biolegend), anti-CD11c (BD Biosciences), anti-CD11b

(Caltag), anti-SIRP α and anti-I-Ad/I-Ed (BD Biosciences). Small non granular CD4⁺ cells and CD11c^{high}CD11b^{high}SIRP α ^{high} were sorted as T cells and DC, respectively.

Cocultures

For co-cultures, OVA-loaded BMDCs (OVA-DC) or T-cell depleted splenocytes (OVA-APC) were cultured with purified naïve CD4⁺Tg T cells (EasySep, StemCell) under Th2 (IL-4 and anti-IFN- γ) or Th17 (IL-6, TGF- β , LPS and IL-23) polarizing conditions. After 5-7 days, effector T cells were restimulated with OVA-DCs or OVA-APC for another 3-4 days. For some experiments, sorted CD45.1 (injected) and CD45.2 (host) DCs were co-cultured with either Th2 or Th17-polarized cells or FACS-sorted lung CD4⁺T cells in the presence or the absence of OVA peptide (2 μ g/ml). For mechanistic studies, OVA-DCs were co-cultured with Th17 polarized cells with or without one of the following molecules: CTLA4-Fc (20 μ g/ml, Abatacept, Oncia) or control-Fc (20 μ g/ml), anti-CD40L (10 μ g/ml) or control hamster IgG (10 μ g/ml), anti-CD30L (10 μ g/ml) and anti-OX40L (10 μ g/ml) or control rat IgG2b (10 μ g/ml) (eBioscience). All co-cultures were performed at a 1/25 DC/T cells ratio in 96 well plates in RPMI1640 (Wisent Inc.) supplemented with 10% fetal bovine serum, 500U/ml Penicillin, 500 μ g/ml Streptomycin, 10mM HEPES buffer and 1mM 2-ME.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using unpaired student's T test and the non-parametric Mann-Whitney U test. ***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05.

2.3.4 Results

Local or systemic repetitive immunization with DCs induces IgE-independent Ag-specific Th17 responses.

Lung myeloid dendritic cells are sufficient to drive Th2 and Th17 responses, which are both implicated in the pathogenesis of allergic disorders (Lambrecht and Hammad, 2009; Oboki et al., 2008). We here first investigated the impact of repetitive administration of pathogenic SIRP α^+ DCs via the intra-tracheal (IT) route on the development of Th17 and Th2 responses. BALB/c mice were sensitized with unpulsed (PBS-DC) or OVA-loaded BMDC (OVA-DC). The mice were challenged on day 12 and 15 with the respective DCs used for immunization and sacrificed on day 16 (**Fig 1**). Lung sections revealed an important peribronchial accumulation of inflammatory cells, goblet hyperplasia and abundant mucus production (**Fig 1a**). The cellular infiltrate was characterized by eosinophils, neutrophils and lymphocytes (**Fig 1b**) and the quantity or the composition of recruited inflammatory cells in BALF was not modified by local steroid administration (**supplemental Fig 1a and b**). In several models of experimental asthma, steroid-resistant airway inflammation has been associated with IgE-independent Th17-mediated airway responses (Alcorn et al., 2010). We found that serum IgE levels were similar in naïve and DC-immunized mice (**Fig 1c**). OVA-DC induced an Ag-specific IL-17 production in mLN cells (**Fig 1d**) as well as in lung tissues (**Fig 1e**) and the Th17 responses were not decreased in steroid treated-immunized mice (**supplemental Fig 1c**). Mice sensitized and challenged with PBS-DC or OVA-DC expressed similar quantities of IL-4 and IL-13 in mLNs and lungs, suggesting that repetitive injection of DCs promoted Ag-independent Th2 responses (**Fig 1d and e**). Lung eotaxin and IL-6 release also occurred in the absence of Ag (**Fig 1e**), which may reflect cellular damage provoked by the passage of DCs through the airway epithelium barrier. Epithelial cells represent an important source of IL-25 (Wang et al., 2007b). However, IL-25 expression was not detected in lung tissues (**Fig 1e**), which may be taken as one indication of the absence of epithelial cell activation in response to repetitive DC immunization.

We therefore examined the profile of Ag-specific response following repetitive systemic injection of DCs in the absence of adjuvant (**Fig 2**). The IV route allowed DCs to be trapped in the lungs and next recruited as early as on day 2 to draining LNs (**supplemental Fig 2**). At the same time, the systemic route prevents any epithelial damage, a primary event that may drive pulmonary Th2 or Th17 responses (Schleimer et al., 2007). Repetitive IV immunization with OVA-DC induced the recruitment of neutrophils and lymphocytes in BALF with no significant increase in eosinophils or serum IgE levels when compared to PBS-DC-immunized and challenged mice (**Fig 2b and c**). Peribronchial and perivascular lung cellular infiltration was observed, albeit at a lower intensity when compared to mice immunized with DCs through the IT route (**Fig 2a**). We noticed that mice sensitized and challenged with OVA-DC by the IV and IT route displayed similar quantities of Ag-specific IL-17 production by mLN cells and lung cells (~5 to 10 ng/ml). As for IT immunization, the Th2 response appeared to be Ag-independent since repetitive administration of PBS-DC IV was sufficient to trigger IL-4, IL-13 and eotaxin release (**Fig 2d and e**).

Therefore, independently of the route of immunization, OVA-DC drive an IgE-independent Ag-specific Th17 response associated with a mixed neutrophilic/eosinophilic airway inflammation. These data strongly suggest that epithelial cell damage following exposure to Ag is not necessarily the obligatory primary event to initiate a local Ag-specific Th17 response and airway inflammation.

Local or systemic DC administration induces the differentiation of CD4⁺T cells that produce IL-17 and IL-13 *in vivo*.

Although innate $\gamma\delta$ T cells and NKT cells are early IL-17 producers, CD4⁺ Th cells represent a major source of IL-17 (Mills, 2008). We thus performed intracellular staining in CD4⁺ T cells isolated from mLNs of mice immunized and challenged twice with DCs to ascertain their expression of IL17 and IL-13 (**Fig 3**). We found that OVA-DC immunization

(IT or IV) not only increased the frequency of CD4⁺T cells that produced IL-17 but also induced a substantial proportion of IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells (**Fig 3a**). We observed a 4 to 5 fold increase in the numbers of double positive cells in the OVA-restimulated mLN cells, in response to IT or IV immunization with OVA-DC when compared to PBS-DC (**Fig 3b**).

Kinetic assays to determine temporal windows of neutrophil, eosinophil and lymphocytes emigration to BALF in relation to the numbers of DC injection and the appearance of double IL-17⁺IL-13⁺T cells in the mLNs were performed (**Fig 4**). OVA-DC were injected IT (**Fig 4a**) or IV (**Fig 4b**). Mice were scored clinically with 0 (absent), 1 (mild) or 2 (severe) based on chills, hunched posture, lethargy, and piloerection, which largely reflected the acute systemic reaction in response to OVA-DC administration. The recruitment of neutrophils in BALF one day consecutive to each DC injection correlated with the clinical score. In fact, two injections of OVA-DC, 12 days apart, were required to trigger a massive burst of neutrophils. At this time point, IL-17 was already detected in mLNs, lungs and BALF (**supplemental Fig 3**) but not yet in CD4⁺T cells, suggesting that an alternate source of IL-17 accounted for the acute neutrophil recruitment to the BALF. The numbers of neutrophils declined (IT) or remained quasi stable (IV) when mice were to rest for 3 days, while eosinophilia rose progressively from day 13 (one day after DC challenge) to the day of sacrifice (3 days after the last DC injection). These observations delineated a switch in the composition of the BALF infiltrate from neutrophils (day 13) to mixed neutrophils/eosinophils (day 18). The increase in lymphocytes counts in BALF correlated with the induction of double IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺ T cells in the mLNs (at day 15), and was not linked to neutrophilia. Notably, a single injection of DC without OVA nebulization triggered low neutrophil recruitment to BALF but was not sufficient to prime Th responses in the mLNs that required at least one DC challenge to occur. However, a resting period of three days was required and sufficient to drive airway inflammation and a mixed Th17/Th2 response since double positive IL-17/IL-13-secreting CD4⁺T cells were not detected before day 15.

Taken together, repeated immunization with OVA-DC, independently of the immunization route, promotes a temporal change in the composition of BALF cellular infiltrate (from neutrophilia to mixed neutrophilia/eosinophilia/lymphocytes) and in the quality of the Th responses (from single to double IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺ T cells) which correlates with airway inflammation, but not neutrophilic burst.

Inflammatory DCs and TCR stimulation are required to drive pulmonary Ag-specific Th17⁺Th2⁺ responses *in vivo*.

We next asked whether the cellular infiltrate in BALF as well as the lung inflammation and the mixed Th17/Th2 responses could be initiated by protein Ag in the absence of infection. To this end, mice were sensitized and challenged IV with PBS-DC, OVA-DC, BMDC loaded with endotoxin-free OVA (OVA-endo DC) or BMDC treated with low dose LPS in the absence of Ag (LPS-DC) (**Fig 5**). Amount of LPS in the commercial preparation of OVA was estimated at 0.5ng/ml (**supplemental figure 4**). We observed little or no cellular infiltration in the BALF of mice immunized with OVA-endo DC or PBD-DC while administration of LPS-DC and OVA-DC induced a similar recruitment of inflammatory cells (**Fig 5a**). IL-17 production and induction of double IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells were essentially observed in mLN cells of mice immunized with OVA-DC (**Fig 5b and c**). By contrast, mice injected with OVA-endo DC, PBS-DC or LPS-DC failed to mount an Ag-specific Th17 response (**Fig 5b**). Th2 profile was similar in the 4 groups of DC-immunized mice. These data underline the dissociation between Th17 responses and cellular infiltration in BALF, suggesting that molecules other than IL-17, such as for instance CXCL5 or CXCL-1, may be responsible for the attraction of neutrophils to the airways in response to LPS (Wilson et al., 2009b). These findings indicate that inflammatory OVA-DCs and TCR stimulation are required to drive pulmonary Ag-specific Th17+Th2+ responses.

IL-17⁺ CD4⁺T cells that produce IL-13 and IL-4 are generated *in vitro* from established Th17 but not Th2 cells.

The functional plasticity of murine Th17 and Th2 effector cells and their capacity to produce IFN- γ has been reported *in vitro* and *in vivo* (Zhu and Paul, 2010). Because the induction of IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells required repetitive administration of OVA-DC *in vivo*, we wanted to determine whether priming and re-stimulation with OVA-loaded APC would also reprogrammed establish cell lines *in vitro*. (Fig 6a). To this end, naïve DO11.10 (OVA-specific TCR transgenic) Tg T cells were differentiated under Th2 or Th17 polarizing conditions and Th2 or Th17 cells were restimulated with OVA-APC. Double IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells were exclusively detected in polarized Th17 cells, independently of the quality of the APC used for primary and secondary stimulation. Additionally, IL-17⁺IL-13⁺T cells expressed IL-4, pointing towards the plasticity of *in vitro*-generated Th17 cells and their ability to acquire a Th2 phenotype (Fig 6b). We next examined whether the co-stimulatory molecules that are critical for Th2 differentiation and/or activation were implicated in the generation of IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺ CD4⁺T cells. The proportion of IL-17⁺IL-13⁺ and IL-17⁺IL-4⁺ CD4⁺T cells was not modified by the addition of CTLA4-Ig fusion protein, neutralizing anti-CD40-L, anti-CD30-L or anti-OX40-L mAbs to the Th17/OVA-DC co-cultures (Fig 6c and d). Since Th17 can acquire a Th2 profile and not the opposite, we propose that such a process was occurring *in vivo* in our experimental model.

Triple IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺CD4⁺T cells that express GATA-3 are found in the lung tissues of mice locally or systemically immunized with inflammatory DCs.

Our present findings indicated that IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells were present in the mLN of mice repetitively immunized with OVA-DC. So far, no data reported on the existence of such double positive cells in tissues. We here demonstrated the presence of IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells in lung of mice that were immunized/challenged with OVA-DC (Fig 7a). After 3 days of rest, the double positive cells were increased in proportion in the airways when compared to the frequency seen in mLN (Fig 3a). We found that more than 40% of the IL-17⁺IL-13⁺ CD4⁺T cells coexpressed IL-4, demonstrating the existence of triple IL-

IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺CD4⁺ T (Th17⁺Th2⁺) cells in lung tissues. The expression pattern of the Th2 transcription factor GATA-3 correlated with that of IL-4 expression, since over 30% of single IL-13⁺ or double IL-17⁺IL-13⁺ pulmonary effector CD4⁺T cells expressed GATA-3 (**Fig 7b**). In fact, the great majority of IL-17⁺ T cells coexpressed IL-13 in the IL-4⁺GATA-3⁺ T cell subpopulation and more than 90 % of IL-4⁺ T cells coexpressed IL-13 in IL-17⁺GATA-3⁺ cells (**Fig 7c**). In contrast, no IFN- γ was detected in IL-17⁺ IL13⁺ GATA-3⁺ T cells (**supplemental Fig 6**). We therefore demonstrated the existence of Th17⁺Th2⁺ cells that expressed GATA-3 in *ex vivo* isolated lung tissues of repeatedly immunized mice.

Airway inflammatory DCs convert lung effector T cells into Th17⁺Th2⁺ cells that express GATA-3.

We next investigated the cellular mechanisms that govern the induction of triple IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺ T cells in lung tissues. We asked whether pulmonary DCs isolated from repetitively immunized mice could provide help *in vitro* to induce IL-13 expression in established Th17 cells. To this end, OVA-DC were generated from congenic CD45.1 mice and used to sensitize and challenge CD45.2 hosts. Donor (CD45.1) and host (CD45.2) CD11c^{high}CD11b^{high}SIRP α ^{high} airway DCs were purified one day following OVA-DC challenge and co-cultured with established Th17 or Th2 cell lines (**Fig 8a**). Donor and recipient airway DCs, as well as *in vitro*-generated donor OVA-DC, reprogrammed Th17 cells, but not Th2, into IL-17⁺IL-13⁺Th cells. We next examined whether host airway DCs were sufficient or required to convert effector lung CD4⁺T cells into Th17⁺Th2⁺ cells. CD4⁺T cells were isolated from the lungs of CD45.2 hosts that have been sensitized and challenged IV with CD45.1 OVA-DC and examined for IL-17 and IL-13 expression. As observed in mLN on day 13 (**Fig 4b**), almost no double IL-17⁺IL-13⁺ positive cells were detected in *ex-vivo* isolated lung effector CD4⁺T cells at day 1 consecutive to the OVA-DC challenge and those CD4⁺ T cells maintained their phenotype when co-cultured in the absence of DCs (**Fig 8b**). Co-cultures of lung effector T cells with *in vitro*-generated OVA-DC or purified host airway DCs promoted the generation of double IL-17⁺IL-13⁺CD4⁺T cells that expressed IL-4 and GATA-3 (**Fig 8b after culture and supplemental figure 6**).

We noticed that the addition of OVA was not required for inflammatory host DCs to drive Th17⁺Th2⁺ responses.

Altogether, these data demonstrate the presence of Th17⁺Th2⁺ cells that express GATA-3 in inflamed lung tissues of mice that have been repeatedly immunized with Ag-loaded DCs through a local or systemic route. Our findings further indicate that host-derived inflammatory airway DCs are sufficient to convert lung effector Th cells into Th17⁺Th2⁺ cells.

2.3.5 Figures

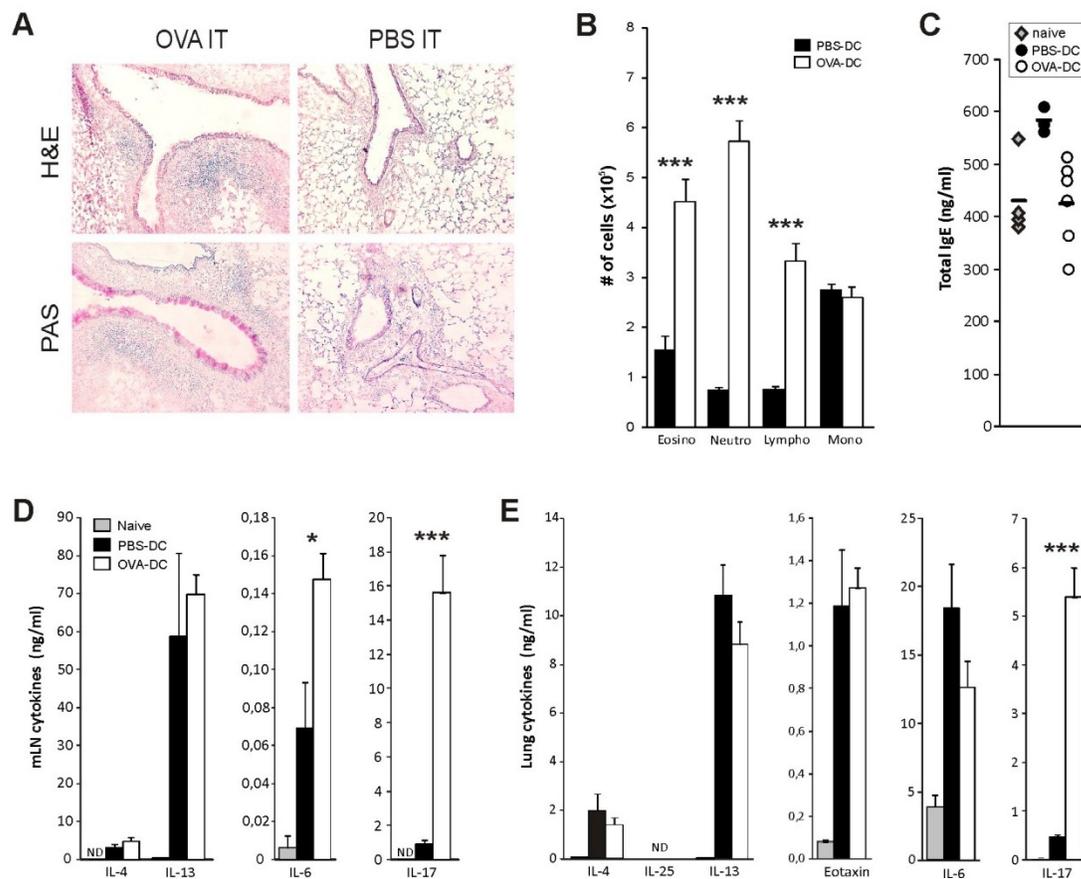


Figure 3.1 Repetitive local administration of OVA-DC induces an IgE-independent Ag-specific Th17 response.

Mice were left untreated (naïve) or primed and challenged twice (on day 0, 12 and 15) IT with PBS- or OVA-DC and sacrificed 24 hours after the last DC injection. A) Lung sections stained with H&E and PAS. B) Differential cell count in BALF shows eosinophils (eosino), neutrophils (neutro), lymphocytes (lympho) and other mononuclear cells (mono). C) Total IgE level in serum. Cytokine release by D) mLN cells after OVA re-stimulation *in vitro* and E) lung explants. Data are mean \pm SEM of 4 to 8 mice per group. *** $P < .001$ * $P < .05$.

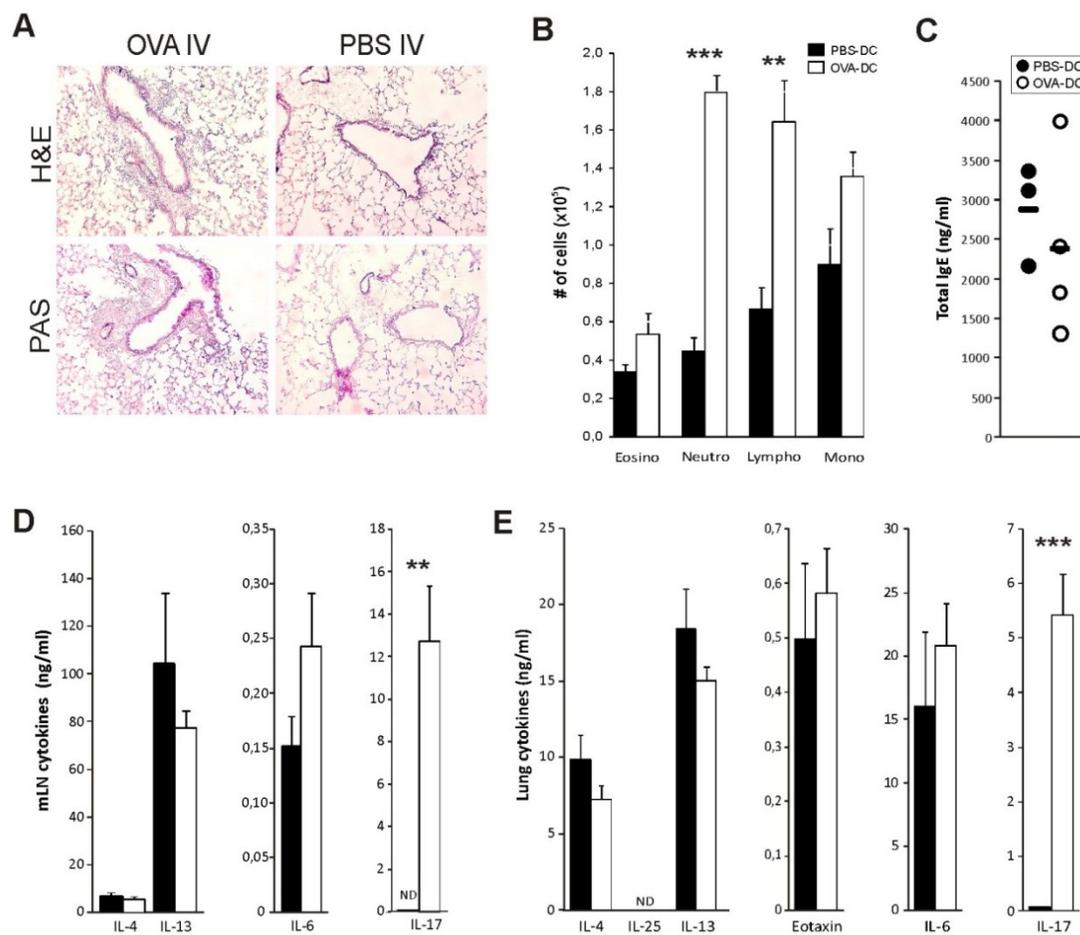


Figure 3.2 Systemic injection of OVA-DC induces Ag-specific Th17-associated airway inflammation.

Mice were primed and challenged twice (on day 0, 12 and 15) IV with PBS- or OVA-DC and sacrificed 24 hours after the last DC injection. A) Lung sections stained with H&E and PAS. B) Differential cell count in BALF shows eosinophils (eosino), neutrophils (neutro), lymphocytes (lympho) and other mononuclear cells (mono). C) Total IgE level in serum. Cytokine release by D) mLN cells after OVA re-stimulation *in vitro* and E) lung explants. Data are mean \pm SEM of 4 to 7 mice per group. *** $P < .001$ ** $P < .01$

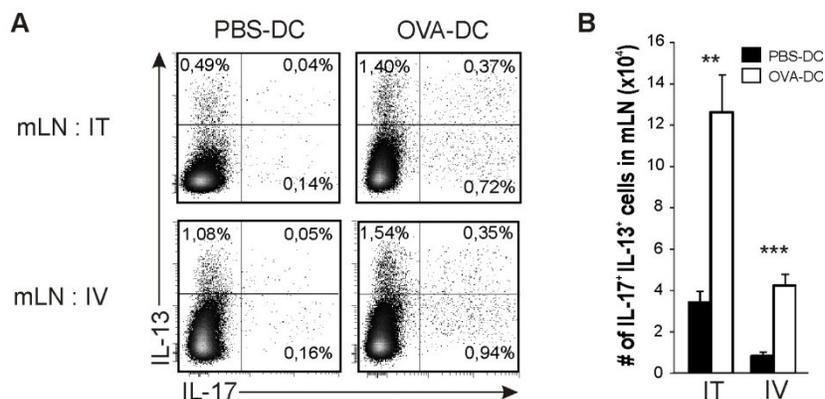


Figure 3.3 Local and systemic administration of OVA-DC induces double IL-17⁺IL-13⁺ producing T cells in mLNs.

Mice were primed and challenged twice (on day 0, 12 and 15) IT or IV with PBS- or OVA-DC and sacrificed 24 hours after the last DC injection. A) IL-17 and IL-13 expression of CD4⁺T cells in mLNs. B) Absolute number of double IL-17⁺IL-13⁺-producing CD4⁺ T cells in mLNs. Dot plot (panel A) shows one representative of three independent experiments (6 or 7 mice per group) that are pooled for panel B. *** $P < .001$ ** $P < .01$

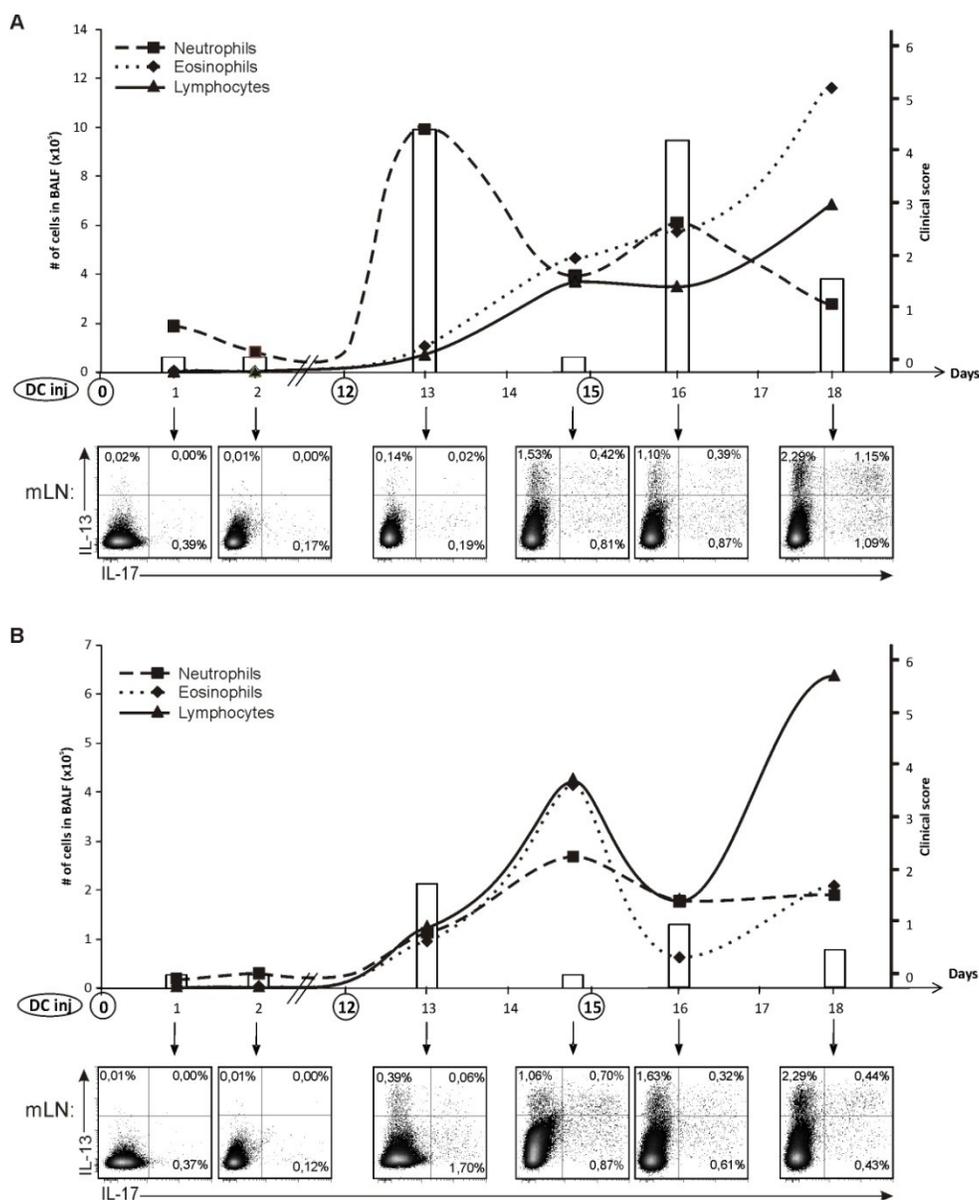


Figure 3.4 Temporal windows of airway inflammation and induction of IL-17⁺IL-13⁺ CD4⁺ T cells in mLN of mice repeatedly immunized with DCs.

Mice were injected with OVA-DC A) IT or B) IV at day 0, 12 and 15 (circle numbers on timeline). BALF analysis (related dot, left axis), clinical score (white bars, right axis) and IL-17/IL-13 expression in mLN (dot plot, gated on CD4⁺T cells) are analyzed at different time points. Data represent mean of 3 to 8 mice per group in at least two independent experiments. Dot plot are one representative of at least 3 mice per group.

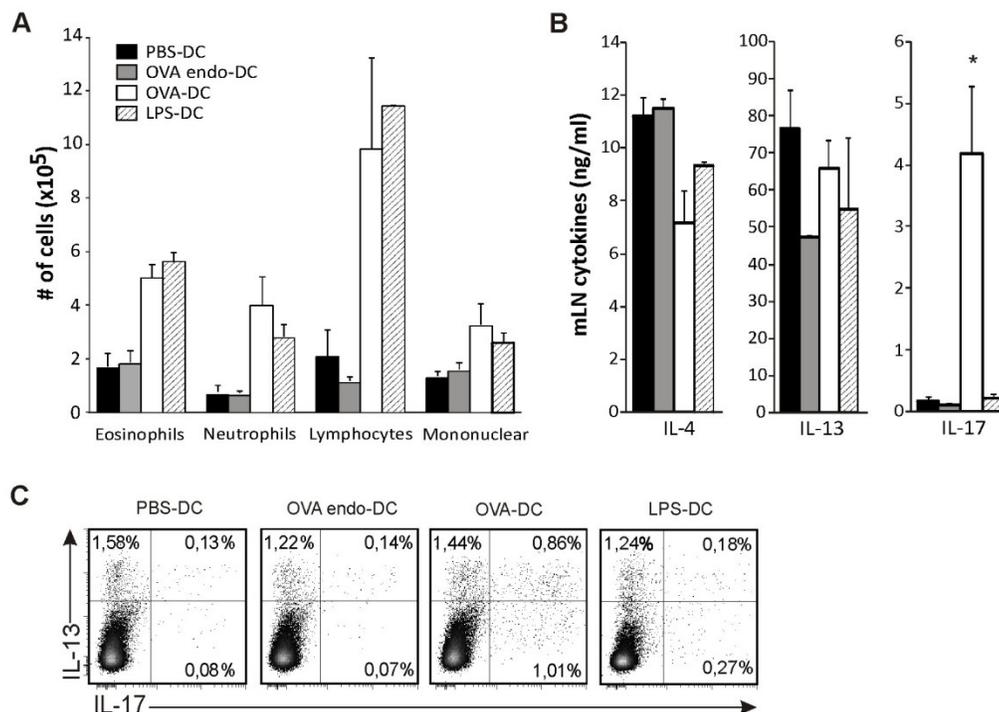


Figure 3.5 Inflammatory DCs and TCR stimulation are necessary to initiate Th17 responses.

Mice were sensitized IV at day 0 and 12 with PBS-DC, OVA-DC, endotoxin-free OVA-DC (OVA endo-DC) or low dose LPS-DC. Mice were sacrificed on day 15. A) Differential cell count in BALF. B) Cytokine release in mLN after OVA restimulation *in vitro*. Data are mean \pm SEM of 3 to 5 mice per group. C) IL-17/IL-13 expression in CD4⁺T cells. Dot plot are one representative of at least 3 mice per group. * $P < .05$.

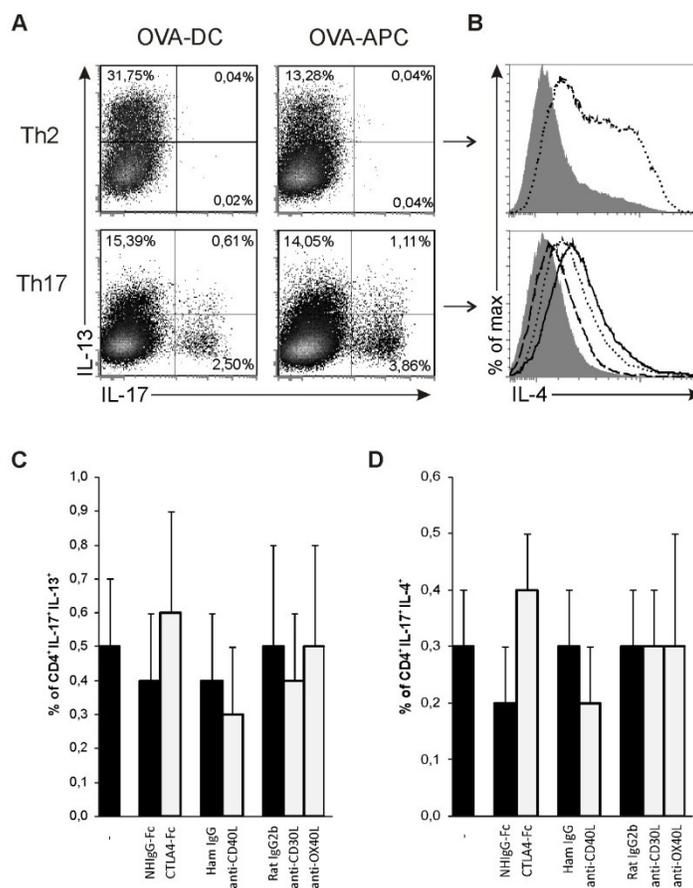


Figure 3.6 *In vitro* conversion of Th17 but not Th2 polarized T cells into Th17⁺Th2⁺ cells.

A) Naïve Tg CD4⁺ T cells were polarized *in vitro* into Th2 (upper panel) or Th17 (lower panel). Th cells were re-stimulated with OVA-DC (left panel) or OVA-APC (right panel) and examined for IL-13 and IL-17 expression. B) IL-4 expression in IL-17⁻IL-13⁻ (grey filled histogram), IL-17⁺IL-13⁻ (dash line), IL-17⁻IL-13⁺ (dot line) and IL-17⁺IL-13⁺ (full line) Th cells. Data are one representative of 2 independent experiments. C and D) OVA-DC were co-cultured with Th17 cells in the absence or presence of Ctrl-Fc, CTLA4-Fc, anti-CD40L, anti-CD30L, anti-OX40L and isotype-matched control mAbs. Data are mean ± SEM of 4 independent experiments.

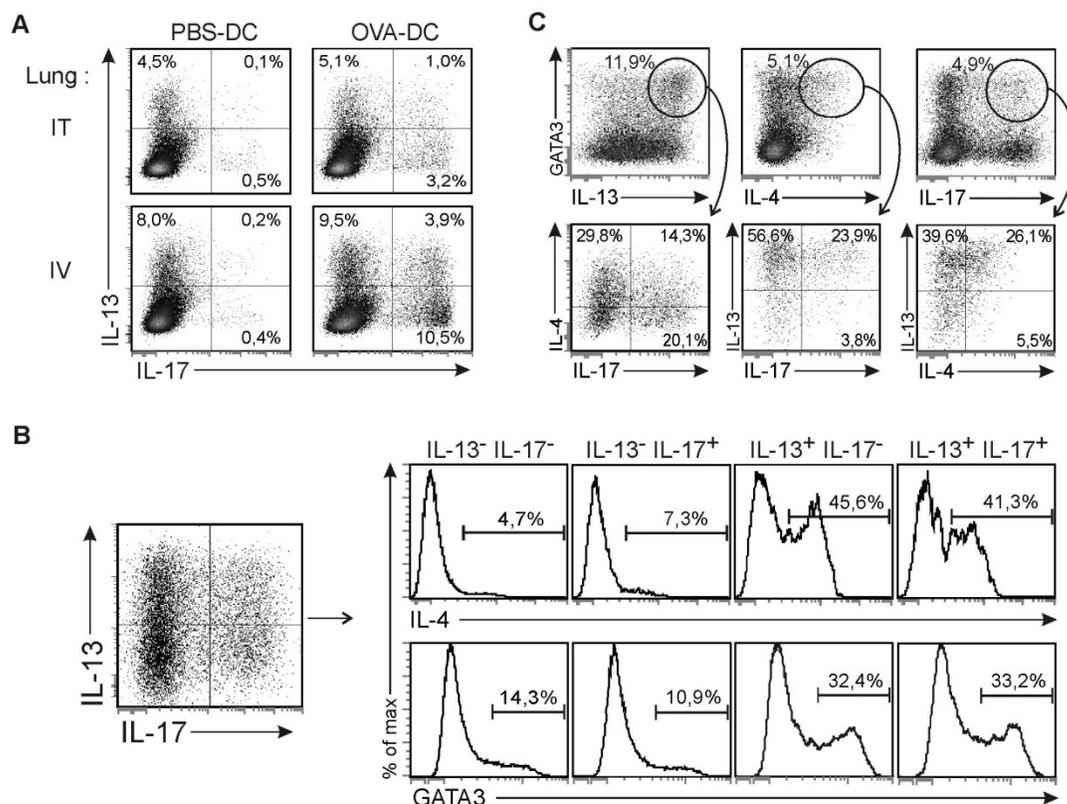


Figure 3.7 Identification of IL-17⁺IL-13⁺IL-4⁺CD4⁺T (Th17⁺Th2⁺) cells that express GATA-3 in inflamed lung tissues.

Mice were sensitized IT (A) or IV (A, B and C) with PBS-DC or OVA-DC on day 0, challenged on day 12 and sacrificed on day 15. A) IL-13 and IL-17 expression among CD4⁺T cells in lung tissues. B) IL-4 or GATA3 expression among IL-17⁻IL-13⁻, IL-17⁺IL-13⁻, IL-17⁻IL-13⁺ and IL-17⁺IL-13⁺ CD4⁺T cells. C) IL-4, IL-13 and IL-17 co-expression in CD4⁺T cells expressing GATA-3. Data are one representative of 2 independent experiments (3 mice per group).

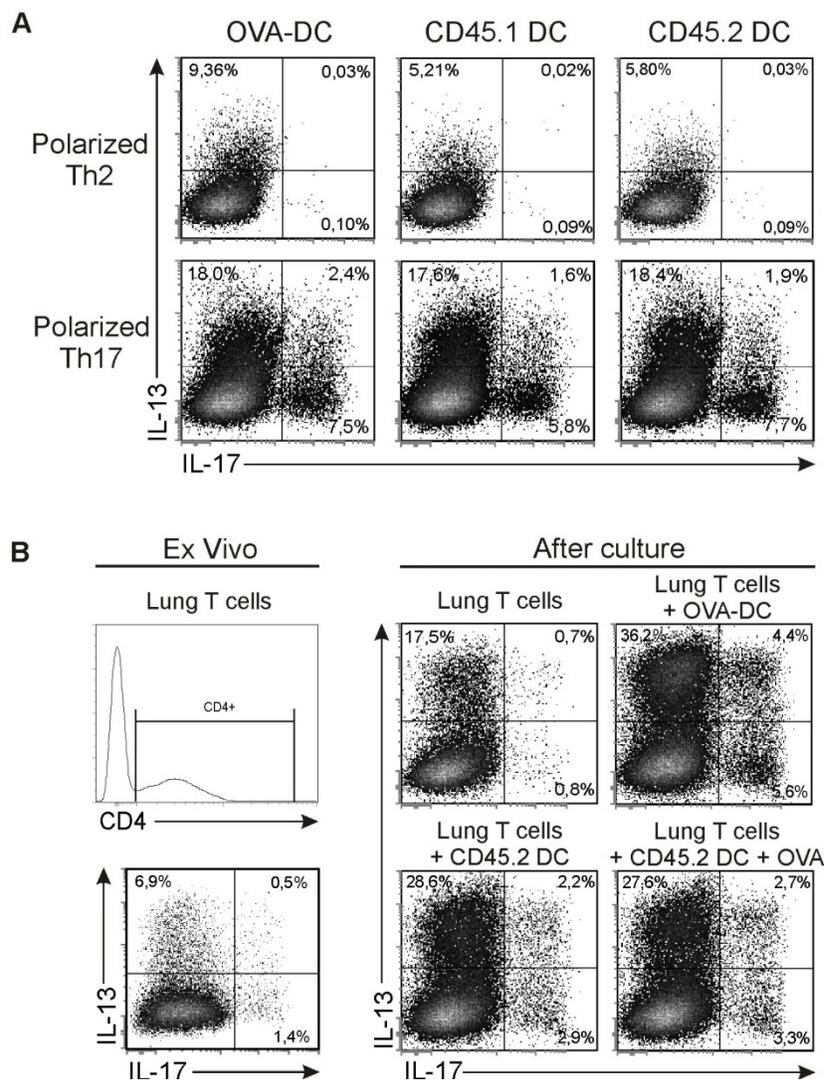


Figure 3.8 Airway host DCs convert effector CD4⁺T cells into Th17⁺Th2⁺ cells *in vitro*.

CD45.2 recipient mice were sensitized IV at day 0, challenged at day 12 with OVA-CD45.1 DCs and sacrificed on day 15. OVA-DC (CD45.1 DC before injection) or FACS-sorted- donor (CD45.1) and host (CD45.2) airway DCs were co-cultured with A) Th2 or Th17 polarized cells or B) lung effector CD4⁺T cells. IL-13 and IL-17 expression was examined in CD4⁺T cells before (*ex vivo*) or after culture. Data are one representative of 4 or 3 independent experiments.

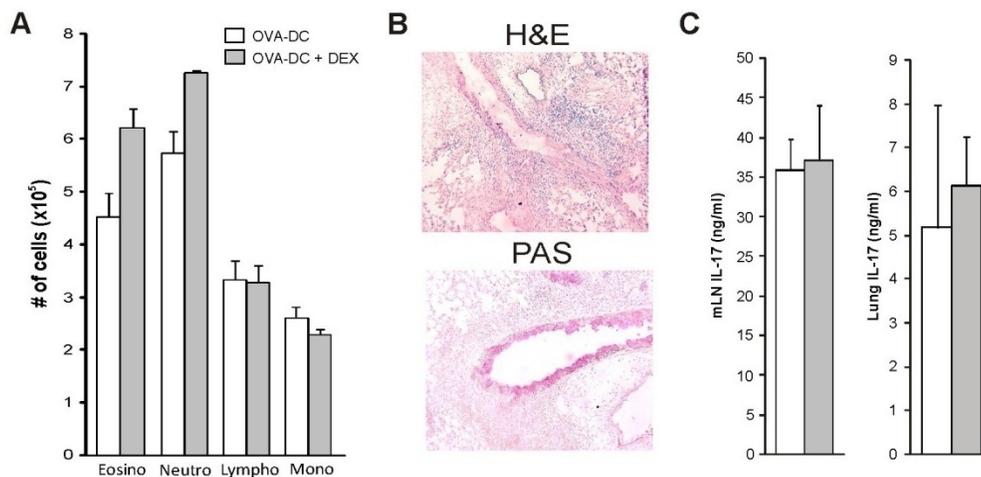


Figure 3.9 (Supplementary Fig 1) Repetitive local injection of OVA-DC induces a corticosteroid-resistant Th17 airway inflammation.

Mice were primed and challenged twice (on day 0, 12 and 15) IT with PBS- or OVA-DC and sacrificed 24 hours after the last DC injection. Some mice were treated daily with dexamethasone (DEX) from day 12 to day 15 A) Differential cell count in BALF shows eosinophils (eosino), neutrophils (neutro), lymphocytes (lympho) and other mononuclear cells (mono). B) Lung sections stained with H&E and PAS. C) Cytokines release by mLN cells after OVA restimulation *in vitro* and in lung explants. Data are mean \pm SEM of 6 mice per group.

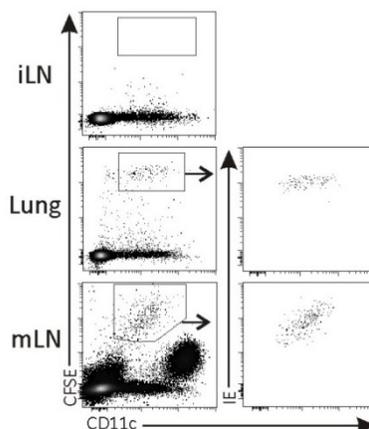


Figure 3.10 (Supplementary Fig 2) *In vivo* trafficking of DC injected IV to lungs and mLNs.

CFSE-labeled OVA-DC were injected IV and mice were sacrificed 48 hours later. Inguinal LN (iLN), mLN and lungs were examined for the detection of CFSE-labeled CD11c⁺ Class II⁺ DCs. Data show one representative experiment out of 2.

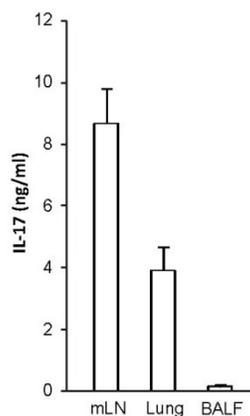


Figure 3.11 (Supplementary Fig 3) Early IL-17 production in mLN cells, lungs and BALF of mice repeatedly immunized with DCs.

Mice were primed and challenged once (on day 0 and 12) IT with OVA-DC and sacrificed 24 hours after the last DC injection. IL-17 release in mLN cells after OVA restimulation *in vitro*, in lung explants and BALF. Data are mean +/- SEM of 6 mice per group.

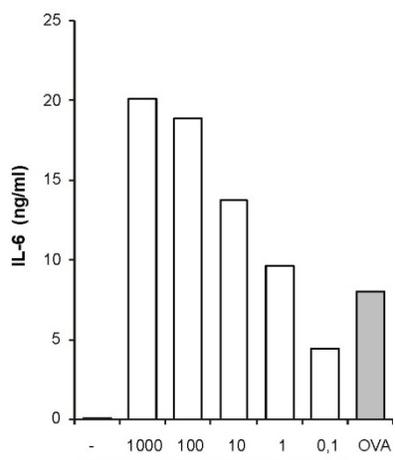


Figure 3.12 (Supplementary Fig 4) LPS titration in OVA protein.

BMDCs were stimulated *in vitro* with various concentrations of LPS or 100 μ g/ml of LPS-contaminated OVA protein. IL-6 production was measured in overnight culture supernatants. Data represent 2 independent experiments.

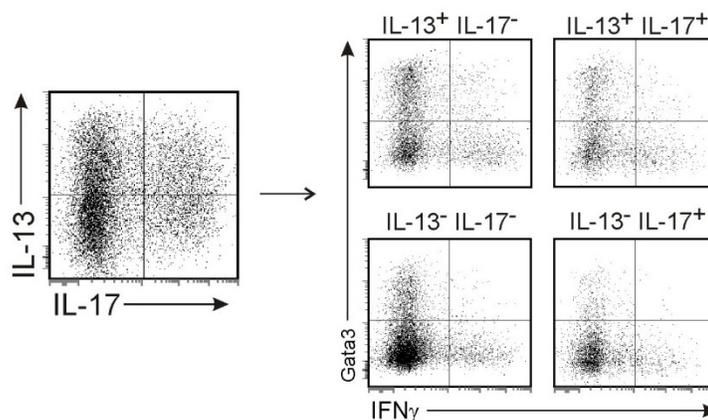


Figure 3.13 (Supplementary Fig 5) Th17⁺Th2⁺ lung CD4⁺ T cells that express GATA-3 do not produce IFN- γ .

Mice were sensitized IV with OVA-DC on day 0, challenged on day 12 and sacrificed on day 15. IL-13 and IL-17 expression among CD4⁺ T cells in lung tissues (left panel) IFN- γ and GATA3 expression according to IL-17 and IL-13 expression (right panel). Data are one representative of 2 independent experiments.

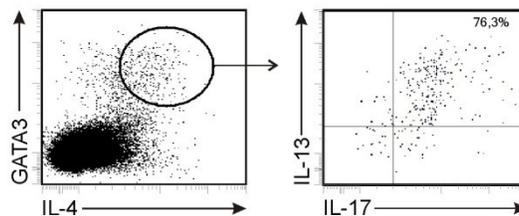


Figure 3.14 (Supplementary Fig 6) OVA-DCs convert lung effector CD4⁺T cells into Th17⁺Th2⁺ cells that express GATA-3 *in vitro*.

CD45.2 recipient mice were sensitized IV at day 0 and challenged at day 12 with OVA-CD45.1 DCs. Mice were sacrificed on day 15. OVA-CD45.1 DCs were co-cultured with lung effector CD4⁺T cells. IL-13 and IL-17 expression was examined among IL-4⁺CD4⁺T cells that expressed GATA-3. Data are one representative of 2 independent experiments.

2.3.6 Discussion

The conversion of CD4⁺ Th cell subsets has relied mostly on extensive *in vitro* manipulation (Lee et al., 2009). It is thought that murine Th17 memory cells generated *in vivo* are keeping a stable phenotype and cannot be manipulated *in vitro* to express a Th2 cytokine profile (Lexberg et al., 2008). However, evidence of the plasticity of Th17 toward Th2 is provided by the presence of IL-17⁺IL-4⁺ Th cells in *ex vivo* isolated peripheral blood of healthy donors. Human Th17 cells express IL-4R and *in vitro* culture of human Th17 clones with IL-4 promotes their expression of IL-4 (Cosmi et al., 2010). So far, the existence of such cells has not yet been substantiated in BALF or bronchial biopsies. The present study demonstrates the existence of Th17 cells that produced IL-4 and IL-13 *in vivo*. Repeated immunization of mice with inflammatory OVA-DCs elicited Ag-specific IL-17⁺IL-4⁺IL-13⁺CD4⁺ lung T cells that express GATA-3 (Th17⁺Th2⁺) in mLN and lung tissues. We further show that established Th17 cells were converted *in vitro* by inflammatory DCs into IL-13 and IL-4-expressing cells whereas Th2 cell lines did not express IL-17 under similar culture conditions, suggesting that Th17 cells were reprogrammed to produce Th2 cytokines and not *vice versa*. Finally, we provide evidence that repetitive injection of inflammatory OVA-DCs prevailed on the route of immunization (i.e. systemic or local) to drive Th17⁺Th2⁺ responses and chronic lung inflammation.

Epigenetic modifications have been recently demonstrated in polarized Th cells (Wei et al., 2009). Mapping of permissive (H3K4me3) and suppressive (H3K27me3) forms of histone methylation at the *Il17*, *Ifng* and *Il4* locus conforms to the expectation of lineage commitment in respective Th17, Th1 and Th2 differentiated cells. In contrast, bivalent forms of histone modifications are found at *Tbx21* in non-Th1 cells and at *Gata3* locus in all non-Th2 cells, suggesting that non-Th2 cells retain the capacity to express GATA-3 (Wei et al., 2009). These observations may represent the mechanism underlying the existence of Ag-specific Th17⁺Th2⁺ cells that express GATA-3 found in inflamed lung tissues and mLN of mice repeatedly immunized with OVA-DC. However, no

reprogramming of Th2 into Th17 cells has been reported so far, suggesting that signals required to promote this pathway remain to be elucidated.

Our data indicated that lung effector CD4⁺ T cells or Th17 polarized cell lines co-cultured *in vitro* with inflammatory airway DCs expressed a Th17⁺Th2⁺ profile. Several members of TNF receptor or B7 family have been implicated in the regulation of Th2-mediated allergic disorders (Lombardi et al., 2010). These costimulatory molecules are involved in Th2 cell development while their role in the maintenance of Th2 response is not established (Linhart et al., 2007; Nagashima et al., 2008; Salek-Ardakani et al., 2003). CD134 (OX40), CD252 (OX40L) and CD30-deficient mice exhibit reduced Th2 response and airway inflammation in OVA-induced experimental model of asthma (Hoshino et al., 2003; Polte et al., 2006; Polte et al., 2009) whereas CD40 deficiency exacerbates the disease (Takahashi et al., 2003). We largely excluded the contribution of CTLA-4/CD86-CD80, CD154/CD40, CD252/CD134 and CD153/CD30 in the *in vitro* conversion of Th17 cell lines into Th17⁺Th2⁺ cells by inflammatory DCs, without ruling out their potential role *in vivo*. The identification of signals delivered by DCs or of the cytokines they produced in the context of airway inflammation to drive Th17 reprogramming will require further study. That Th17 or Th2 cells themselves altered cytokine profile of DCs to generate Th17⁺Th2⁺ responses is also to be considered since memory CD4⁺ Th cells at the site of viral infection induce an early production of multiple inflammatory cytokines by innate cells in the lungs (Strutt et al., 2010).

An increasing body of evidence has revealed that the route of immunization affects the quality and cytokine profile of the CD4⁺ Th cell responses. Sensitization through the peritoneum using adjuvant followed by repeated airway challenge induces pulmonary IgE-dependent Th2 responses and no Th17 whereas airway sensitization promotes the development of neutrophilic-dependent Th17 responses (Wilson et al., 2009b). In another study, systemic immunization elicits Th2 or Th1 bias in response to infectious agents while short-term Th17 memory response is driven by intranasal immunization

(Pepper et al., 2010). Environment in mucosal tissues, an enriched TGF- γ milieu, is propitious for the differentiation of IL-17-producing cells, which requires both IL-6 and TGF- γ to develop (Mills, 2008). We here showed that repetitive intravenous (IV) injection of OVA-DCs but not unpulsed DCs induced Ag-specific Th17 responses in mLNs and lung tissues in the absence of airway challenge. This indicates that the passage through epithelial barrier is not an obligatory route to initiate a pulmonary Th17 response. Indeed, DCs injected IV rapidly migrated to lungs and the draining LNs. The notion that DCs could reach the blood and recirculate has surfaced repeatedly (Bonasio and von Andrian, 2006). Circulating DCs continuously access bone marrow where they can activate resident memory T cells (Cavanagh et al., 2005). Peripheral DCs may enter local lymphatic vessels, pass through LN to reach circulation via the thoracic duct and access lung tissues, which represent an important vascular filter (Willart et al., 2009). Transcutaneous sensitization elicits T cell responses at distal mucosal sites, suggesting that skin DCs collect Ag in the periphery and traffic to the inductive site to activate T cells. This does not exclude the possibility that DCs migrate to LNs to activate T cells, which do return to the effector sites (Belyakov et al., 2004). Epicutaneous Ag delivery drives Th17 airway responses upon OVA inhalation even in the absence of IL-4 and IL-13 (He et al., 2009). Taken altogether, a recent concept has emerged that the mucosal immune system can be viewed as a global organ characterized by diverse relationships between mucosal sites with a potential key role for DCs in connecting the different sites. (Gill et al., 2010).

Although sole OVA-DC drove pulmonary Th17⁺Th2⁺ responses, unpulsed DCs injected IV or IT triggered a significant production of IL-6 and IL-13, which was comparable to that induced by OVA-DC. In fact, it has been shown that IT immunization with unpulsed DCs at two weeks interval is sufficient for the maintenance of induced bronchial-associated lymphoid tissue (iBALT) and lung inflammation (GeurtsvanKessel et al., 2009), corroborating our results. Also, consecutive SC injection of inflammatory DCs two days apart induce reactive LN that will be permissive for experimental autoimmune

encephalomyelitis development following IV immunization with MOG peptide, 30 days later, in the absence of adjuvant (Martin-Fontecha et al., 2008). In our study, low doses of LPS (~500 pg) and the presence of Ag were required to initiate the local Th17 response. In agreement with our findings, DCs pulsed with LPS-free OVA and administered intranasally do not induce allergic airway inflammation (Peters et al., 2010). In that report, high doses of LPS (10ng) are required to drive IL-17 production by lung cells. In contrast to airway sensitization, recognition of LPS by non-hematopoietic tissues and inflammatory mediator release are neither sufficient nor required for DC activation during systemic inflammation, indicating that TLR signals must be directly delivered to DCs under these particular conditions (Nolte et al., 2007). Indeed, airway exposure to allergens delivers a signal through TLR4 to epithelial cells and not to DCs to drive airway inflammation (Hammad et al., 2009).

As in humans, Th17-associated neutrophilic airway inflammation was often related to severe non-allergic asthma in mice. We here show that a massive neutrophil recruitment to the BALF occurred immediately after DC injection but declined rapidly. Rather, the detection of Th17⁺Th2⁺ cells correlated with the late recruitment of eosinophils and lymphocytes in the BALF and airway inflammation, irrespective of the route of immunization. We postulate that an early source of IL-17 other than Th17 cells is responsible for the transient neutrophilia seen in our kinetics studies. Although the function of Th17⁺Th2⁺ cells remains to be elucidated, we argue that they are pathogenic and drive airway inflammation. First, it has been reported that administration of IL-17, but not neutrophil-attracting chemokines, is required to induce asthma features in mice that have been immunized systemically (IP) and displayed an ongoing Th2 response, suggesting that Th17 and Th2 cooperate to elicit lung inflammation and bronchial hyperreactivity (Wilson et al., 2009b). Second, adoptive transfer of Ag-specific Th17 cells alone initiates neutrophil recruitment in the airways, whereas cotransfer of Th17 and Th2 cells promotes a mixed neutrophilic and eosinophilic infiltrate, indicating that functional effector Th cells may represent the primary events that drive airway

inflammation and AHR (Wakashin et al., 2008). Third, the proportion of IL-17⁺IL-4⁺CD4⁺T cells seen at a low frequency in the circulation of healthy donors is increased in severe asthmatic patients (Cosmi et al., 2010).

How is the non-allergic asthma initiated and why it persists remain to be determined. Are Th17, Th2 or Th17⁺Th2⁺ effector cells the primary events implicated in disease pathogenesis or are they secondary to other events that render airways susceptible to asthma (Holgate and Davies, 2009)? Overall, we propose that lung DCs that have captured Ag from the outside (airway sensitization) or at a peripheral site (systemic or epicutaneous immunization) initiate a temporal sequence of immune responses in lungs, which are first characterized by a burst of neutrophils airway inflammation. Airway inflammatory DCs subsequently migrate to mLNs whereby they prime Ag-specific Th17 responses that are reprogrammed into mixed Th17⁺Th2⁺ responses in the mLNs and/or upon return to the lung tissues. Eotaxin release by epithelial cells, which is secondary to IL-13 produced by innate and/or adaptive cells, results in the attraction to lung tissues of eosinophils (Jacobsen et al., 2008; Li et al., 1999), Th2, Th17 and Th17⁺Th2⁺ lymphocytes that express GATA-3. In that context, interfering with DC migration/function remains a promising therapeutic option for IgE-independent steroid-resistant severe asthma.

2.3.7 References

- Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 72:495-516.
- Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska. 2003. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 97:726-733.
- Belyakov, I.M., S.A. Hammond, J.D. Ahlers, G.M. Glenn, and J.A. Berzofsky. 2004. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 113:998-1007.
- Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, and B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- Bonasio, R., and U.H. von Andrian. 2006. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 18:503-511.
- Cavanagh, L.L., R. Bonasio, I.B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A.W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M.N. Starnbach, P.A. Koni, S. Pillai, W. Weninger, and U.H. von Andrian. 2005. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 6:1029-1037.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 125:222-230 e221-224.
- Dolan, C.M., K.E. Fraher, E.R. Bleecker, L. Borish, B. Chipps, M.L. Hayden, S. Weiss, B. Zheng, C. Johnson, and S. Wenzel. 2004. Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 92:32-39.
- Feuerer, M., J.A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2009. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10:689-695.
- GeurtsvanKessel, C.H., M.A. Willart, I.M. Bergen, L.S. van Rijt, F. Muskens, D. Elewaut, A.D. Osterhaus, R. Hendriks, G.F. Rimmelzwaan, and B.N. Lambrecht. 2009. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med* 206:2339-2349.
- Gill, N., M. Wlodarska, and B.B. Finlay. 2010. The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nat Immunol* 11:558-560.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, and B.N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15:410-416.
- He, R., H.Y. Kim, J. Yoon, M.K. Oyoshi, A. MacGinnitie, S. Goya, E.J. Freyschmidt, P. Bryce, A.N. McKenzie, D.T. Umetsu, H.C. Oettgen, and R.S. Geha. 2009. Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 124:761-770 e761.

- Hegazy, A.N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D.D. Pinschewer, A. Radbruch, and M. Lohning. 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32:116-128.
- Holgate, S.T., and D.E. Davies. 2009. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity* 31:362-367.
- Hoshino, A., Y. Tanaka, H. Akiba, Y. Asakura, Y. Mita, T. Sakurai, A. Takaoka, S. Nakaike, N. Ishii, K. Sugamura, H. Yagita, and K. Okumura. 2003. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* 33:861-869.
- Jacobsen, E.A., S.I. Ochkur, R.S. Pero, A.G. Taranova, C.A. Protheroe, D.C. Colbert, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2008. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205:699-710.
- Krishnamoorthy, N., T.B. Oriss, M. Paglia, M. Fei, M. Yarlagadda, B. Vanhaesebroeck, A. Ray, and P. Ray. 2008. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* 14:565-573.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad. 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31:412-424.
- Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107.
- Lexberg, M.H., A. Taubner, A. Forster, I. Albrecht, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, and H.D. Chang. 2008. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur J Immunol* 38:2654-2664.
- Li, L., Y. Xia, A. Nguyen, Y.H. Lai, L. Feng, T.R. Mosmann, and D. Lo. 1999. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol* 162:2477-2487.
- Linhart, B., S. Bigenzahn, A. Hartl, C. Lupinek, J. Thalhamer, R. Valenta, and T. Wekerle. 2007. Costimulation blockade inhibits allergic sensitization but does not affect established allergy in a murine model of grass pollen allergy. *J Immunol* 178:3924-3931.
- Lombardi, V., A.K. Singh, and O. Akbari. 2010. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 151:179-189.
- Martin-Fontecha, A., D. Baumjohann, G. Guarda, A. Reboldi, M. Hons, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2008. CD40L+ CD4+ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming. *J Exp Med* 205:2561-2574.
- McKinley, L., J.F. Alcorn, A. Peterson, R.B. Dupont, S. Kapadia, A. Logar, A. Henry, C.G. Irvin, J.D. Piganelli, A. Ray, and J.K. Kolls. 2008. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181:4089-4097.
- Mills, K.H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38:2636-2649.

- Nagashima, O., N. Harada, Y. Usui, T. Yamazaki, H. Yagita, K. Okumura, K. Takahashi, and H. Akiba. 2008. B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *J Immunol* 181:4062-4071.
- Nakae, S., H. Suto, G.J. Berry, and S.J. Galli. 2007. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* 109:3640-3648.
- Nolte, M.A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre, and C. Reis e Sousa. 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *J Exp Med* 204:1487-1501.
- O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7:425-428.
- Oboki, K., T. Ohno, H. Saito, and S. Nakae. 2008. Th17 and allergy. *Allergol Int* 57:121-134.
- Paul, W.E., and J. Zhu. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10:225-235.
- Pepper, M., J.L. Linehan, A.J. Pagan, T. Zell, T. Dileepan, P.P. Cleary, and M.K. Jenkins. 2010. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol* 11:83-89.
- Peters, M., K. Dudziak, M. Stiehm, and A. Bufe. 2010. T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 88:537-544.
- Polte, T., A.K. Behrendt, and G. Hansen. 2006. Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118:942-948.
- Polte, T., L. Fuchs, A.K. Behrendt, and G. Hansen. 2009. Different role of CD30 in the development of acute and chronic airway inflammation in a murine asthma model. *Eur J Immunol* 39:1736-1742.
- Raymond, M., M. Rubio, G. Fortin, K.H. Shalaby, H. Hammad, B.N. Lambrecht, and M. Sarfati. 2009. Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 124:1333-1342 e1331.
- Salek-Ardakani, S., J. Song, B.S. Halteman, A.G. Jember, H. Akiba, H. Yagita, and M. Croft. 2003. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J Exp Med* 198:315-324.
- Schleimer, R.P., A. Kato, R. Kern, D. Kuperman, and P.C. Avila. 2007. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120:1279-1284.
- Strutt, T.M., K.K. McKinstry, J.P. Dibble, C. Winchell, Y. Kuang, J.D. Curtis, G. Huston, R.W. Dutton, and S.L. Swain. 2010. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 16:558-564, 551p following 564.
- Takahashi, H., S. Ebihara, A. Kanda, M. Kamanaka, T. Sato, S. Habu, H. Kikutani, and H. Sasaki. 2003. Increased susceptibility to airway responses in CD40-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 133:22-29.

- van Rijt, L.S., H. Kuipers, N. Vos, D. Hijdra, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2004. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *J Immunol Methods* 288:111-121.
- Wakashin, H., K. Hirose, Y. Maezawa, S. Kagami, A. Suto, N. Watanabe, Y. Saito, M. Hatano, T. Tokuhisa, Y. Iwakura, P. Puccetti, I. Iwamoto, and H. Nakajima. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1023-1032.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
- Wang, Y.H., P. Angkasekwinai, N. Lu, K.S. Voo, K. Arima, S. Hanabuchi, A. Hippe, C.J. Corrigan, C. Dong, B. Homey, Z. Yao, S. Ying, D.P. Huston, and Y.J. Liu. 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.
- Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T.Y. Roh, W.T. Watford, D.E. Schones, W. Peng, H.W. Sun, W.E. Paul, J.J. O'Shea, and K. Zhao. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4⁺ T cells. *Immunity* 30:155-167.
- Willart, M.A., H. Jan de Heer, H. Hammad, T. Soullie, K. Deswarte, B.E. Clausen, L. Boon, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2009. The lung vascular filter as a site of immune induction for T cell responses to large embolic antigen. *J Exp Med* 206:2823-2835.
- Wilson, R.H., G.S. Whitehead, H. Nakano, M.E. Free, J.K. Kolls, and D.N. Cook. 2009. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 180:720-730.
- Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, and J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000-1007.
- Zhu, J., and W.E. Paul. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20:4-12.
- Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489.

3. DISCUSSION

3.1 Mise en contexte

Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, il est primordial de comprendre l'ensemble des mécanismes qui régissent la maladie. En effet, chaque molécule et cellule découvertes ou encore tous les mécanismes élucidés dans le cadre des recherches menées dans le domaine de l'asthme ont permis d'élaborer des hypothèses et des espoirs thérapeutiques. Malgré leur contribution à l'avancement des connaissances mécanistiques, très peu de recherches ont concrètement mené à un traitement efficace chez l'humain.

Nombreux sont ceux qui ont avec succès soigné l'asthme chez la souris, qui représente un système constant et homogène où tous les individus d'un groupe sont génétiquement identiques et maintenus dans un milieu contrôlé, à l'abri des variations environnementales. En réalité, la maladie est beaucoup plus complexe chez l'humain. De nombreux anticorps bloquants ou recombinants ont été construits et testés chez la souris et les cibles les plus prometteuses ont été soumises à l'essai clinique chez l'humain, sans grand succès toutefois. C'est le cas de l'anticorps antagoniste de l'IL-4 (Pascalizumab) qui semblait prometteur mais qui a échoué lors de l'essai clinique (Finkelman et al., 2010). Des anticorps recombinants dirigés contre le récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra, Anakinra) et de l'IL-4 (Altrakincept) ainsi que les cytokines recombinantes IL-10, IL-12 et IFN- γ ont montré très peu ou pas d'effet chez les patients asthmatiques et leur développement a par conséquent été interrompu (Barnes, 2008a; Finkelman et al., 2010). Sur une note plus positive, l'anticorps bloquant l'IL-5 (mepolizumab) présente des effets bénéfiques partiels en étude clinique auprès des patients atteints d'asthme sévère, bien qu'il soit inefficace chez les asthmatiques atteints d'une forme légère à modérée de la maladie (Haldar et al., 2009). La protéine recombinante dérivée de l'IL-4, Pittrakina, agit comme antagoniste à l'IL-4 et l'IL-13 en liant l'IL-4R α , chaîne commune

aux deux interleukines. Il s'agit sans doute du traitement le plus prometteur au niveau des cytokines impliquées dans l'asthme. Le produit est présentement en cours d'essai clinique et semble réduire la réponse à l'allergène (Wenzel et al., 2007). D'autres anticorps dirigés contre l'IL-13 (CAT-354 et AMG 317) sont également en étude clinique depuis peu (Desai and Brightling, 2009). Des études sur un modèle de souris ont démontré que l'absence d'IL-13 et d'IL-4 entraîne une réponse Th17 exagérée responsable de l'inflammation pulmonaire et de l'hyperréactivité bronchique mettant en doute l'efficacité de ces traitements chez l'humain (He et al., 2009). Somme toute, les observations et les essais en ce qui concerne les cytokines sont plutôt décevants, étant donné le nombre impressionnant de cibles potentielles révélées par les études expérimentales chez la souris. Ces cibles se situent en aval de la cascade asthmatique, ce qui présente une limite importante au développement d'une thérapie. L'asthme est une maladie multifactorielle hétérogène où la majorité des médiateurs en aval sont redondants.

Il est donc plus réaliste de croire en l'efficacité d'un traitement ayant pour cible une composante plus spécifique de la réponse inflammatoire asthmatique. C'est le cas du traitement avec l'anticorps humanisé anti-IgE Omalizumab qui s'avère jusqu'à maintenant efficace. Omalizumab réduit la quantité d'IgE libre, inhibe sa liaison aux récepteurs de haute (FcεRI) et de faible (FcεRII) affinités sur les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles, en plus de réguler de façon négative l'expression de FcεRI. Toutefois, ce traitement est très coûteux et il est par conséquent offert seulement aux patients qui ne répondent pas aux traitements actuels et qui souffrent d'un asthme sévère, de source allergique seulement (Gould and Sutton, 2008). Il ne prévient pas à lui seul l'hyperréactivité bronchique et la réponse Th2 IgE-indépendante qui peut persister dans les organes cibles (Djukanovic et al., 2004; Gould and Sutton, 2008). Bref, étant donné que l'asthme réfractaire est généralement une maladie non allergique ou mixte, l'Omalizumab n'est pas un traitement approprié.

Au même titre que les mastocytes, les DCs sont à la base de la réponse inflammatoire indésirable observée chez les patients asthmatiques et allergiques et par conséquent, elles représentent une cible de choix dans l'élaboration d'un traitement. Il devient de plus en plus évident qu'il existe plusieurs types de DCs qui se distinguent par leur phénotype, leur origine, leur localisation et leur fonction. Identifier et cibler spécifiquement la population de DCs impliquée dans le développement et le maintien de la maladie constitue un défi aussi bien prometteur que stimulant. Tel était l'objectif du projet défendu dans cette thèse.

3.2 Les DCs dans l'asthme allergique

Trois types de DCs ont été caractérisés dans les poumons : les DCs plasmacytoïdes, les DCs CD103⁺ et les DCs CD103-SIRPα⁺. Les DCs plasmacytoïdes jouent un rôle protecteur lors de la réaction inflammatoire pulmonaire, de manière à contrôler l'ampleur de la réponse (de Heer et al., 2004). Les DCs CD103⁺ sont dites intra-épithéliales puisqu'elles sont en étroit contact avec les cellules épithéliales et sont capables d'étendre leurs dendrites vers la lumière des voies respiratoires de façon à exercer leur rôle de sentinelles (Hammad and Lambrecht, 2008). Elles seraient aussi impliquées dans l'induction de la tolérance aux antigènes inoffensifs inhalés (Hintzen et al., 2006). Les DCs CD103⁺ présentent les antigènes dans un contexte tolérogénique aux cellules T CD8⁺ dans les ganglions médiastinaux, où elles migrent de manière CCR7-dépendante (del Rio et al., 2007). Les DCs CD103⁺ identifiées dans la muqueuse intestinale induisent des cellules T régulatrices, une fonction qui n'a pas été associée aux DCs CD103⁺ pulmonaires. Dans le modèle de colite comme dans le modèle d'asthme, les DCs CD103⁺ ne semblent pas impliquées dans la pathogénèse de la maladie. Du moins, elles ne sont recrutées ni dans les tissus, ni aux ganglions drainants lors de l'inflammation (Fortin et al., 2009).

Les DCs CD103⁻ sont fonctionnellement distinctes des deux autres populations, bien que leur contribution exacte dans la maladie ne soit pas bien définie. Dans les poumons, elles se situent immédiatement sous les cellules épithéliales, dans la lamina propria. Elles présentent les antigènes aux cellules T CD4⁺ ganglionnaires en conditions d'homéostasie (del Rio et al., 2007; Sung et al., 2006; van Rijt et al., 2005). Il a été démontré que les DCs CD103⁻ sécrètent de nombreuses chimiokines, tant en conditions basales qu'inflammatoires, de façon à induire la réponse T plus efficacement que les DCs CD103⁺ (Beatty et al., 2007).

3.2.1 SIRPα : Un nouveau marqueur sélectif

À partir de notre modèle d'asthme allergique expérimental, nous avons d'abord démontré que la population de DCs CD11b⁺CD103⁻ exprime sélectivement le SIRPα à sa surface et est spécifiquement recrutée aux ganglions drainant les poumons au cours de la réponse asthmatique. Le SIRPα n'est pas exprimé à la surface des autres populations de DCs dans les poumons et présente donc un marqueur exclusif aux DCs CD103⁻. Les DCs SIRPα⁺ expriment également le CD11c et le CMH de classe II, marqueurs qui identifient l'ensemble des DCs. Le groupe du Dr Merad a aussi récemment identifié comme marqueur spécifique aux DCs SIRPα⁺ le CX3CR1, récepteur de la fractalkine, une chimiokine exprimée par les cellules endothéliales qui est responsable de l'adhésion et la migration des cellules T et des monocytes (Ginhoux et al., 2009). Les DCs SIRPα⁺ semblent dériver des monocytes et partagent plusieurs marqueurs avec les macrophages. La stratégie d'analyse des cellules par cytométrie de flux est par conséquent déterminante. Les macrophages sont autofluorescents et doivent être exclus lors de l'analyse des DCs. Alors que les DCs CD103⁺ diffèrent des DCs SIRPα⁺, elles ressemblent aux DCs CD8⁺ conventionnelles. Elles expriment peu ou pas de CD11b, sont exemptes de CX3CR1 et de SIRPα et portent la protéine de surface langerin (Ginhoux et al., 2009). Par analogie, les deux sous-populations de DCs se retrouvent également dans

la muqueuse intestinale où elles expriment les mêmes marqueurs. Notre groupe a d'ailleurs démontré l'expression préférentielle de SIRP α à la surface des DCs CD103⁻ intestinales, travail auquel j'ai contribué (Fortin et al., 2009).

3.2.2 CD47-SIRP α : Le contrôle de la migration des DCs SIRP α ⁺

SIRP α se lie au CD47 au cours de la réponse immune et cette interaction régit plusieurs fonctions. Mes collègues ont démontré qu'indépendamment du CCR7, le CD47 gouverne spécifiquement la migration des DCs de la peau à travers la barrière endothéliale et les vaisseaux lymphatiques sans toutefois influencer la migration des cellules T et B. Des essais de migration compétitive chez les souris CD47^{+/-} et CD47^{-/-} ont montré que l'expression du CD47 sur les DCs et non sur l'endothélium est nécessaire pour leur migration. Ces observations ont été associées à la déplétion sélective de la population de DCs CD11c^{hi} CD11b⁺ CD4⁺ et non des DCs CD11c^{hi} CD11b⁻ CD8⁺ de la zone marginale de la rate (Van et al., 2006). Bien que le CD47 soit exprimé à la surface de toutes les cellules hématopoïétiques, le défaut de migration n'est attribuable qu'aux DCs SIRP α ⁺. À partir du modèle d'asthme murin et suite à la manipulation des souris déficientes en CD47, nous avons démontré que le CD47 exprimé spécifiquement à la surface de la sous-population de DCs CD11c^{hi} CD11b⁺ CD103⁻ SIRP α ⁺ pulmonaires est nécessaire pour leur déplacement vers les organes lymphoïdes secondaires. Les souris CD47^{-/-} montrent en effet une proportion et un nombre absolu réduits de DCs SIRP α ⁺ dans les ganglions médiastinaux à l'état de base et suite à l'induction de l'inflammation pulmonaire. Les autres DCs, c'est-à-dire les DCs CD103⁺ ainsi que les DCs plasmacytoïdes (CD11c^{low} CD11b⁻ GR1⁺ B220⁺ 120G8⁺), restent inchangées en nombre dans les souris déficientes en CD47 comparativement aux souris sauvages. Ces deux populations de DCs sont plutôt tolérogéniques et régulatrices de l'inflammation (del Rio et al., 2007; Ito et al., 2007). Des conclusions similaires ont été tirées des études sur les DCs SIRP α ⁺ de la muqueuse intestinale, renforçant l'implication de l'interaction CD47/SIRP α dans la migration sélective des DCs (Fortin et al., 2009).

Alors que le processus moléculaire responsable de la migration des DCs SIRP α ⁺ reste inconnu, quelques hypothèses peuvent être émises quant à l'interaction CD47/SIRP α , sachant que le CD47 à la surface de la DC est nécessaire pour sa migration. La **Figure 10** illustre ces hypothèses.

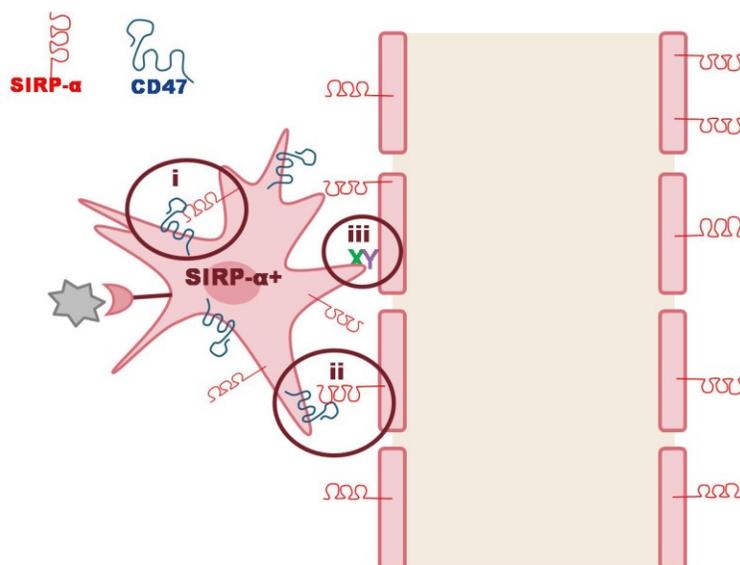


Figure 10. Hypothèse de l'interaction CD47-SIRP α dans la migration des DC SIRP α .

i) Interaction en cis. Le défaut de migration sélectif aux cellules SIRP α ⁺ nous porte à croire que le SIRP α sur la DC est aussi important dans le processus de migration. D'ailleurs, il a été démontré que l'expression de SIRP α phosphorylé chez des lignées de cellules de mélanome contrôle positivement leur migration (Motegi et al., 2003). Il est donc possible que le CD47 interagisse *en cis* avec le SIRP α exprimé à la surface de la même cellule pour dicter sa migration.

ii) Interaction en trans. Nous ne pouvons exclure de nos hypothèses l'interaction du CD47 de la cellule migratoire *en trans* avec le SIRP α exprimé à la surface de l'endothélium. En effet, en plus d'être exprimé sur certaines DCs, le SIRP α est exprimé à

la surface des cellules endothéliales et des cellules épithéliales alvéolaires (Sarfati et al., 2008). Au cours de la réponse inflammatoire pulmonaire, les DCs SIRP α ⁺ semblent dériver de précurseurs monocytaires qui sont recrutés dans les poumons. Le lieu et la cinétique de leur différenciation en DC SIRP α ⁺ restent à déterminer. Il est possible que ce processus soit indépendant de l'interaction des précurseurs de DC avec le SIRP α de l'épithélium alvéolaire puisque nous n'observons aucune réduction de DCs SIRP α dans les poumons des souris CD47^{-/-} comparativement aux souris CD47^{+/+} à l'état de base et en condition inflammatoire. Dans notre modèle, le défaut de migration semble spécifique au transport des DCs SIRP α ⁺ des poumons vers les ganglions drainants. Pour ce faire, les DCs doivent obligatoirement passer à travers les vaisseaux lymphatiques (Randolph et al., 2005). Le CD47 des DCs interagit possiblement avec le SIRP α de l'endothélium lors de leur migration à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques et/ou de leur passage de la circulation lymphatique vers les tissus ganglionnaires.

iii) *Effets indirects.* L'implication de l'interaction entre le CD47 et le SIRP α peut être indirecte, c'est-à-dire en influençant d'autres molécules ou mécanismes nécessaires à la migration des DCs.

Quoi qu'il en soit, aucun de ces signaux ne semble être délivré chez la souris déficiente en CD47 et il en résulte un profond défaut de migration sélectif aux cellules SIRP α ⁺. La migration des DCs SIRP α ⁺ de la peau, des poumons et des intestins vers les organes lymphoïdes secondaires est réduite chez la souris CD47^{-/-} à l'état de base et lors de l'inflammation (Fortin et al., 2009; Van et al., 2006). Il en est de même pour les neutrophiles, qui sont SIRP α , dans les modèles d'infection systémique (Fortin et al., 2009; Lindberg et al., 1996). Ces observations soutiennent l'importance de l'interaction CD47/SIRP α dans la migration des cellules SIRP α ⁺. La manipulation du SIRP α à la surface des DCs permettrait sans doute de nous éclairer sur le mode d'action de l'interaction CD47-SIRP α dans le contrôle de la migration. Des expériences devraient idéalement être réalisées avec des DCs provenant de souris SIRP^{-/-}. Cet outil n'est toutefois pas

disponible étant donné qu'en absence de SIRP les souris ne sont pas viables. En revanche, les DCs de souris mutantes pour la signalisation intracellulaire du SIRP α pourraient être exploitées. L'utilisation des siRNA (small interfering RNA), des ARN interférant spécifiquement avec la protéine d'intérêt, pourrait constituer une alternative intéressante qui nous permettrait de supprimer l'expression de SIRP à la surface des DCs et d'en étudier le rôle. Paradoxalement, les DCs des souris mutantes expriment moins de SIRP α . La manipulation sélective du SIRP α et du CD47 est aussi possible à l'aide d'anticorps bloquants et de molécules de fusion. Cette approche a été utilisée dans le cadre de mon projet et sera discutée plus loin.

3.2.3 DCs SIRP α ⁺ : La fonction immunogénique

En plus d'avoir identifié un marqueur propre et unique aux DCs CD103⁻ pulmonaires, notre étude a démontré pour la première fois l'immunogénicité de ces DCs, maintenant connues comme étant SIRP α ⁺. Plusieurs résultats nous ont permis d'en venir à cette conclusion. D'abord, le défaut de migration des DCs SIRP α immunogéniques chez les souris déficientes en CD47 est en corrélation avec l'inhibition de la réponse Th2 dans le modèle d'asthme et de la prolifération des cellules T dans le modèle de transfert adoptif. Or, cette démonstration est indirecte, d'autres défauts de la souris CD47^{-/-} pourraient être impliqués dans la protection contre la maladie. Toutefois, l'effondrement de la quantité d'IgE et d'IgG1 ne peut être attribué à un défaut des cellules B à produire des anticorps car les cellules B isolées des souris CD47^{+/+} et CD47^{-/-} produisent des quantités comparables d'IgE et d'IgG1 *in vitro* en réponse à l'IL-4 (Bouguermouh et al., 2008). De plus, l'absence de réponse Th2 n'est pas attribuable à un défaut intrinsèque des cellules T CD4 puisque l'injection de DCs SIRP α ⁺CD47^{+/+} chargées d'ovalbumine chez les souris CD47^{-/-} entraîne une inflammation pulmonaire accompagnée d'une forte production de cytokines Th2 par les cellules T CD47^{-/-}. Cette expérience montre d'ailleurs que les DCs CD47^{-/-} sont incapables de générer une telle réponse inflammatoire et démontre directement le rôle immunogénique des DCs

CD47^{+/+} SIRP α ⁺, qui sont suffisantes pour induire la maladie chez une souris normalement protégée.

Nos résultats démontrent également l'importance de l'équilibre entre les DCs tolérogéniques et les DCs immunogéniques qui lorsque perturbé, génère un environnement inflammatoire. En condition d'homéostasie, les DCs plasmacytoïdes sont plus nombreuses que les autres populations de DCs dans les ganglions médiastinaux où règne un état non inflammatoire. Lors de la réponse asthmatique, les DCs plasmacytoïdes et les DCs SIRP α sont recrutées aux ganglions mais les proportions s'inversent. Les DCs immunogéniques (SIRP α ⁺) deviennent alors aussi nombreuses sinon plus que les DCs protectrices (plasmacytoïdes) et le ratio favorise le développement de l'inflammation. Étant donné que la souris CD47^{-/-} présente un défaut de migration sélectif des DCs SIRP α ⁺, le ratio entre les DCs protectrices et les DCs inflammatoires reste relativement stable même en conditions inflammatoires, comparativement aux souris CD47^{+/+}, conférant ainsi une protection. Nous croyons que ce phénomène est à la base de la protection observée chez les souris CD47^{-/-} lors de l'induction de l'inflammation pulmonaire.

3.2.4 Les DCs sont-elles essentielles dans l'asthme allergique?

Tel que décrit par le groupe de Lambrecht, les DCs myéloïdes sont fonctionnellement essentielles non seulement pour l'induction de la maladie mais aussi pour le maintien de l'état inflammatoire. Nos expériences d'injection intra-trachéales de DCs SIRP α ⁺ immunogéniques dans les souris sauvages et déficientes en CD47 soutiennent ce concept, tout en associant le marqueur SIRP α à l'immunogénicité et à la pathologie. Toutefois, l'importance des DCs dans l'asthme est mise en doute par d'autres groupes. Dans les modèles d'infection aux helminthes et d'inflammation en réponse à la protéase allergène papaïne, les groupes de Medzhitov et de Artis prétendent que les DCs ne sont

ni requises ni suffisantes pour induire la réponse Th2. Cette dernière dépend plutôt des basophiles qui sont recrutés aux ganglions, produisent de l'IL-4 et de la TSLP et présentent l'antigène aux cellules T par le CMH de classe II (Perrigou et al., 2009; Sokol et al., 2007; Sokol et al., 2009).

Le fait que les DCs induisent une réponse Th2 alors qu'elles sont incapables de produire les cytokines nécessaires à la polarisation Th2 constitue un argument contre la nécessité des DCs dans l'induction de l'asthme. Il est, selon moi, plus raisonnable de croire en une coopération entre les différentes composantes de l'immunité innée. C'est d'ailleurs ce que proposent quelques publications récentes. Il a été démontré que le TLR4 à la surface des cellules épithéliales, et non des DCs, est essentiel à l'induction de l'inflammation des voies respiratoires par les acariens et le LPS. Les DCs sont plutôt activées par les médiateurs libérés par les cellules épithéliales en réponse à l'engagement du TLR4 (Hammad et al., 2009). Une coopération entre les basophiles et les DCs dans l'induction de la réponse Th2 a aussi été proposée. Bien que le groupe travaille avec une population de DCs dermiques et que la transposition avec les DCs pulmonaires pourrait être questionnable, il élargit le concept de l'interaction de plusieurs types et mécanismes cellulaires pour amener la réponse immune (Tang et al., 2010). L'importance des basophiles a été présentée quelques années plus tôt par l'équipe de Locksley, qui avait proposé un modèle dans lequel les basophiles produisent de l'IL-4 et de l'IL-13 et jouent un rôle primordial dans l'accumulation et l'activation des cellules Th2 dans les poumons. Dans un modèle d'asthme allergique où les souris sont immunisées à trois reprises avec l'OVA-Alun suivi de trois injections intra-nasales consécutives, des basophiles sont recrutés dans les poumons. Bien que notre modèle induise aussi un asthme allergique, nous n'avons noté aucun recrutement de basophiles dans les ganglions médiastinaux ni dans les poumons lors de l'inflammation pulmonaire et par conséquent nos résultats ne soutiennent pas l'implication des basophiles dans la réponse Th2. Les souris reçoivent deux immunisations suivies de trois aérosols espacés

de quatre jours. La différence entre les deux schémas d'induction de la maladie pourrait expliquer la divergence des résultats. L'absence de marqueurs précis pour identifier rigoureusement les basophiles peut aussi engendrer de la confusion quant à l'analyse des populations cellulaires (Voehringer et al., 2006).

Les mécanismes régissant l'induction de la réponse Th2 semblent donc différer en fonction du modèle, de l'antigène utilisé et même du groupe d'investigateurs. En réalité, ceci reflète bien l'aspect multifactoriel et hétérogène de l'asthme chez l'humain. Quoiqu'il en soit, les DCs et les cellules Th2 constituent les éléments communs de la plupart des modèles d'asthme expérimental. De plus, les DCs sont en amont de la cascade inflammatoire, d'où l'intérêt de bien comprendre les mécanismes qui s'y rattachent. En accord avec l'équipe du Dr Lambrecht, nos résultats montrent clairement que les DCs, plus précisément les DCs SIRP α , sont nécessaires et suffisantes pour induire l'inflammation pulmonaire dans notre modèle classique d'asthme expérimental allergique, c'est-à-dire IgE-dépendant.

3.3 Les DCs SIRP α ⁺ dans l'asthme non allergique

Bien que les DCs aient été étudiées extensivement dans l'asthme allergique, leur rôle dans l'asthme non allergique est peu connu. Dépendant du contexte inflammatoire, les DCs ont la capacité d'orienter la réponse immune et d'induire une réponse Th1, Th2 ou Th17. En présence d'IL-4 ou d'IL-6, les DCs qui présentent les antigènes aux cellules T naïves dans les ganglions médiastinaux favorisent respectivement la différenciation des cellules Th2 et Th17 (Krishnamoorthy et al., 2008). De plus, la réponse Th17 a récemment été associée à l'asthme sévère. Nous avons ainsi étudié l'implication des DC SIRP α et la séquence temporelle du développement des réponses Th2 et Th17 dans les voies respiratoires et les ganglions drainants.

Après l'administration répétée de DCs SIRP α^+ chargées d'ovalbumine par voie intra-trachéale, nous observons un profil inflammatoire similaire à celui retrouvé chez certains patients asthmatiques réfractaires aux traitements standards : L'inflammation pulmonaire sévère, l'infiltration mixte (neutrophiles et éosinophiles) et la présence d'IL-17. De plus, les souris ne répondent pas au traitement avec le dexaméthasone, corticostéroïde qui inhibe complètement l'inflammation pulmonaire dans le modèle d'asthme allergique.

Notre modèle met en évidence le rôle des DCs SIRP α^+ immunogéniques, qui sont suffisantes pour induire l'inflammation sévère des voies respiratoires lorsqu'administrées localement. En effet, aucun aérosol d'antigène n'est nécessaire au développement de la réponse. Un autre groupe a démontré l'implication des DCs myéloïdes chez l'humain dans l'initiation et le maintien de la réponse pathogène Th1 et Th17 responsable de l'inflammation soutenue dans les poumons et la destruction tissulaire chez les fumeurs atteints d'emphysème (Shan et al., 2009). Ces DCs sont caractérisées comme étant CD1a $^+$ CD14 $^-$ et pourraient constituer l'équivalent chez l'humain de la population de DCs SIRP α^+ immunogénique que nous avons identifiée chez la souris. Par contre, les DCs que nous étudions induisent une combinaison de cytokines Th2 et Th17 alors que l'IL-4 et l'IL-13 semblent peu impliquées dans l'emphysème chez l'humain (Boutten et al., 2004; Grumelli et al., 2004). D'autres modèles animaux ont montré que l'administration intra-nasale d'acariens ou de la toxine cholérique, connue pour ses propriétés adjuvantes dans les muqueuses, active les DCs de manière à diriger une réponse Th2 et une réponse Th17 (IL-13 et IL-17). Cette réponse dépend de la production d'IL-6 par les DCs exprimant les marqueurs de surface c-kit et SCF (stem cell factor) en réponse aux antigènes (Krishnamoorthy et al., 2008). Nous n'avons pas vérifié la présence de ces deux marqueurs à la surface de nos DCs SIRP α^+ , mais nos résultats montrent aussi une augmentation de l'IL-6 en corrélation avec celle de l'IL-17 dans les ganglions et les poumons. Par contre, l'IL-6 n'est peut-être pas la seule composante responsable de la polarisation Th17 puisque les DCs SIRP α^+ non chargées d'antigène (PBS-DCs) induisent également de l'IL-6 *in vivo* dans le modèle intra-trachéal.

Contrairement au modèle d'asthme allergique classique (immunisation OVA-Alun suivi d'aérosols d'ovalbumine), nos expériences empruntant la voie intra-trachéale avec des DCs SIRP α^+ induisent une neutrophilie dans les Balf et de l'IL-17 dans les poumons et les ganglions médiastinaux. Comme le montre la **Figure 11**, l'IL-17 n'est pas détectable dans les ganglions dans le modèle classique. De plus, l'IL-17 augmente en fonction du nombre d'injections de DCs SIRP α^+ . Il en est de même pour l'IL-17 détectée dans les poumons des mêmes souris. À mesure que la neutrophilie augmente, les souris normalement asymptomatiques montrent des signes d'inconfort tels la perte de poids, la prostration, l'allure amorphe et la fourrure devient ébouriffée.

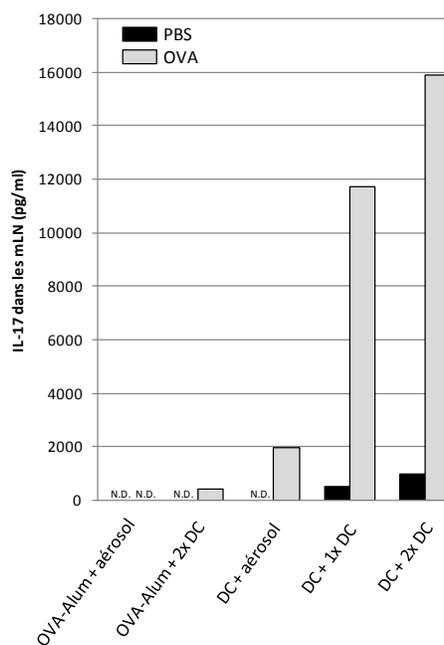


Figure 11. IL-17 dans les ganglions médiastinaux selon le schéma d'induction de l'inflammation pulmonaires.

Les souris ont été immunisées avec l'OVA-Alun (intra-péritonéal) ou avec des OVA-DCs SIRP α^+ (DC) (intra-trachéal) et ont reçu un rappel d'OVA en aérosol ou d'OVA-DC SIRP α^+ (DC). Les souris contrôle (PBS) ont été immunisées avec du PBS-Alun pour la première condition et des PBS-DCs pour les suivantes. Les mLN ont été prélevés 24 heures après le dernier rappel et mis en culture pour 3 jours en présence d'OVA. L'IL-17 a été mesuré dans le surnageant de culture par ELISA. n = 3 à 10 souris par groupe. N.D.; non détectable.

Notons que la quantité d'IL-17 détectée en réponse à deux ou trois injections intra-trachéales de PBS-DCs SIRP α^+ n'est pas négligeable, reflétant l'immunogénicité de ces cellules même en absence d'antigène. En vérifiant d'autres marqueurs à la surface des PBS-DCs SIRP α^+ en comparaison aux DCs SIRP α^+ restimulées à l'OVA, il est clair que le PBS n'active pas les DCs. Les PBS-DCs expriment peu de CD86 et de CMHII entre autres, contrairement aux OVA-DCs. Il est possible que quelques PBS-DCs s'activent et produisent de l'IL-17 lors de leur arrivée dans les poumons, par exemple lorsqu'elles entrent en contact avec les bactéries de la flore pulmonaire ou encore en réponse à des cytokines sécrétées par les cellules épithéliales suivant l'injection intra-trachéale. En effet, ce type d'injection implique un volume important de liquide dans les poumons de la souris ainsi que le passage forcé de nombreuses DCs à travers la barrière épithéliale, qui pourraient favoriser l'activation des cellules épithéliales. D'ailleurs, contrairement aux PBS-DC injectées par voie intra-trachéale, très peu d'IL-17 est sécrétée en réponse à l'administration intraveineuse des PBS-DCs.

3.3.1 Un passage obligé à travers la barrière épithéliale?

Il semble clair, en se référant à nos résultats et à la littérature, que lorsque les voies pulmonaires (intra-nasale ou intra-trachéale) sont empruntées pour introduire un allergène, il en résulte une réponse Th17. Plusieurs groupes présentent les cellules épithéliales comme étant les cellules responsables de l'initiation, du maintien et du contrôle de l'immunité innée et adaptative dans les voies respiratoires. De plus, plusieurs dysfonctions et gènes de susceptibilité liés à l'épithélium bronchique ont été associés à l'asthme. Ces mêmes groupes remettent en question la pertinence des modèles expérimentaux empruntant la voie systémique, c'est-à-dire intra-péritonéale, pour étudier l'asthme et l'inflammation des voies respiratoires et ne croient pas qu'une réponse Th2 aberrante soit à l'origine de ces maladies (Barrett and Austen, 2009; Holgate, 2007; Schleimer et al., 2007). Il n'en reste pas moins que le modèle

expérimental d'immunisation OVA-Alun par la voie intra-péritonéale induit tous les paramètres de l'asthme allergique, incluant l'hyperréactivité bronchique. Bref, je crois que les cellules épithéliales jouent un rôle dans certains types d'inflammation pulmonaire alors que dans d'autres, leur activation représente un évènement secondaire.

Le groupe de Donald N. Cook s'est récemment penché sur les différences qualitatives entre l'immunisation intra-péritonéale et intra-trachéale dans l'asthme expérimental. La voie intra-péritonéale constitue la voie classique pour l'immunisation dans les modèles d'asthme ou d'inflammation des voies respiratoires. Or, ce modèle ne reproduit pas fidèlement le profil rencontré chez l'humain, qui est plutôt sensibilisé à des allergènes inhalés. De plus, lors de la maladie chez la souris, la proportion d'éosinophiles peut atteindre 80% alors que chez le patient asthmatique, elle ne dépasse généralement pas les 5% (Lex et al., 2006). L'intérêt d'étudier la voie intra-trachéale dans l'asthme murin vient donc de la recherche d'un modèle qui exploite la voie naturellement empruntée par les antigènes pour reproduire le plus fidèlement possible l'asthme de l'humain. Dans son étude, Cook et ses collègues ont démontré que l'immunisation intra-péritonéale avec l'OVA-Alun induit une réponse Th2 robuste sans hyperréactivité bronchique après un seul aérosol avec l'antigène. En revanche, l'immunisation intra-trachéale suivie d'un aérosol d'ovalbumine génère une forte réponse Th17 accompagnée d'une réponse Th2 modeste. Dans ce modèle, l'ovalbumine est combinée au LPS lors de l'injection intra-trachéale. Les souris développent une hyperréactivité bronchique et une neutrophilie qui dépendent de l'IL-17 (Wilson et al., 2009b). L'immunisation intra-trachéale suivie d'aérosols induit chez nos souris une production abondante d'IL-17, en plus d'une inflammation péribronchique dense. Ces résultats nous portent à croire que l'hyperréactivité bronchique est présente également dans notre modèle. Nous n'avons malheureusement pas accès à la technologie nécessaire pour mesurer cette composante. Malgré que notre modèle rassemble tous les paramètres de l'asthme sévère de l'humain et que le profil inflammatoire semble même plus sévère que celui

rapporté par le groupe de Wilson, nous ne pouvons parler d'asthme en l'absence de la mesure de l'hyperréactivité bronchique. Définitivement, ce paramètre reste à être vérifié. Cette limite nous amène à parler plutôt d'inflammation pulmonaire sévère, ou encore d'inflammation neutrophilique / éosinophilique, Th17, résistante aux corticostéroïdes.

Il a été proposé qu'à l'état de base, les antigènes de la cavité péritonéale atteignent passivement les ganglions médiastinaux aussi peu que 2 heures après leur injection en passant à travers les stomates du diaphragme, des canaux qui connectent la cavité péritonéale au réseau lymphatique. Une fois les antigènes dans les ganglions, la présentation antigénique se fait par les DCs immatures résidentes, de manière à induire une réponse tolérogénique (Itano et al., 2003; Kool et al., 2008). En conditions inflammatoires, lorsque l'adjuvant Alun est combiné à l'antigène, des monocytes et DCs inflammatoires sont recrutés au site d'injection. De plus, les DCs résidentes du péritoine sont activées, possiblement en réponse à l'acide urique, un signal de danger interne déclenché par l'adjuvant. Les antigènes sont captés par ces cellules présentatrices d'antigènes, qui migrent vers les ganglions médiastinaux. Les monocytes inflammatoires se différencient en DCs matures capables de stimuler les cellules T de manière à générer des cellules T effectrices et mémoires. La voie intra-péritonéale induit, pour ainsi dire, spécifiquement une réponse au niveau des voies respiratoires (Kool et al., 2008). Le même groupe a aussi démontré que les poumons servent de filtre aux antigènes de grande taille retrouvés dans la circulation sanguine. Le sang éjecté du cœur passe complètement par les poumons et avec leur petit diamètre, les artérioles et les capillaires vasculaires pulmonaires retiennent les plus grosses particules comme des parasites. Les DCs échantillonnent les antigènes emprisonnés dans les poumons, sont capables de les présenter dans les ganglions médiastinaux et d'induire une réponse T effectrice. Dans le contexte où les cellules T sont activées, elles retournent aux poumons, où elles induisent des lésions inflammatoires transitoires (Willart et al., 2009).

Suivant cette théorie et pour vérifier quel type d'inflammation pulmonaire pourrait être induit en contournant l'épithélium bronchique, nous avons cru intéressant d'exploiter la voie intraveineuse avec nos DCs SIRP α^+ immunogéniques. Nous avons donc procédé à des essais de migration qui ont démontré que peu de temps après l'injection intraveineuse de DCs SIRP α marquées au CFSE, les DCs se retrouvent exclusivement dans les poumons. Nous avons également démontré que deux injections de DCs SIRP α^+ à 12 jours d'intervalle sont suffisantes pour induire une réponse inflammatoire pulmonaire de type Th17 qualitativement similaire à celle associée à l'injection intratrachéale. Pour une même quantité de cellules injectées, nous observons une inflammation de plus faible intensité, possiblement en raison de la plus petite proportion de cellules qui atteignent les poumons.

Nous avons clairement démontré que l'injection de DCs immunogéniques par voie intraveineuse induit une inflammation pulmonaire de type Th17 sans toucher l'épithélium bronchique. Il est sans doute faux de croire que le passage à travers les cellules épithéliales est indispensable à l'induction d'une réponse inflammatoire dans les poumons. Ces résultats nous permettent de spéculer quant aux événements pouvant déclencher l'initiation de l'asthme et des maladies inflammatoires pulmonaires. Alors que les virus et les bactéries passent au travers du filtre pulmonaire, certains parasites pourraient engendrer une réponse immunogénique par ce mécanisme. Le syndrome de Löffler est caractérisé par une infiltration transitoire de cellules inflammatoires dans les poumons ou encore par la présence de granulomes pulmonaires causée par l'infection sanguine due à certains parasites et à leurs œufs (Willart et al., 2009). Également, étant donné que nous avons montré que les DCs immunogéniques présentes dans la circulation sanguine peuvent induire une réponse dans les poumons, nous pourrions croire que certaines infections ou maladies, au cours desquelles des DCs SIRP α^+ sont activées ailleurs dans l'organisme, pourraient avoir des conséquences indésirables au niveau des poumons. Il s'agit du premier modèle d'inflammation pulmonaire à composante Th17 induit sans aérosol et en évitant tout contact direct avec les cellules

épithéliales. Nous n'excluons toutefois pas les effets indirects de l'injection sur les cellules épithéliales et par conséquent, l'implication de l'épithélium pulmonaire dans ce modèle. L'inflammation créée ou encore la production d'un médiateur quelconque lors du passage des DCs par les poumons pourraient par exemple activer les cellules épithéliales et ainsi amplifier et perpétuer les dommages. Nous avons par conséquent mesuré l'IL-25, qui n'était pas détectable dans les poumons des souris malades. Par contre, l'IL-25 était aussi absente chez les souris injectées par voie intra-trachéale. Il serait donc intéressant de mesurer d'autres médiateurs inflammatoires sécrétés par l'épithélium bronchique, par exemple la TSLP

3.3.2 Rôle des DC SIRP α ⁺ dans la plasticité fonctionnelle des Th17

L'impressionnante quantité d'IL-17 détectée dans les surnageants de poumons et de cultures de cellules ganglionnaires suite à l'injection répétée d'OVA-DCs nous a amené à vérifier la source d'IL-17. Les cellules T CD4 sont les principales cellules productrices d'IL-17. En étudiant ces cellules, nous avons découvert que l'injection répétée d'OVA-DCs SIRP α , administrées intra-trachéalement comme intraveineusement, induit une population cellulaire qui exprime à la fois l'IL-13 et l'IL-17 dans les poumons et les ganglions médiastinaux. Une analyse approfondie nous a permis de constater que 30% à 40% des cellules double positives expriment également IL-4 et le GATA3, facteur de transcription Th2. De telles cellules n'avaient jusqu'à maintenant jamais été décrites. Seule l'existence de cellules T CD4⁺IL-17⁺IL-4⁺ a récemment été mise en évidence dans le sang périphérique d'individus atteints d'asthme sévère (Cosmi et al., 2010).

Les cellules qui expriment à la fois des cytokines Th2 et Th17 apparaissent tardivement au cours du développement de l'inflammation pulmonaire sévère, corrélant avec l'accumulation des cellules T et des éosinophiles dans le lavage bronchoalvéolaire. En effet, 24 heures suivant la seconde injection de DCs, les cellules T ne produisent pas

encore d'IL-17. À ce moment de la cinétique, nous supposons que les DCs SIRP α injectées sont en route vers les ganglions pour convertir les cellules Th17 en cellules Th2/Th17, tel que le démontrent notre analyse 3 jours plus tard. Nous ne pouvons également exclure que certaines cellules T préalablement activées dans les ganglions soient converties en Th2/Th17 directement dans les poumons, après recirculation. Il a en effet été démontré qu'après l'expansion clonale, les cellules T effectrices retournent en périphérie au site d'inflammation, en l'occurrence les poumons, où elles peuvent être activées de nouveau par les cellules présentatrices d'antigènes locales (Lambrecht and Hammad, 2003).

L'arrivée des neutrophiles dans les poumons est très rapide, soit dès la première injection de DCs dans le cas de l'administration intra-trachéale, et précède donc l'expression de l'IL-17 par les cellules T. Il est probable que l'IL-17 et d'autres chimiokines attirant les neutrophiles soient rapidement produites par d'autres cellules dans les poumons. L'IL-17 peut en effet être produite de 4 à 8h après un dommage épithélial ou un signal de danger (infection microbienne par exemple) par des sources intrinsèques (Happel et al., 2005). Les cellules T $\gamma\delta$, les cellules NK T et les cellules myéloïdes sont des producteurs précoces d'IL-17, qui favorise la production d'IL-6, de G-CSF et de CXCL8 et par conséquent la chimiotaxie des neutrophiles (Cua and Tato, 2010). Nous croyons que ce processus est enclenché en réponse à l'injection intra-trachéale, bien que nous n'ayons pas approfondi les recherches sur ce sujet. Quant à l'administration intraveineuse, une cinétique semblable est observée avec toutefois un décalage dans la séquence temporelle des événements. Les neutrophiles tardent à infiltrer les poumons, suggérant que l'arrivée des DCs par la voie intraveineuse ne donne pas de signal précoce à l'épithélium bronchique et n'induit donc pas la production précoce de cytokines et de chimiokines. L'inflammation résulte probablement de la réponse T effectrice, qui prend plutôt quelques jours à se mettre en place. Quoiqu'il en soit, nos résultats démontrent qu'en absence de dommage à l'épithélium, il est possible

de générer une réponse inflammatoire pulmonaire sévère de type Th17, contrairement aux dogmes actuels.

Dans le but de déterminer les conditions nécessaires à l'induction de ces cellules Th2/Th17 et de préciser le rôle des DCs SIRP α dans leur conversion, nous avons effectué une série d'études *in vitro*. Nous avons clairement démontré que les OVA-DC SIRP α générées *in vitro* à partir de cellules de moelle osseuse aussi bien que les DC SIRP α isolées des poumons inflammés sont capables de convertir des cellules Th17 polarisées en cellules Th2/Th17 (CD4⁺ IL-4⁺IL-13⁺IL-17⁺GATA3⁺). Les DCs sont par contre incapables de convertir les cellules Th2 polarisées en cellules Th2/Th17. La plasticité des cellules T effectrices est un concept récent. Depuis longtemps, la différenciation et l'engagement des cellules T vers l'une ou l'autre des lignées Th1 et Th2 étaient considérées comme irréversibles. La découverte des Th17 a remis en question cette théorie en raison de leur flexibilité. Un fois différenciées, les cellules Th17 peuvent en effet acquérir les propriétés Th1. Le passage de Th17 à Th2 n'a jusqu'à maintenant jamais été démontré mais plusieurs évidences permettent de croire que la conversion est possible (Annunziato and Romagnani, 2009; Zhu and Paul, 2010). C'est ce que nos résultats démontrent aussi.

Le schéma récapitulatif de la **Figure 12** résume les résultats *in vivo* que nous avons obtenus ainsi que nos hypothèses concernant le modèle d'inflammation pulmonaire sévère à composantes mixtes Th17/Th2.

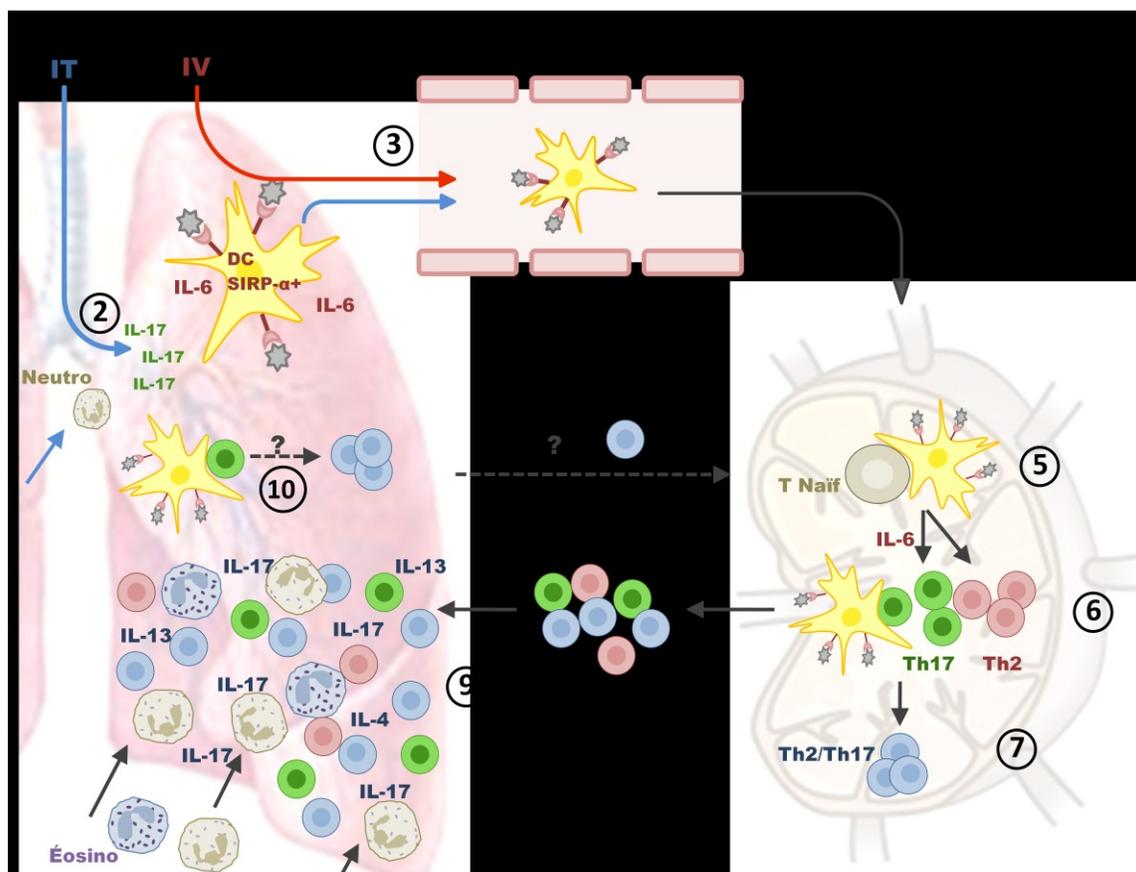


Figure 12 Schéma récapitulatif de l'inflammation pulmonaire sévère à composantes mixtes Th17/Th2.

Lors de l'administration intra-veineuse (IV) ou intra-trachéale (IT) de DCs SIRP α chargées d'antigènes, les DCs transitent par les poumons (1). L'injection IT induit en plus la production d'IL-17 par les cellules non Th17, qui attire rapidement les neutrophiles dans les poumons (2). Les DCs passent ensuite par la circulation lymphatique (3) pour migrer jusqu'aux ganglions médiastinaux (4), où elles présentent les antigènes aux cellules T naïves (5) qui se différencient en cellules Th2. La présence d'IL-6 produite par les DCs induit également différenciation de cellules Th17 (6). Les DCs SIRP α ont la capacité de convertir les cellules Th17 en cellules Th17/Th2 (7). Les cellules T migrent jusqu'aux poumons (8), où elles produisent de l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-17, qui attirent les éosinophiles, les neutrophiles et perpétuent l'inflammation (9). Il est possible que la conversion des cellules Th17 en Th17/Th2 ait lieu également dans les poumons (10) et que les cellules T mémoires retournent aux ganglions pour interagir avec les DCs (11).

3.4 DCs SIRP α ⁺ : Une cible thérapeutique?

Notre laboratoire et d'autres groupes avons démontré l'importance des DCs dans la pathophysiologie de l'asthme allergique et non-allergique expérimental, ce qui fait d'elles une cible de choix pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Toutefois, l'élimination complète des DCs des poumons d'un patient aurait de graves conséquences immunologiques. Alors que les DCs SIRP α sont immunogéniques, les autres populations de DCs sont nécessaires au maintien de la tolérance, à la régulation immunitaire locale ainsi qu'à la lutte contre les infections virales pulmonaires, d'où l'importance de nos découvertes. En effet, il a récemment été démontré que l'élimination du virus de l'influenza dans les poumons dépend des DCs CD103⁺ (GeurtsvanKessel et al., 2008). Évidemment, il est essentiel de cibler de sélectivement les DCs immunogéniques sans affecter les autres populations. C'est ce que nous proposons en ciblant l'axe CD47/SIRP α dans le traitement de l'inflammation pulmonaire. En plus d'être la sous-population immunogénique responsable de l'asthme allergique, les DCs SIRP α ⁺ sont capables de générer une inflammation mixte (éosinophiles/neutrophiles) sévère résistante aux corticostéroïdes associée à une réponse TH2/Th17. Cibler les DCs SIRP α ⁺ présente une avenue d'autant plus intéressante qu'elle permettrait de traiter plusieurs types d'asthme chez des patients à différents stades de sévérité. Il s'agirait d'un traitement sélectif, ciblant un marqueur exclusif, scénario idéal dans le développement d'une nouvelle thérapie pouvant renverser la maladie de façon définitive.

Plusieurs molécules capables de moduler les fonctions des DCs ont été décrites depuis quelques années et se sont avérées efficaces dans le traitement de l'asthme expérimental. Le sphingosine-1-phosphate, un phospholipide généré par les leukocytes et les plaquettes, module la migration cellulaire ainsi que la libération de cytokines et de chimiokines (Sawicka et al., 2003). z720, un agoniste du récepteur sphingosine-1-phosphate, prévient la migration des DCs des poumons aux ganglions drainants chez la

souris et par conséquent, la réponse Th2 spécifique à l'allergène. Cette molécule semble aussi interférer avec la formation d'une interaction stable de la DC avec la cellule T, étape nécessaire au développement subséquent de l'inflammation (Idzko et al., 2006). L'administration systémique du FTY720 manque toutefois de spécificité et retient les lymphocytes T et B dans les organes lymphoïdes secondaires, pouvant résulter en une lymphopénie périphérique (Graler and Goetzl, 2004; Wei et al., 2005). Bien qu'il ne semble pas causer un tel effet lorsqu'administré localement (intra-trachéalement), l'administration à long terme du FTY720 doit être étudiée avec attention. Le traitement avec l'iloprost, analogue de la prostacycline (PGI₂), prévient également le développement de l'inflammation des voies aériennes et l'hyperréactivité bronchique chez la souris en inhibant la maturation des DCs et en prévenant leur migration des poumons vers les ganglions. (Idzko et al., 2007; Zhou et al., 2007). L'agoniste du récepteur de prostaglandine D2 (BW245C) agit de façon similaire, inhibant la maturation et la migration des DCs pulmonaires, en plus d'induire la formation de cellules T régulatrices FOXP3⁺ (Hammad et al., 2003; Hammad et al., 2007). Ces molécules ciblent en effet différentes fonctions des DCs SIRP α et semblent efficaces chez la souris. Leur sélectivité reste toutefois à être vérifiée. Il est essentiel de conserver l'intégrité des autres populations de DCs, c'est-à-dire les pDCs et les DCs CD103⁻, qui jouent un rôle régulateur essentiel au bon fonctionnement immunitaire. Le développement de l'ostéopontine comme traitement potentiel de l'asthme en est un bon exemple. Administrée lors de la phase inductrice de la maladie, cette cytokine agit sur les DCs conventionnelles et améliore l'état inflammatoire alors qu'en phase effectrice, elle augmente les symptômes de l'asthme en agissant sur les DCs plasmacytoïdes (Xanthou et al., 2007). Nous avons donc exploité nos résultats de façon à cibler précisément les DCs SIRP α en manipulant l'axe CD47/SIRP α .

3.4.1 Traiter avec le CD47-Fc et le SIRP-Fc

Nos recherches se sont jusqu'à maintenant penchées sur le traitement de l'asthme allergique avec les protéines de fusion CD47Fc et SIRP α -Fc, qui semble très prometteur.

La contribution et la pathogénicité des DCs SIRP α dans l'inflammation pulmonaire Th17 nous permettent de croire en l'efficacité des molécules thérapeutiques également pour le traitement de l'asthme sévère. Ce concept reste toutefois à être démontré.

Les protéines de fusion CD47-Fc et le SIRP α -Fc utilisées pour nos expériences sont des chimères, construites avec la portion constante Fc mutée de l'IgG1 humaine de manière à réduire sa liaison au récepteur de l'IgG (Fc γ R) et le domaine d'interaction extracellulaire du CD47 ou du SIRP α murin. Dans le modèle d'asthme allergique, nos travaux ont démontré que le traitement avec le CD47-Fc ou le SIRP α -Fc administré au cours de l'immunisation réduit fortement l'inflammation pulmonaire, la production de cytokines par les cellules des ganglions médiastinaux et des poumons, ainsi que la réponse IgE spécifique à l'OVA.

Le CD47-Fc. Les expériences *in vitro* démontrent que le CD47-Fc n'agit pas sur l'interaction des DCs avec les T et n'influence pas la polarisation ou la fonction effectrice des cellules T. Nous proposons que le mode d'action de la molécule de fusion passe plutôt par l'inhibition de la migration des DCs SIRP α^+ , tel que démontré par la réduction sélective de ces cellules dans les ganglions des souris traitées en comparaison aux souris malades. Le modèle de transfert adoptif soutient également cette hypothèse, alors que la prolifération des cellules transgéniques marquées est réduite lorsque l'immunisation est précédée du traitement au CD47-Fc en raison d'un défaut de migration des DCs. D'ailleurs dans un autre modèle murin, la protéine de fusion injectée sous la peau interfère avec la fonction migratoire des DCs dermales, (Van et al., 2006). De plus, il a été démontré que le CD47-Fc inhibe la chimiotaxie des DCs *in vitro* et la migration des cellules Langerhans *in vivo* (Fukunaga et al., 2004; Van et al., 2006). Finalement, les DCs traitées au CD47-Fc avant injection induisent beaucoup moins efficacement la prolifération des cellules T transgéniques après transfert adoptif, réduisant d'un facteur de 10 le nombre de cellules T divisées.

Au cours du projet, un modèle de colite expérimentale a été exploité en parallèle au modèle d'asthme et nous avons obtenu des résultats aussi prometteurs. En effet, comme pour l'asthme, les souris CD47^{-/-} se sont avérées protégées contre la maladie. La protection est associée à un défaut de migration des DCs SIRPα⁺ et la molécule CD47-Fc prévient le développement de la colite en plus de traiter la maladie déjà établie. La réponse Th17 pathogène associée à la colite ainsi que l'activité des neutrophiles sont significativement réduites chez les souris traitées, arguments en faveur de l'efficacité du CD47-Fc dans notre modèle d'inflammation pulmonaire neutrophilique Th17. Cette hypothèse reste toutefois à être vérifiée.

Le SIRPα-Fc. L'administration du SIRPα-Fc semble également avoir un effet sur la migration des DCs immunogéniques, comme le montre l'expérience au cours de laquelle la prolifération des cellules T CD4 Tg est mesurée après immunisation en présence ou en absence de traitement. De façon complémentaire, un autre groupe a démontré que la liaison du CD47 par le SIRPα-Fc réduit l'hypersensibilité de contact *in vivo* chez la souris. De plus, la migration et la chimiotaxie des DCs de la peau sont inhibées *in vitro* tant par la molécule de fusion que par l'anticorps anti-CD47 (Yu et al., 2006).

Modes d'action. Le schéma récapitulatif suivant (**Figure 13**) montre l'interférence des molécules de fusion avec la migration des DCs au cours de l'asthme allergique. Bien que nous ayons démontré que les molécules de fusion interfèrent avec la migration des DCs SIRPα, nos résultats ne nous permettent pas de conclure quant au mode d'action précis. Le CD47-Fc pourrait donner un signal à SIRPα comme le fait le CD47, ou encore bloquer la liaison CD47/SIRPα. Par contre, étant donné que le traitement n'a pas d'effet additionnel sur la migration des DCs de la peau des souris CD47^{-/-}, il a été suggéré que l'interruption de l'interaction CD47/SIRPα plutôt que la transmission d'un signal négatif constituerait le mode d'action de la molécule de fusion (Van et al., 2006).

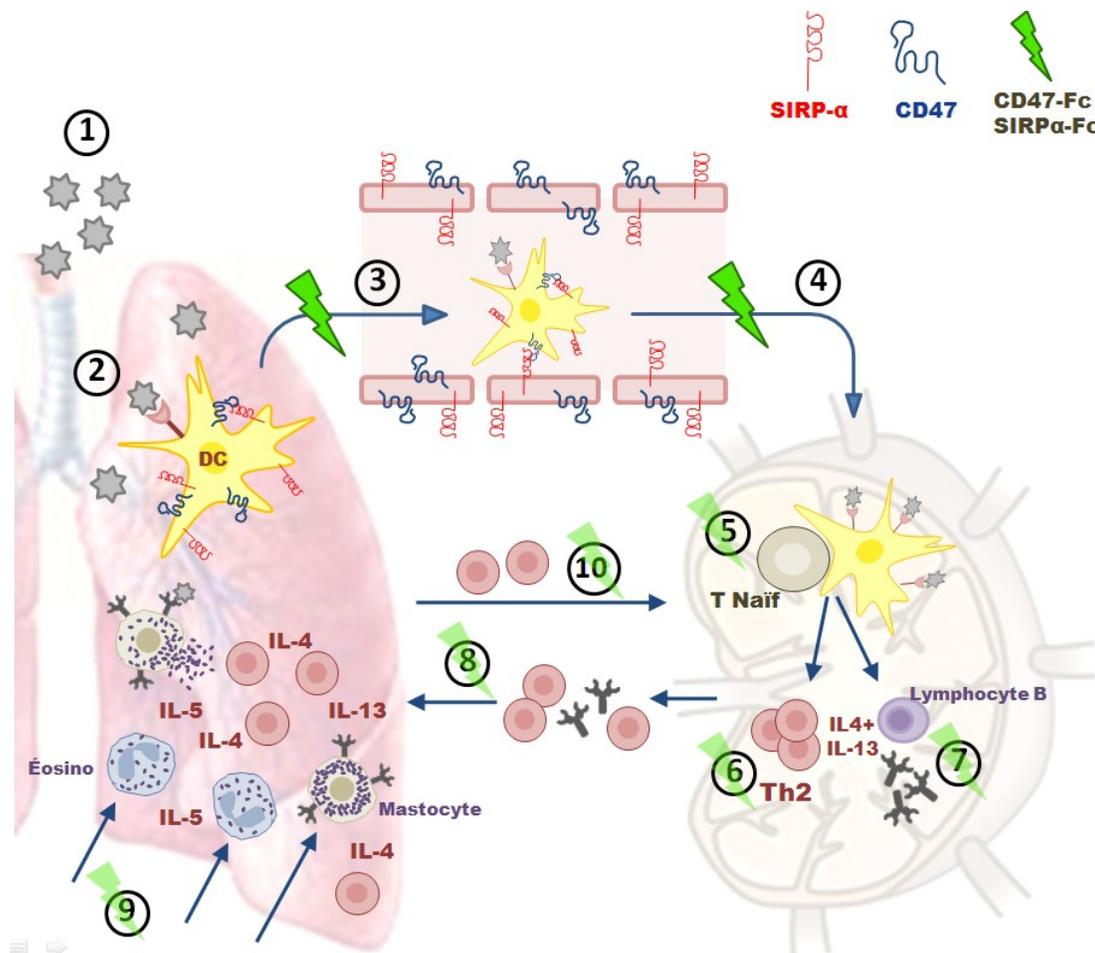


Figure 13 Schéma récapitulatif de l'asthme allergique et de l'interaction des molécules de fusion.

Chez une souris sensibilisée, l'allergène inhalé est capté par les DCs SIRP α (1) qui entrent dans la circulation lymphatique (2) pour migrer jusqu'aux mLNs (3), processus dépendant de l'expression de SIRP α et du CD47 à la surface de la DC. Dans les ganglions, les antigènes sont présentés aux cellules T naïves (5) qui se différencient en cellules Th2 et prolifèrent (6). Les cellules Th2 produisent de l'IL-4 et de l'IL-13 et induisent la production d'IgE par les cellules B (7). Les IgE et les cellules Th2 retournent aux poumons (8) où elles se lient aux récepteurs des mastocytes et produisent des cytokines. Des éosinophiles et d'autres cellules inflammatoires sont attirés dans les poumons (9), et amplifient l'inflammation. Les cellules T mémoires peuvent retourner aux ganglions et interagir avec les DCs (10). Le CD47-Fc et le SIRP α -Fc interfèrent avec la migration des DCs SIRP α et inhibent indirectement les étapes subséquentes (5 à 10).

De plus, la liaison entre le CD47 et le SIRP α dépend la conformation de ce dernier, déterminée par la présence d'un pont disulfure entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire (Rebres et al., 2001). Il est possible que la spécificité de la réponse des deux molécules de fusion dépende aussi de composantes conformationnelles. Des études moléculaires devront être faites pour élucider leurs modes d'action.

En plus des DCs SIRP α , il est possible que le traitement avec le CD47-Fc cible d'autres cellules SIRP α . Le pré-traitement des OVA-DCs SIRP α avec le CD47-Fc n'inhibe pas complètement l'inflammation pulmonaire normalement induite par les OVA-DCs, suggérant des effets mineurs additionnels du traitement. Nous ne pouvons exclure un effet sur les autres cellules myéloïdes SIRP α ⁺. Par contre, les effets s'avèreraient probablement bénéfiques puisque les cellules myéloïdes qui expriment le SIRP α (neutrophiles, mastocytes, monocytes, macrophages et DCs) contribuent à la pathophysiologie de la maladie. Le nombre de neutrophiles est en effet diminué dans le lavage broncho-alvéolaire des souris traitées avec la molécule de fusion. À savoir si l'effet est direct ou s'il est une conséquence de la réduction généralisée de l'inflammation n'a pas été abordé étant donné que les neutrophiles sont peu impliqués dans l'asthme classique. Il s'agit par contre d'un point important à considérer dans le traitement de l'asthme sévère neutrophilique. Un effet supplémentaire directement dirigé contre les neutrophiles serait sans doute bénéfique et favoriserait la guérison, vu leur implication dans l'inflammation pulmonaire sévère. Il est également possible que le CD47-Fc ait un effet additionnel sur la migration des DCs SIRP α en agissant sur les cellules endothéliales SIRP α ⁺.

Quant au SIRP α -Fc, son mode d'action reste à déterminer. Nos résultats montrent une inhibition de la migration des DCs SIRP α mais comme pour le CD47-Fc, nous ne pouvons exclure un effet sur d'autres cellules. Étant donné que la présence du CD47 à la surface

des cellules constitue un signal "don't eat me" (Liu et al., 2007), il est aussi possible que le SIRP α -Fc induise la mort des DCs SIRP α . Néanmoins, nos expériences exploitant les molécules de fusion CD47-Fc et SIRP α -Fc comme traitement prophylactique ont démontré qu'il est possible de manipuler sélectivement et efficacement la migration des DCs SIRP α et de contrôler la maladie via l'interaction CD47/SIRP α . Nos résultats démontrent également que les autres populations de DCs, plus précisément les DCs plasmacytoïdes et les DCs CD103⁺, ne sont pas affectées par le traitement et par conséquent, peuvent continuer à exercer leurs fonctions tolérogéniques et protectrices.

3.4.2 Des effets indésirables potentiels?

À première vue, le traitement avec l'une ou l'autre des molécules de fusion ne semble pas affecter l'état général de la souris. Nous avons démontré que les deux molécules affectent spécifiquement la migration des DCs SIRP α ⁺ et inhibent le développement de l'asthme allergique. Il est possible qu'à côté de ces effets bénéfiques, les traitements aient d'autres effets, pouvant interférer avec le développement d'un traitement éventuel.

D'une part le CD47-Fc se lie aux cellules SIRP α . Il a été démontré que la liaison *in vitro* de SIRP α à la surface des macrophages alvéolaires de rat par le CD47-Fc induit la production d'oxyde nitrique (Alblas et al., 2005), dont le rôle dans l'asthme semble controversé (Ashutosh, 2000; Barnes, 1996; Batra et al., 2007). La TSP constitue un autre ligand du CD47, bien que sa liaison par le CD47-Fc reste à être déterminée. Si cette liaison existe, il est difficile de prévoir son effet étant donné les rôles anti-inflammatoire et pro-inflammatoire de la TSP (Sarfati et al., 2008). Le traitement au CD47-Fc pourrait aussi interférer avec la liaison de SIRP α avec ses autres ligands, les surfactants. Ayant pour rôle de maintenir en veille les macrophages alvéolaires, l'interaction SIRP α -surfactant semble jouer un rôle régulateur en prévenant les dommages causés par ces

cellules dans les voies respiratoires (Barclay and Brown, 2006). Bien que l'administration intra-péritonéale du traitement ne semble pas affecter cette fonction, elle doit tout de même être prise en considération, particulièrement si la molécule de fusion est introduite directement par les voies respiratoires. Il est également possible que le traitement n'interrompe pas la liaison entre le SIRP α et le surfactant en raison de la haute avidité de l'interaction SIRP α -surfactant.

D'autre part le SIRP α -Fc se lie aux cellules exprimant le CD47, c'est-à-dire toutes les cellules. À première vue, il est invraisemblable de croire en un traitement qui cible toutes les cellules du corps humain. Étonnamment, ni les souris déficientes en CD47 ni les souris traitées au SIRP α -Fc ne présentent un inconfort ou un problème apparent. Le traitement semble sélectif à la migration des DCs SIRP α . Tel que discuté dans les modes d'action du traitement, il est possible que la liaison du SIRP-Fc avec le CD47 à la surface des cellules interfère avec le signal limitant la phagocytose. Un effet indésirable pourrait impliquer la mort non spécifique de populations cellulaires nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme et du système immunitaire.

3.4.3 De la souris à l'humain : Est-ce réaliste?

De manière objective, je crois qu'il est en effet réaliste de souhaiter traiter des patients en ciblant l'axe CD47/SIRP α , dans la mesure où le SIRP α constitue également un marqueur spécifique aux DCs immunogéniques chez l'humain. Les résultats obtenus chez la souris sont encourageants, bien que préliminaires à l'application d'une nouvelle thérapie chez l'humain. De plus, des études *in vitro* avec des cellules humaines ont démontré que le CD47-Fc prévient la maturation des DCs immatures, la production de cytokines par les DCs matures ainsi que la migration en réponse au TLR (Braun et al., 2006).

Plusieurs étapes devront encore être franchies avant de pouvoir passer de la souris à l'homme. Le traitement devra être étudié en détail chez la souris, de manière à évaluer sa toxicité et s'assurer que les molécules n'ont pas d'effets indésirables. En parallèle, les études *in vitro* chez l'humain devront démontrer l'efficacité et la spécificité du traitement. Les différences d'une espèce à l'autre devront être prises en considération et étudiées avec soin pour faciliter la transposition.

Le développement du CD47-Fc comme traitement a un avantage sur le SIRP α -Fc. La cible du CD47-Fc, le SIRP α , est exprimé de manière sélective alors que le SIRP α -Fc cible le CD47, une molécule ubiquitaire. Il est plus raisonnable de croire en un traitement sélectif. Le mode d'action des deux molécules de fusion reste toutefois à être vérifié et pourrait nous réserver des surprises.

4. CONCLUSIONS

4.1 Comment nos résultats contribuent à l'avancement des connaissances?

L'identification d'un marqueur spécifique à la surface des DCs CD103⁻ ainsi que son association à la pathogénèse de l'asthme approfondissent les connaissances générales dans le domaine des DCs en plus d'ouvrir la voie à de nouvelles avenues thérapeutiques. Il est en effet essentiel en pharmacologie d'interférer le plus précisément possible avec la cible d'intérêt de manière à ne pas perturber les autres mécanismes essentiels au bon fonctionnement du système immunitaire. Nous avons démontré que l'interaction CD47/SIRP α est impliquée dans la migration et l'immunogénicité des DCs CD103⁻SIRP α ⁺ et par conséquent, l'induction et le maintien de l'asthme allergique et sans doute non-allergique. De nombreux chercheurs ont élaboré des traitements avec des molécules qui interfèrent avec les DCs. Si ce n'est en ciblant directement l'axe CD47-SIRP α , nos résultats pourraient contribuer à la compréhension des mécanismes et au développement de ces traitements s'ils s'avéraient spécifiques pour les DCs SIRP α ⁺.

Contrairement aux croyances actuelles dans l'immunologie de l'asthme, nous avons démontré, à l'aide d'un modèle d'asthme non-allergique induit par voie intraveineuse, que l'activation des cellules épithéliales n'est pas nécessaire au développement de la maladie. Il est donc présomptueux de croire que le passage à travers l'épithélium bronchique est l'événement primaire à la base de toute inflammation des voies respiratoires. Ce concept pourrait expliquer des phénomènes inflammatoires pulmonaires observés dans d'autres contextes pathologiques en réponse à l'activation de DCs immunogéniques ailleurs dans l'organisme.

Les cellules Th2/Th17 ont récemment été associées à l'asthme sévère non-allergique. Nous avons démontré que les DCs SIRP α sont responsables du développement Th2/Th17 et nous avons identifié le mécanisme de leur conversion. Plusieurs évidences suggèrent une plasticité des cellules Th17 vers Th2, alors qu'elle n'a jamais été démontrée *in vivo*. Nos résultats renforcent le concept de flexibilité de la réponse immune associé à la capacité d'orchestrer un large spectre de réponse. Cette plasticité est nécessaire pour contrôler le développement d'une multitude de pathologies et l'invasion d'une grande variété de microorganismes mais est également responsable d'importants désordres immunitaires.

En conclusion, j'ose prétendre que les résultats de nos recherches auront un impact non seulement dans le domaine de l'asthme mais également dans la compréhension des mécanismes responsables de plusieurs autres désordres inflammatoires et au développement, souhaitons-le, de nouvelles thérapies.

4.2 Perspectives

Le passage des modèles murins à l'humain est une étape cruciale pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. C'est pourquoi il est primordial de trouver l'équivalent des DCs SIRP α chez l'humain. Mentionnons les DCs CD1a⁺CD14⁻ par exemple, caractérisées chez les patients atteints d'emphysème, qui pourraient constituer l'homologue humain de la population de DCs SIRP α ⁺ immunogénique. Il serait intéressant de vérifier si cette population cellulaire exprime le SIRP α . Des marquages pourraient également être faits sur des biopsies de poumons, des lavages bronchiques et du sang d'individus sains et asthmatiques. Au niveau de la souris, de plus amples études devront être effectuées pour déterminer les modes d'action moléculaires et cellulaires du CD47-Fc et du SIRP α -Fc. De plus, nos expériences se sont jusqu'à

maintenant penchées sur le traitement prophylactique mais il est évidemment irréaliste de croire qu'un traitement préventif contre l'asthme et les allergies puisse être donné d'emblée à tous les enfants. La prise en charge de la maladie au moment où elle apparaît semble plus raisonnable. C'est pourquoi l'étude du traitement de la maladie établie ainsi que des mécanismes impliqués sont primordiaux. L'efficacité des molécules pourrait également être optimisée grâce à des manipulations génétiques. Cibler différents épitopes pourrait permettre d'améliorer par exemple l'efficacité, l'immunogénicité, les fonctions, la demi-vie, la force de liaison, la stabilité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique. Finalement, la suite du projet implique ultimement de vérifier l'effet des molécules de fusion dans l'asthme sévère non-allergique.

Les études qui démontrent la conversion *in vivo* et *in vitro* des cellules Th17 en cellules Th17-Th2 doivent également être complétées. Entre autres, nous aimerions éclaircir le rôle que ces cellules jouent dans l'asthme sévère. Sont-elles pathogènes *in vivo*? Induisent-elles la maladie? Les cellules non T qui produisent l'IL-17 ainsi que leur rôle devraient aussi être identifiés.

Bien que nous ayons accumulé de nombreux résultats, beaucoup reste à faire. De nouveaux projets sont nés de chacun des résultats obtenus. Ainsi s'alimente la recherche et s'inspirent les chercheurs. J'orienterais personnellement la poursuite des travaux vers le développement d'un traitement chez l'humain puisqu'au bout de chaque projet de recherche, aussi fondamental soit-il, il y a un patient qui espère une meilleure qualité de vie.

Bibliographie

- Abraham, W.M. 1989. Pharmacology of allergen-induced early and late airway responses and antigen-induced airway hyperresponsiveness in allergic sheep. *Pulm Pharmacol* 2:33-40.
- Abraham, W.M., J.C. Delehunt, L. Yerger, and B. Marchette. 1983. Characterization of a late phase pulmonary response after antigen challenge in allergic sheep. *Am Rev Respir Dis* 128:839-844.
- Alblas, J., H. Honing, C.R. de Lavalette, M.H. Brown, C.D. Dijkstra, and T.K. van den Berg. 2005. Signal regulatory protein alpha ligation induces macrophage nitric oxide production through JAK/STAT- and phosphatidylinositol 3-kinase/Rac1/NAPDH oxidase/H₂O₂-dependent pathways. *Mol Cell Biol* 25:7181-7192.
- Alcorn, J.F., C.R. Crowe, and J.K. Kolls. 2010. TH17 cells in asthma and COPD. *Annu Rev Physiol* 72:495-516.
- Annunziato, F., and S. Romagnani. 2009. Heterogeneity of human effector CD4⁺ T cells. *Arthritis Res Ther* 11:257.
- Armant, M., M.N. Avice, P. Hermann, M. Rubio, M. Kiniwa, G. Delespesse, and M. Sarfati. 1999. CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production. *J Exp Med* 190:1175-1182.
- Arvaniti, F., K.N. Priftis, and D.B. Panagiotakos. 2010. Dietary habits and asthma: a review. *Allergy Asthma Proc* 31:e1-10.
- Ashutosh, K. 2000. Nitric oxide and asthma: a review. *Curr Opin Pulm Med* 6:21-25.
- Avice, M.N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 165:4624-4631.
- Avice, M.N., M. Rubio, M. Sergerie, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Role of CD47 in the induction of human naive T cell anergy. *J Immunol* 167:2459-2468.
- Banchereau, J., and R.M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
- Barclay, A.N., and M.H. Brown. 2006. The SIRP family of receptors and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 6:457-464.
- Barclay, A.N., and D. Hatherley. 2008. The counterbalance theory for evolution and function of paired receptors. *Immunity* 29:675-678.
- Barczyk, A., W. Pierzchala, and E. Sozanska. 2003. Interleukin-17 in sputum correlates with airway hyperresponsiveness to methacholine. *Respir Med* 97:726-733.
- Barnes, P.J. 1996. NO or no NO in asthma? *Thorax* 51:218-220.
- Barnes, P.J. 2004. New drugs for asthma. *Nat Rev Drug Discov* 3:831-844.
- Barnes, P.J. 2006. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 148:245-254.
- Barnes, P.J. 2008a. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 118:3546-3556.
- Barnes, P.J. 2008b. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 8:183-192.

- Barnes, P.J. 2009. Targeting the epigenome in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 6:693-696.
- Barnes, P.J., and I.M. Adcock. 1998. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 12:221-234.
- Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page. 1998. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50:515-596.
- Barrett, N.A., and K.F. Austen. 2009. Innate cells and T helper 2 cell immunity in airway inflammation. *Immunity* 31:425-437.
- Batra, J., R. Chatterjee, and B. Ghosh. 2007. Inducible nitric oxide synthase (iNOS): role in asthma pathogenesis. *Indian J Biochem Biophys* 44:303-309.
- Beaty, S.R., C.E. Rose, Jr., and S.S. Sung. 2007. Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178:1882-1895.
- Belyakov, I.M., S.A. Hammond, J.D. Ahlers, G.M. Glenn, and J.A. Berzofsky. 2004. Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 113:998-1007.
- Berry, M.A., B. Hargadon, M. Shelley, D. Parker, D.E. Shaw, R.H. Green, P. Bradding, C.E. Brightling, A.J. Wardlaw, and I.D. Pavord. 2006. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med* 354:697-708.
- Bettinelli, D., C. Kays, O. Bailliant, A. Capderou, P. Techoueyres, J.L. Lachaud, P. Vaida, and G. Miserocchi. 2002. Effect of gravity and posture on lung mechanics. *J Appl Physiol* 93:2044-2052.
- Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, and B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- Bogaert, P., K.G. Tournoy, T. Naessens, and J. Grooten. 2009. Where asthma and hypersensitivity pneumonitis meet and differ: noneosinophilic severe asthma. *Am J Pathol* 174:3-13.
- Bonasio, R., and U.H. von Andrian. 2006. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 18:503-511.
- Bouguermouh, S., V.Q. Van, J. Martel, P. Gautier, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. CD47 expression on T cell is a self-control negative regulator of type 1 immune response. *J Immunol* 180:8073-8082.
- Boutten, A., M. Bonay, S. Laribe, G. Leseche, Y. Castier, V. Lecon-Malas, M. Fournier, G. Durand, M. Aubier, M. Dehoux, and B. Crestani. 2004. Decreased expression of interleukin 13 in human lung emphysema. *Thorax* 59:850-854.
- Boyce, J.A., and K.F. Austen. 2005. No audible wheezing: nuggets and conundrums from mouse asthma models. *J Exp Med* 201:1869-1873.
- Braun, D., L. Galibert, T. Nakajima, H. Saito, V.V. Quang, M. Rubio, and M. Sarfati. 2006. Semimature stage: a checkpoint in a dendritic cell maturation program that allows for functional reversion after signal-regulatory protein-alpha ligation and maturation signals. *J Immunol* 177:8550-8559.
- Brenner, B.E., T.M. Holmes, B. Mazal, and C.A. Camargo, Jr. 2005. Relation between phase of the menstrual cycle and asthma presentations in the emergency department. *Thorax* 60:806-809.

- Brooke, G., J.D. Holbrook, M.H. Brown, and A.N. Barclay. 2004. Human lymphocytes interact directly with CD47 through a novel member of the signal regulatory protein (SIRP) family. *J Immunol* 173:2562-2570.
- Brown, E., L. Hooper, T. Ho, and H. Gresham. 1990. Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J Cell Biol* 111:2785-2794.
- Brown, E.J., and W.A. Frazier. 2001. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 11:130-135.
- Carvalho, L., J. Sun, C. Kane, F. Marshall, C. Krawczyk, and E.J. Pearce. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. *Immunology* 126:28-34.
- Cavanagh, L.L., R. Bonasio, I.B. Mazo, C. Halin, G. Cheng, A.W. van der Velden, A. Cariappa, C. Chase, P. Russell, M.N. Starnbach, P.A. Koni, S. Pillai, W. Weninger, and U.H. von Andrian. 2005. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 6:1029-1037.
- Cazzola, M., and R. Polosa. 2006. Anti-TNF-alpha and Th1 cytokine-directed therapies for the treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6:43-50.
- Chang, H.P., F.P. Lindberg, H.L. Wang, A.M. Huang, and E.H. Lee. 1999. Impaired memory retention and decreased long-term potentiation in integrin-associated protein-deficient mice. *Learn Mem* 6:448-457.
- Chaudhuri, R., E. Livingston, A.D. McMahon, L. Thomson, W. Borland, and N.C. Thomson. 2003. Cigarette smoking impairs the therapeutic response to oral corticosteroids in chronic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1308-1311.
- Chen, H., M.E. Herndon, and J. Lawler. 2000. The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biol* 19:597-614.
- Chroneos, Z.C., Z. Sever-Chroneos, and V.L. Shepherd. 2010. Pulmonary surfactant: an immunological perspective. *Cell Physiol Biochem* 25:13-26.
- Coffman, R.L., and E.M. Hessel. 2005. Nonhuman primate models of asthma. *J Exp Med* 201:1875-1879.
- Conrad, M.L., R. Ferstl, R. Teich, S. Brand, N. Blumer, A.O. Yildirim, C.C. Patrascan, A. Hanuszkiewicz, S. Akira, H. Wagner, O. Holst, E. von Mutius, P.I. Pfefferle, C.J. Kirschning, H. Garn, and H. Renz. 2009. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. *J Exp Med* 206:2869-2877.
- Corry, D.B., and F. Kheradmand. 2006. 7. Control of allergic airway inflammation through immunomodulation. *J Allergy Clin Immunol* 117:S461-464.
- Cosio, M.G., M. Saetta, and A. Agusti. 2009. Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 360:2445-2454.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 125:222-230 e221-224.

- Cox, G. 1995. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 154:4719-4725.
- Cua, D.J., and C.M. Tato. 2010. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 10:479-489.
- Currie, G.P., D.K. Lee, and P. Srivastava. 2005. Long-acting bronchodilator or leukotriene modifier as add-on therapy to inhaled corticosteroids in persistent asthma? *Chest* 128:2954-2962.
- de Heer, H.J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M.A. Willart, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200:89-98.
- de Vries, H.E., J.J. Hendriks, H. Honing, C.R. De Lavalette, S.M. van der Pol, E. Hooijberg, C.D. Dijkstra, and T.K. van den Berg. 2002. Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol* 168:5832-5839.
- de Weck, A.L., P. Mayer, B. Stumper, B. Schiessl, and L. Pickart. 1997. Dog allergy, a model for allergy genetics. *Int Arch Allergy Immunol* 113:55-57.
- del Rio, M.L., J.I. Rodriguez-Barbosa, E. Kremmer, and R. Forster. 2007. CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 178:6861-6866.
- Delgado, J., P. Barranco, and S. Quirce. 2008. Obesity and asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol* 18:420-425.
- Demeure, C.E., H. Tanaka, V. Mateo, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2000. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 164:2193-2199.
- Desai, D., and C. Brightling. 2009. Cytokine and anti-cytokine therapy in asthma: ready for the clinic? *Clin Exp Immunol* 158:10-19.
- Devereux, G. 2006. The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 6:869-874.
- Diaz-Sanchez, D., R. Rumold, and H. Gong, Jr. 2006. Challenge with environmental tobacco smoke exacerbates allergic airway disease in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 118:441-446.
- Dietrich, J., M. Cella, M. Seiffert, H.J. Buhring, and M. Colonna. 2000. Cutting edge: signal-regulatory protein beta 1 is a DAP12-associated activating receptor expressed in myeloid cells. *J Immunol* 164:9-12.
- Djukanovic, R., S.J. Wilson, M. Kraft, N.N. Jarjour, M. Steel, K.F. Chung, W. Bao, A. Fowler-Taylor, J. Matthews, W.W. Busse, S.T. Holgate, and J.V. Fahy. 2004. Effects of treatment with anti-immunoglobulin E antibody omalizumab on airway inflammation in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 170:583-593.
- Dolan, C.M., K.E. Fraher, E.R. Bleecker, L. Borish, B. Chipps, M.L. Hayden, S. Weiss, B. Zheng, C. Johnson, and S. Wenzel. 2004. Design and baseline characteristics of the epidemiology and natural history of asthma: Outcomes and Treatment Regimens (TENOR) study: a large cohort of patients with severe or difficult-to-treat asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 92:32-39.

- Doyen, V., M. Rubio, D. Braun, T. Nakajima, J. Abe, H. Saito, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2003. Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation. *J Exp Med* 198:1277-1283.
- Dugas, V., C. Beauchamp, G. Chabot-Roy, E.E. Hillhouse, and S. Lesage. 2010. Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*
- Eisenbarth, S.C., D.A. Piggott, J.W. Huleatt, I. Visintin, C.A. Herrick, and K. Bottomly. 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med* 196:1645-1651.
- Feuerer, M., J.A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2009. Foxp3⁺ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol* 10:689-695.
- Finkelman, F.D., S.P. Hogan, G.K. Hershey, M.E. Rothenberg, and M. Wills-Karp. 2010. Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J Immunol* 184:1663-1674.
- Finkelman, F.D., and M. Wills-Karp. 2008. Usefulness and optimization of mouse models of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 121:603-606.
- Flohr, C., R.J. Quinnell, and J. Britton. 2009. Do helminth parasites protect against atopy and allergic disease? *Clin Exp Allergy* 39:20-32.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
- Fortin, G., M. Raymond, V.Q. Van, M. Rubio, P. Gautier, M. Sarfati, and D. Franchimont. 2009. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103⁻ dendritic cells. *J Exp Med* 206:1995-2011.
- Fujioka, Y., T. Matozaki, T. Noguchi, A. Iwamatsu, T. Yamao, N. Takahashi, M. Tsuda, T. Takada, and M. Kasuga. 1996. A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. *Mol Cell Biol* 16:6887-6899.
- Fukunaga, A., H. Nagai, T. Noguchi, H. Okazawa, T. Matozaki, X. Yu, C.F. Lagenaur, N. Honma, M. Ichihashi, M. Kasuga, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2004. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the migration of Langerhans cells from the epidermis to draining lymph nodes. *J Immunol* 172:4091-4099.
- Fukunaga, A., H. Nagai, X. Yu, S. Oniki, H. Okazawa, S. Motegi, R. Suzuki, N. Honma, T. Matozaki, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2006. Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1 regulates the induction of Langerhans cell maturation. *Eur J Immunol* 36:3216-3226.
- Galli, S.J., M. Grimaldeston, and M. Tsai. 2008a. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* 8:478-486.
- Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky. 2008b. The development of allergic inflammation. *Nature* 454:445-454.
- Gardai, S.J., Y.Q. Xiao, M. Dickinson, J.A. Nick, D.R. Voelker, K.E. Greene, and P.M. Henson. 2003. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115:13-23.
- Geha, R.S., H.H. Jabara, and S.R. Brodeur. 2003. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 3:721-732.

- GeurtsvanKessel, C.H., M.A. Willart, I.M. Bergen, L.S. van Rijt, F. Muskens, D. Elewaut, A.D. Osterhaus, R. Hendriks, G.F. Rimmelzwaan, and B.N. Lambrecht. 2009. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med* 206:2339-2349.
- GeurtsvanKessel, C.H., M.A. Willart, L.S. van Rijt, F. Muskens, M. Kool, C. Baas, K. Thielemans, C. Bennett, B.E. Clausen, H.C. Hoogsteden, A.D. Osterhaus, G.F. Rimmelzwaan, and B.N. Lambrecht. 2008. Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205:1621-1634.
- Gill, N., M. Wlodarska, and B.B. Finlay. 2010. The future of mucosal immunology: studying an integrated system-wide organ. *Nat Immunol* 11:558-560.
- GINA, S.R. 2009. www.ginasthma.org.
- Ginhoux, F., K. Liu, J. Helft, M. Bogunovic, M. Greter, D. Hashimoto, J. Price, N. Yin, J. Bromberg, S.A. Lira, E.R. Stanley, M. Nussenzweig, and M. Merad. 2009. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med* 206:3115-3130.
- Goldstein, M.F., J.J. Fallon, Jr., and R. Harning. 1999. Chronic glucocorticoid therapy-induced osteoporosis in patients with obstructive lung disease. *Chest* 116:1733-1749.
- Gould, H.J., and B.J. Sutton. 2008. IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8:205-217.
- Graler, M.H., and E.J. Goetzl. 2004. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 18:551-553.
- Grimbert, P., S. Bouguermouh, N. Baba, T. Nakajima, Z. Allakhverdi, D. Braun, H. Saito, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2006. Thrombospondin/CD47 interaction: a pathway to generate regulatory T cells from human CD4+ CD25- T cells in response to inflammation. *J Immunol* 177:3534-3541.
- Grumelli, S., D.B. Corry, L.Z. Song, L. Song, L. Green, J. Huh, J. Hacken, R. Espada, R. Bag, D.E. Lewis, and F. Kheradmand. 2004. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med* 1:e8.
- Hagnerud, S., P.P. Manna, M. Cella, A. Stenberg, W.A. Frazier, M. Colonna, and P.A. Oldenborg. 2006. Deficit of CD47 results in a defect of marginal zone dendritic cells, blunted immune response to particulate antigen and impairment of skin dendritic cell migration. *J Immunol* 176:5772-5778.
- Haldar, P., C.E. Brightling, B. Hargadon, S. Gupta, W. Monteiro, A. Sousa, R.P. Marshall, P. Bradding, R.H. Green, A.J. Wardlaw, and I.D. Pavord. 2009. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 360:973-984.
- Hammad, H., M. Chieppa, F. Perros, M.A. Willart, R.N. Germain, and B.N. Lambrecht. 2009. House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15:410-416.
- Hammad, H., H.J. de Heer, T. Soullie, H.C. Hoogsteden, F. Trottein, and B.N. Lambrecht. 2003. Prostaglandin D2 inhibits airway dendritic cell migration and function in steady state conditions by selective activation of the D prostanoid receptor 1. *J Immunol* 171:3936-3940.

- Hammad, H., M. Kool, T. Soullie, S. Narumiya, F. Trottein, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2007. Activation of the D prostanoid 1 receptor suppresses asthma by modulation of lung dendritic cell function and induction of regulatory T cells. *J Exp Med* 204:357-367.
- Hammad, H., and B.N. Lambrecht. 2007. Lung dendritic cell migration. *Adv Immunol* 93:265-278.
- Hammad, H., and B.N. Lambrecht. 2008. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol* 8:193-204.
- Hansen, G., G. Berry, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 103:175-183.
- Happel, K.I., P.J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L.J. Quinton, A.R. Odden, J.E. Shellito, G.J. Bagby, S. Nelson, and J.K. Kolls. 2005. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* 202:761-769.
- Harnett, W., and M.M. Harnett. 2010. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol* 10:278-284.
- Harrison, T.W., J. Osborne, S. Newton, and A.E. Tattersfield. 2004. Doubling the dose of inhaled corticosteroid to prevent asthma exacerbations: randomised controlled trial. *Lancet* 363:271-275.
- He, R., H.Y. Kim, J. Yoon, M.K. Oyoshi, A. MacGinnitie, S. Goya, E.J. Freyschmidt, P. Bryce, A.N. McKenzie, D.T. Umetsu, H.C. Oettgen, and R.S. Geha. 2009. Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 124:761-770 e761.
- Hegazy, A.N., M. Peine, C. Helmstetter, I. Panse, A. Frohlich, A. Bergthaler, L. Flatz, D.D. Pinschewer, A. Radbruch, and M. Lohning. 2010. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* 32:116-128.
- Herrick, C.A., and K. Bottomly. 2003. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol* 3:405-412.
- Hintzen, G., L. Ohl, M.L. del Rio, J.I. Rodriguez-Barbosa, O. Pabst, J.R. Kocks, J. Krege, S. Hardtke, and R. Forster. 2006. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J Immunol* 177:7346-7354.
- Hogan, S.P., H.F. Rosenberg, R. Moqbel, S. Phipps, P.S. Foster, P. Lacy, A.B. Kay, and M.E. Rothenberg. 2008. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 38:709-750.
- Hogg, J.C. 2004. Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364:709-721.
- Holgate, S.T. 2007. Epithelium dysfunction in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 120:1233-1244; quiz 1245-1236.
- Holgate, S.T. 2008. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 38:872-897.
- Holgate, S.T., and D.E. Davies. 2009. Rethinking the pathogenesis of asthma. *Immunity* 31:362-367.

- Holgate, S.T., and R. Polosa. 2006. The mechanisms, diagnosis, and management of severe asthma in adults. *Lancet* 368:780-793.
- Holgate, S.T., and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8:218-230.
- Hollingsworth, J.W., S. Maruoka, K. Boon, S. Garantziotis, Z. Li, J. Tomfohr, N. Bailey, E.N. Potts, G. Whitehead, D.M. Brass, and D.A. Schwartz. 2008. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 118:3462-3469.
- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Hoshino, A., Y. Tanaka, H. Akiba, Y. Asakura, Y. Mita, T. Sakurai, A. Takaoka, S. Nakaike, N. Ishii, K. Sugamura, H. Yagita, and K. Okumura. 2003. Critical role for OX40 ligand in the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *Eur J Immunol* 33:861-869.
- Hotez, P.J., P.J. Brindley, J.M. Bethony, C.H. King, E.J. Pearce, and J. Jacobson. 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118:1311-1321.
- Huang, S.W., and K.J. Kao. 1993. The relationship between plasma thrombospondin level and the clinical course of atopic dermatitis. *Allergy Proc* 14:357-361.
- Huang, S.W., K.J. Kao, and W.M. Abraham. 1996. Plasma thrombospondin levels in sheep with allergic asthma. *Chest* 109:1614-1617.
- Humrich, J.Y., J.H. Humrich, M. Averbeck, P. Thumann, C. Termeer, E. Kampgen, G. Schuler, and L. Jenne. 2006. Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration. *Immunology* 117:238-247.
- Hyde, D.M., Q. Hamid, and C.G. Irvin. 2009. Anatomy, pathology, and physiology of the tracheobronchial tree: emphasis on the distal airways. *J Allergy Clin Immunol* 124:S72-77.
- Ide, K., H. Wang, H. Tahara, J. Liu, X. Wang, T. Asahara, M. Sykes, Y.G. Yang, and H. Ohdan. 2007. Role for CD47-SIRPalpha signaling in xenograft rejection by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:5062-5066.
- Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, T. Muller, T. Soullie, M.A. Willart, D. Hijdra, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2006. Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *J Clin Invest* 116:2935-2944.
- Idzko, M., H. Hammad, M. van Nimwegen, M. Kool, N. Vos, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2007. Inhaled iloprost suppresses the cardinal features of asthma via inhibition of airway dendritic cell function. *J Clin Invest* 117:464-472.
- Ilowite, J.S., W.D. Bennett, M.S. Sheetz, M.L. Groth, and D.M. Nierman. 1989. Permeability of the bronchial mucosa to ^{99m}Tc-DTPA in asthma. *Am Rev Respir Dis* 139:1139-1143.
- Infante-Duarte, C., H.F. Horton, M.C. Byrne, and T. Kamradt. 2000. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165:6107-6115.
- Itano, A.A., S.J. McSorley, R.L. Reinhardt, B.D. Ehst, E. Ingulli, A.Y. Rudensky, and M.K. Jenkins. 2003. Distinct dendritic cell populations sequentially present

- antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity* 19:47-57.
- Ito, T., M. Yang, Y.H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O.A. Perng, X.F. Qin, Y.J. Liu, and M. Gilliet. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 204:105-115.
- Jackson, D.J., and S.L. Johnston. 2010. The role of viruses in acute exacerbations of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 125:1178-1187; quiz 1188-1179.
- Jacobsen, E.A., S.I. Ochkur, R.S. Pero, A.G. Taranova, C.A. Protheroe, D.C. Colbert, N.A. Lee, and J.J. Lee. 2008. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. *J Exp Med* 205:699-710.
- Jahnsen, F.L., E.D. Moloney, T. Hogan, J.W. Upham, C.M. Burke, and P.G. Holt. 2001. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax* 56:823-826.
- Jakubzick, C., F. Tacke, J. Llodra, N. van Rooijen, and G.J. Randolph. 2006. Modulation of dendritic cell trafficking to and from the airways. *J Immunol* 176:3578-3584.
- James, A.L., L.J. Palmer, E. Kicic, P.S. Maxwell, S.E. Lagan, G.F. Ryan, and A.W. Musk. 2005. Decline in lung function in the Busselton Health Study: the effects of asthma and cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 171:109-114.
- Jeong, S.K., H.J. Kim, J.K. Youm, S.K. Ahn, E.H. Choi, M.H. Sohn, K.E. Kim, J.H. Hong, D.M. Shin, and S.H. Lee. 2008. Mite and cockroach allergens activate protease-activated receptor 2 and delay epidermal permeability barrier recovery. *J Invest Dermatol* 128:1930-1939.
- Karol, M.H. 1994. Animal models of occupational asthma. *Eur Respir J* 7:555-568.
- Kato, A., and R.P. Schleimer. 2007. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 19:711-720.
- Kauffman, H.F., M. Tamm, J.A. Timmerman, and P. Borger. 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.
- King, C., S.G. Tangye, and C.R. Mackay. 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol* 26:741-766.
- Kool, M., T. Soullie, M. van Nimwegen, M.A. Willart, F. Muskens, S. Jung, H.C. Hoogsteden, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2008. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205:869-882.
- Krishnamoorthy, N., T.B. Oriss, M. Paglia, M. Fei, M. Yarlagadda, B. Vanhaesebroeck, A. Ray, and P. Ray. 2008. Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* 14:565-573.
- Krug, N., J. Madden, A.E. Redington, P. Lackie, R. Djukanovic, U. Schauer, S.T. Holgate, A.J. Frew, and P.H. Howarth. 1996. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:319-326.
- Kuipers, H., and B.N. Lambrecht. 2004. The interplay of dendritic cells, Th2 cells and regulatory T cells in asthma. *Curr Opin Immunol* 16:702-708.

- Kumar, R.K., and P.S. Foster. 2002. Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27:267-272.
- Kumar, R.K., D.C. Webb, C. Herbert, and P.S. Foster. 2006. Interferon-gamma as a possible target in chronic asthma. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5:253-256.
- Laan, M., Z.H. Cui, H. Hoshino, J. Lotvall, M. Sjostrand, D.C. Gruenert, B.E. Skoogh, and A. Linden. 1999. Neutrophil recruitment by human IL-17 via C-X-C chemokine release in the airways. *J Immunol* 162:2347-2352.
- Lambrecht, B.N., M. De Veerman, A.J. Coyle, J.C. Gutierrez-Ramos, K. Thielemans, and R.A. Pauwels. 2000. Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 106:551-559.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 3:994-1003.
- Lambrecht, B.N., and H. Hammad. 2009. Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31:412-424.
- Lambrecht, B.N., M. Kool, M.A. Willart, and H. Hammad. 2009. Mechanism of action of clinically approved adjuvants. *Curr Opin Immunol* 21:23-29.
- Lammas, D.A., J.L. Casanova, and D.S. Kumararatne. 2000. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-gamma) pathway. *Clin Exp Immunol* 121:417-425.
- Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Latour, S., H. Tanaka, C. Demeure, V. Mateo, M. Rubio, E.J. Brown, C. Maliszewski, F.P. Lindberg, A. Oldenborg, A. Ullrich, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2001. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. *J Immunol* 167:2547-2554.
- Lee, Y.K., H. Turner, C.L. Maynard, J.R. Oliver, D. Chen, C.O. Elson, and C.T. Weaver. 2009. Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* 30:92-107.
- Lehrer, P., J. Feldman, N. Giardino, H.S. Song, and K. Schmaling. 2002. Psychological aspects of asthma. *J Consult Clin Psychol* 70:691-711.
- Lemiere, C., J.L. Malo, and M. Boutet. 1997. Reactive airways dysfunction syndrome due to chlorine: sequential bronchial biopsies and functional assessment. *Eur Respir J* 10:241-244.
- Lewis-Tuffin, L.J., and J.A. Cidlowski. 2006. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069:1-9.
- Lex, C., F. Ferreira, A. Zacharasiewicz, A.G. Nicholson, P.L. Haslam, N.M. Wilson, T.T. Hansel, D.N. Payne, and A. Bush. 2006. Airway eosinophilia in children with severe asthma: predictive values of noninvasive tests. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1286-1291.
- Lexberg, M.H., A. Taubner, A. Forster, I. Albrecht, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, and H.D. Chang. 2008. Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. *Eur J Immunol* 38:2654-2664.

- Li, L., Y. Xia, A. Nguyen, Y.H. Lai, L. Feng, T.R. Mosmann, and D. Lo. 1999. Effects of Th2 cytokines on chemokine expression in the lung: IL-13 potently induces eotaxin expression by airway epithelial cells. *J Immunol* 162:2477-2487.
- Lindberg, F.P., D.C. Bullard, T.E. Caver, H.D. Gresham, A.L. Beaudet, and E.J. Brown. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science* 274:795-798.
- Lindberg, F.P., H.D. Gresham, E. Schwarz, and E.J. Brown. 1993. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 123:485-496.
- Linhart, B., S. Bigenzahn, A. Hartl, C. Lupinek, J. Thalhamer, R. Valenta, and T. Wekerle. 2007. Costimulation blockade inhibits allergic sensitization but does not affect established allergy in a murine model of grass pollen allergy. *J Immunol* 178:3924-3931.
- Liu, Y., Q. Tong, Y. Zhou, H.W. Lee, J.J. Yang, H.J. Buhning, Y.T. Chen, B. Ha, C.X. Chen, Y. Yang, and K. Zen. 2007. Functional elements on SIRPalpha IgV domain mediate cell surface binding to CD47. *J Mol Biol* 365:680-693.
- Lombardi, V., A.K. Singh, and O. Akbari. 2010. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 151:179-189.
- Maestrelli, P., P. Boschetto, L.M. Fabbri, and C.E. Mapp. 2009. Mechanisms of occupational asthma. *J Allergy Clin Immunol* 123:531-542; quiz 543-534.
- Martin-Fontecha, A., D. Baumjohann, G. Guarda, A. Reboldi, M. Hons, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2008. CD40L+ CD4+ memory T cells migrate in a CD62P-dependent fashion into reactive lymph nodes and license dendritic cells for T cell priming. *J Exp Med* 205:2561-2574.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U.E. Hopken, M. Ugucioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 198:615-621.
- Matera, M.G., L. Calzetta, and M. Cazzola. 2010. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: we must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther* 23:121-128.
- Matozaki, T., Y. Murata, H. Okazawa, and H. Ohnishi. 2009. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol* 19:72-80.
- Maurer, D., E. Fiebiger, B. Reininger, C. Ebner, P. Petzelbauer, G.P. Shi, H.A. Chapman, and G. Stingl. 1998. Fc epsilon receptor I on dendritic cells delivers IgE-bound multivalent antigens into a cathepsin S-dependent pathway of MHC class II presentation. *J Immunol* 161:2731-2739.
- McKinley, L., J.F. Alcorn, A. Peterson, R.B. Dupont, S. Kapadia, A. Logar, A. Henry, C.G. Irvin, J.D. Piganelli, A. Ray, and J.K. Kolls. 2008. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 181:4089-4097.
- Medoff, B.D., E. Seung, S. Hong, S.Y. Thomas, B.P. Sandall, J.S. Duffield, D.A. Kuperman, D.J. Erle, and A.D. Luster. 2009. CD11b+ myeloid cells are the key

- mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol* 182:623-635.
- Mellman, I., and R.M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
- Mills, K.H. 2008. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol* 38:2636-2649.
- Moore, W.C., D.A. Meyers, S.E. Wenzel, W.G. Teague, H. Li, X. Li, R. D'Agostino, Jr., M. Castro, D. Curran-Everett, A.M. Fitzpatrick, B. Gaston, N.N. Jarjour, R. Sorkness, W.J. Calhoun, K.F. Chung, S.A. Comhair, R.A. Dweik, E. Israel, S.P. Peters, W.W. Busse, S.C. Erzurum, and E.R. Bleeker. 2010. Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the Severe Asthma Research Program. *Am J Respir Crit Care Med* 181:315-323.
- Morishima, Y., A. Nomura, Y. Uchida, Y. Noguchi, T. Sakamoto, Y. Ishii, Y. Goto, K. Masuyama, M.J. Zhang, K. Hirano, M. Mochizuki, M. Ohtsuka, and K. Sekizawa. 2001. Triggering the induction of myofibroblast and fibrogenesis by airway epithelial shedding. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:1-11.
- Morjaria, J.B., A.J. Chauhan, K.S. Babu, R. Polosa, D.E. Davies, and S.T. Holgate. 2008. The role of a soluble TNFalpha receptor fusion protein (etanercept) in corticosteroid refractory asthma: a double blind, randomised, placebo controlled trial. *Thorax* 63:584-591.
- Motegi, S., H. Okazawa, H. Ohnishi, R. Sato, Y. Kaneko, H. Kobayashi, K. Tomizawa, T. Ito, N. Honma, H.J. Buhning, O. Ishikawa, and T. Matozaki. 2003. Role of the CD47-SHPS-1 system in regulation of cell migration. *EMBO J* 22:2634-2644.
- Munitz, A., E.B. Brandt, M. Mingler, F.D. Finkelman, and M.E. Rothenberg. 2008. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7240-7245.
- Murphy, K.M., and S.L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933-944.
- Nagashima, O., N. Harada, Y. Usui, T. Yamazaki, H. Yagita, K. Okumura, K. Takahashi, and H. Akiba. 2008. B7-H3 contributes to the development of pathogenic Th2 cells in a murine model of asthma. *J Immunol* 181:4062-4071.
- Nakae, S., S. Saijo, R. Horai, K. Sudo, S. Mori, and Y. Iwakura. 2003. 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.
- Nakae, S., H. Suto, G.J. Berry, and S.J. Galli. 2007. Mast cell-derived TNF can promote Th17 cell-dependent neutrophil recruitment in ovalbumin-challenged OTII mice. *Blood* 109:3640-3648.
- Nembrini, C., B.J. Marsland, and M. Kopf. 2009. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123:986-994; quiz 995-986.
- Nolte, M.A., S. Leibundgut-Landmann, O. Joffre, and C. Reis e Sousa. 2007. Dendritic cell quiescence during systemic inflammation driven by LPS stimulation of radioresistant cells in vivo. *J Exp Med* 204:1487-1501.
- O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7:425-428.

- Oboki, K., T. Ohno, H. Saito, and S. Nakae. 2008. Th17 and allergy. *Allergol Int* 57:121-134.
- OMS. 2008. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/fr/index.html.
- OMS, S. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/fr/index.html.
- Ozdemir, O. 2010. Any benefits of probiotics in allergic disorders? *Allergy Asthma Proc* 31:103-111.
- Parkos, C.A., S.P. Colgan, T.W. Liang, A. Nusrat, A.E. Bacarra, D.K. Carnes, and J.L. Madara. 1996. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 132:437-450.
- Paul, W.E., and J. Zhu. 2010. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol* 10:225-235.
- Peden, D., and C.E. Reed. 2010. Environmental and occupational allergies. *J Allergy Clin Immunol* 125:S150-160.
- Pepper, M., J.L. Linehan, A.J. Pagan, T. Zell, T. Dileepan, P.P. Cleary, and M.K. Jenkins. 2010. Different routes of bacterial infection induce long-lived TH1 memory cells and short-lived TH17 cells. *Nat Immunol* 11:83-89.
- Perrigoue, J.G., S.A. Saenz, M.C. Siracusa, E.J. Allenspach, B.C. Taylor, P.R. Giacomin, M.G. Nair, Y. Du, C. Zaph, N. van Rooijen, M.R. Comeau, E.J. Pearce, T.M. Laufer, and D. Artis. 2009. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol* 10:697-705.
- Peters, M., K. Dudziak, M. Stiehm, and A. Bufe. 2010. T-cell polarization depends on concentration of the danger signal used to activate dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 88:537-544.
- Piccio, L., W. Vermi, K.S. Boles, A. Fuchs, C.A. Strader, F. Facchetti, M. Cella, and M. Colonna. 2005. Adhesion of human T cells to antigen-presenting cells through SIRPbeta2-CD47 interaction costimulates T-cell proliferation. *Blood* 105:2421-2427.
- Placek, K., M. Coffre, S. Maiella, E. Bianchi, and L. Rogge. 2009. Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. *Immunology* 127:155-162.
- Polte, T., A.K. Behrendt, and G. Hansen. 2006. Direct evidence for a critical role of CD30 in the development of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 118:942-948.
- Polte, T., L. Fuchs, A.K. Behrendt, and G. Hansen. 2009. Different role of CD30 in the development of acute and chronic airway inflammation in a murine asthma model. *Eur J Immunol* 39:1736-1742.
- Rabe, K.F., S. Hurd, A. Anzueto, P.J. Barnes, S.A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. van Weel, and J. Zielinski. 2007. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176:532-555.
- Rackemann, F.M. 1947. A working classification of asthma. *Am J Med* 3:601-606.
- Randolph, G.J., V. Angeli, and M.A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 5:617-628.

- Raugi, G.J., J.E. Olerud, and A.M. Gown. 1987. Thrombospondin in early human wound tissue. *J Invest Dermatol* 89:551-554.
- Ray, A., A. Khare, N. Krishnamoorthy, Z. Qi, and P. Ray. 2010. Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal Immunol* 3:216-229.
- Raymond, M., M. Rubio, G. Fortin, K.H. Shalaby, H. Hammad, B.N. Lambrecht, and M. Sarfati. 2009. Selective control of SIRP-alpha-positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of T(H)2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 124:1333-1342 e1331.
- Rebres, R.A., L.E. Vaz, J.M. Green, and E.J. Brown. 2001. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *J Biol Chem* 276:34607-34616.
- Redlich, C.A., and C.A. Herrick. 2008. Lung/skin connections in occupational lung disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 8:115-119.
- Redman, T.K., K. Rudolph, E.B. Barr, L.E. Bowen, B.A. Muggenburg, and D.E. Bice. 2001. Pulmonary immunity to ragweed in a Beagle dog model of allergic asthma. *Exp Lung Res* 27:433-451.
- Rennard, S.I., and J. Vestbo. 2006. COPD: the dangerous underestimate of 15%. *Lancet* 367:1216-1219.
- Ressmeyer, A.R., A.K. Larsson, E. Vollmer, S.E. Dahlen, S. Uhlig, and C. Martin. 2006. Characterisation of guinea pig precision-cut lung slices: comparison with human tissues. *Eur Respir J* 28:603-611.
- Reynolds, J.M., B.P. Pappu, J. Peng, G.J. Martinez, Y. Zhang, Y. Chung, L. Ma, X.O. Yang, R.I. Nurieva, Q. Tian, and C. Dong. 2010. Toll-like Receptor 2 Signaling in CD4(+) T Lymphocytes Promotes T Helper 17 Responses and Regulates the Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Immunity*
- Riedler, J., C. Braun-Fahrlander, W. Eder, M. Schreuer, M. Waser, S. Maisch, D. Carr, R. Schierl, D. Nowak, and E. von Mutius. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* 358:1129-1133.
- Robays, L.J., T. Maes, S. Lebecque, S.A. Lira, W.A. Kuziel, G.G. Brusselle, G.F. Joos, and K.V. Vermaelen. 2007. Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J Immunol* 178:5305-5311.
- Rochman, Y., and W.J. Leonard. 2008. Thymic stromal lymphopoietin: a new cytokine in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 8:249-254.
- Rook, G.A. 2009. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 126:3-11.
- Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435.
- Rothenberg, M.E., and S.P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 24:147-174.

- Salek-Ardakani, S., J. Song, B.S. Halteman, A.G. Jember, H. Akiba, H. Yagita, and M. Croft. 2003. OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation. *J Exp Med* 198:315-324.
- Sarfati, M., G. Fortin, M. Raymond, and S. Susin. 2008. CD47 in the immune response: role of thrombospondin and SIRP-alpha reverse signaling. *Curr Drug Targets* 9:842-850.
- Sawicka, E., C. Zuany-Amorim, C. Manlius, A. Trifilieff, V. Brinkmann, D.M. Kemeny, and C. Walker. 2003. Inhibition of Th1- and Th2-mediated airway inflammation by the sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720. *J Immunol* 171:6206-6214.
- Schatz, M. 1999. Interrelationships between asthma and pregnancy: a literature review. *J Allergy Clin Immunol* 103:S330-336.
- Schleimer, R.P., A. Kato, R. Kern, D. Kuperman, and P.C. Avila. 2007. Epithelium: at the interface of innate and adaptive immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 120:1279-1284.
- Seiffert, M., P. Brossart, C. Cant, M. Cella, M. Colonna, W. Brugger, L. Kanz, A. Ullrich, and H.J. Bühring. 2001. Signal-regulatory protein alpha (SIRPalpha) but not SIRPbeta is involved in T-cell activation, binds to CD47 with high affinity, and is expressed on immature CD34(+)CD38(-) hematopoietic cells. *Blood* 97:2741-2749.
- Shan, M., H.F. Cheng, L.Z. Song, L. Roberts, L. Green, J. Hacken-Bitar, J. Huh, F. Bakaeen, H.O. Coxson, C. Storness-Bliss, M. Ramchandani, S.H. Lee, D.B. Corry, and F. Kheradmand. 2009. Lung myeloid dendritic cells coordinately induce TH1 and TH17 responses in human emphysema. *Sci Transl Med* 1:4ra10.
- Silverstein, R.L. 2002. The face of TSR revealed: an extracellular signaling domain is exposed. *J Cell Biol* 159:203-206.
- Soderberg, K.A., G.W. Payne, A. Sato, R. Medzhitov, S.S. Segal, and A. Iwasaki. 2005. Innate control of adaptive immunity via remodeling of lymph node feed arteriole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16315-16320.
- Sokol, C.L., G.M. Barton, A.G. Farr, and R. Medzhitov. 2007. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol*
- Sokol, C.L., G.M. Barton, A.G. Farr, and R. Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9:310-318.
- Sokol, C.L., N.Q. Chu, S. Yu, S.A. Nish, T.M. Laufer, and R. Medzhitov. 2009. Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat Immunol* 10:713-720.
- Statistique-Canada. 2009. www.statcan.gc.ca.
- Stene, L.C., and P. Nafstad. 2001. Relation between occurrence of type 1 diabetes and asthma. *Lancet* 357:607-608.
- Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125:S73-80.
- Strutt, T.M., K.K. McKinstry, J.P. Dibble, C. Winchell, Y. Kuang, J.D. Curtis, G. Huston, R.W. Dutton, and S.L. Swain. 2010. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat Med* 16:558-564, 551p following 564.

- Su, X., M. Johansen, M.R. Looney, E.J. Brown, and M.A. Matthay. 2008. CD47 deficiency protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury and *Escherichia coli* pneumonia. *J Immunol* 180:6947-6953.
- Subbarao, P., P.J. Mandhane, and M.R. Sears. 2009. Asthma: epidemiology, etiology and risk factors. *CMAJ* 181:E181-190.
- Sung, S.S., S.M. Fu, C.E. Rose, Jr., F. Gaskin, S.T. Ju, and S.R. Beaty. 2006. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176:2161-2172.
- Sutherland, E.R. 2008. Obesity and asthma. *Immunol Allergy Clin North Am* 28:589-602, ix.
- Szyf, M. 2009. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:243-263.
- Tai, H.Y., M.F. Tam, H. Chou, H.J. Peng, S.N. Su, D.W. Perng, and H.D. Shen. 2006. Pen ch 13 allergen induces secretion of mediators and degradation of occludin protein of human lung epithelial cells. *Allergy* 61:382-388.
- Takahashi, H., S. Ebihara, A. Kanda, M. Kamanaka, T. Sato, S. Habu, H. Kikutani, and H. Sasaki. 2003. Increased susceptibility to airway responses in CD40-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 133:22-29.
- Takenaka, K., T.K. Prasolava, J.C. Wang, S.M. Mortin-Toth, S. Khalouei, O.I. Gan, J.E. Dick, and J.S. Danska. 2007. Polymorphism in Sirpa modulates engraftment of human hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 8:1313-1323.
- Tang, H., W. Cao, S.P. Kasturi, R. Ravindran, H.I. Nakaya, K. Kundu, N. Murthy, T.B. Kepler, B. Malissen, and B. Pulendran. 2010. The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nat Immunol*
- Temann, U.A., P. Ray, and R.A. Flavell. 2002. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J Clin Invest* 109:29-39.
- Ticchioni, M., V. Raimondi, L. Lamy, J. Wijdenes, F.P. Lindberg, E.J. Brown, and A. Bernard. 2001. Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow. *FASEB J* 15:341-350.
- Tsitoura, D.C., R.H. DeKruyff, J.R. Lamb, and D.T. Umetsu. 1999. Intranasal exposure to protein antigen induces immunological tolerance mediated by functionally disabled CD4+ T cells. *J Immunol* 163:2592-2600.
- Tsuji, M., N. Komatsu, S. Kawamoto, K. Suzuki, O. Kanagawa, T. Honjo, S. Hori, and S. Fagarasan. 2009. Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323:1488-1492.
- Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani, and W. Strober. 2003. GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18:415-428.
- van Rijt, L.S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201:981-991.
- van Rijt, L.S., H. Kuipers, N. Vos, D. Hijdra, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2004. A rapid flow cytometric method for determining the cellular composition of

- bronchoalveolar lavage fluid cells in mouse models of asthma. *J Immunol Methods* 288:111-121.
- Van, V.Q., J. Darwiche, M. Raymond, S. Lesage, S. Bouguermouh, M. Rubio, and M. Sarfati. 2008. Cutting edge: CD47 controls the in vivo proliferation and homeostasis of peripheral CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells that express CD103. *J Immunol* 181:5204-5208.
- Van, V.Q., S. Lesage, S. Bouguermouh, P. Gautier, M. Rubio, M. Levesque, S. Nguyen, L. Galibert, and M. Sarfati. 2006. Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 25:5560-5568.
- Vercelli, D. 2008. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 8:169-182.
- Verdrengh, M., F.P. Lindberg, C. Ryden, and A. Tarkowski. 1999. Integrin-associated protein (IAP)-deficient mice are less susceptible to developing Staphylococcus aureus-induced arthritis. *Microbes Infect* 1:745-751.
- Voehringer, D., T.A. Reese, X. Huang, K. Shinkai, and R.M. Locksley. 2006. Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* 203:1435-1446.
- von Garnier, C., L. Filgueira, M. Wikstrom, M. Smith, J.A. Thomas, D.H. Strickland, P.G. Holt, and P.A. Stumbles. 2005. Anatomical location determines the distribution and function of dendritic cells and other APCs in the respiratory tract. *J Immunol* 175:1609-1618.
- von Mutius, E., and K. Radon. 2008. Living on a farm: impact on asthma induction and clinical course. *Immunol Allergy Clin North Am* 28:631-647, ix-x.
- Wakashin, H., K. Hirose, Y. Maezawa, S. Kagami, A. Suto, N. Watanabe, Y. Saito, M. Hatano, T. Tokuhisa, Y. Iwakura, P. Puccetti, I. Iwamoto, and H. Nakajima. 2008. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1023-1032.
- Walter, D.M., J.J. McIntire, G. Berry, A.N. McKenzie, D.D. Donaldson, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. 2001. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol* 167:4668-4675.
- Wan, H., H.L. Winton, C. Soeller, E.R. Tovey, D.C. Gruenert, P.J. Thompson, G.A. Stewart, G.W. Taylor, D.R. Garrod, M.B. Cannell, and C. Robinson. 1999. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest* 104:123-133.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
- Wang, H., M.L. Madariaga, S. Wang, N. Van Rooijen, P.A. Oldenburg, and Y.G. Yang. 2007a. Lack of CD47 on nonhematopoietic cells induces split macrophage tolerance to CD47null cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13744-13749.
- Wang, Y.H., P. Angkasekwinai, N. Lu, K.S. Voo, K. Arima, S. Hanabuchi, A. Hippe, C.J. Corrigan, C. Dong, B. Homey, Z. Yao, S. Ying, D.P. Huston, and Y.J. Liu. 2007b. 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.

- Webster, B., E.H. Ekland, L.M. Agle, S. Chyou, R. Ruggieri, and T.T. Lu. 2006. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. *J Exp Med* 203:1903-1913.
- Weckmann, M., A. Collison, J.L. Simpson, M.V. Kopp, P.A. Wark, M.J. Smyth, H. Yagita, K.I. Matthaei, N. Hansbro, B. Whitehead, P.G. Gibson, P.S. Foster, and J. Mattes. 2007. Critical link between TRAIL and CCL20 for the activation of TH2 cells and the expression of allergic airway disease. *Nat Med* 13:1308-1315.
- Wei, G., L. Wei, J. Zhu, C. Zang, J. Hu-Li, Z. Yao, K. Cui, Y. Kanno, T.Y. Roh, W.T. Watford, D.E. Schones, W. Peng, H.W. Sun, W.E. Paul, J.J. O'Shea, and K. Zhao. 2009. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30:155-167.
- Wei, S.H., H. Rosen, M.P. Matheu, M.G. Sanna, S.K. Wang, E. Jo, C.H. Wong, I. Parker, and M.D. Cahalan. 2005. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat Immunol* 6:1228-1235.
- Wenzel, S., and S.T. Holgate. 2006. The mouse trap: It still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1173-1176; discussion 1176-1178.
- Wenzel, S., D. Wilbraham, R. Fuller, E.B. Getz, and M. Longphre. 2007. Effect of an interleukin-4 variant on late phase asthmatic response to allergen challenge in asthmatic patients: results of two phase 2a studies. *Lancet* 370:1422-1431.
- Whitrow, M.J., V.M. Moore, A.R. Rumbold, and M.J. Davies. 2009. Effect of supplemental folic acid in pregnancy on childhood asthma: a prospective birth cohort study. *Am J Epidemiol* 170:1486-1493.
- Wilder, J.A., D.D. Collie, D.E. Bice, Y. Tesfaigzi, C.R. Lyons, and M.F. Lipscomb. 2001. Ovalbumin aerosols induce airway hyperreactivity in naive DO11.10 T cell receptor transgenic mice without pulmonary eosinophilia or OVA-specific antibody. *J Leukoc Biol* 69:538-547.
- Willart, M.A., H. Jan de Heer, H. Hammad, T. Soullie, K. Deswarte, B.E. Clausen, L. Boon, H.C. Hoogsteden, and B.N. Lambrecht. 2009. The lung vascular filter as a site of immune induction for T cell responses to large embolic antigen. *J Exp Med* 206:2823-2835.
- Wills-Karp, M. 1999. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 17:255-281.
- Wilson, C.B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009a. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9:91-105.
- Wilson, R.H., G.S. Whitehead, H. Nakano, M.E. Free, J.K. Kolls, and D.N. Cook. 2009b. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 180:720-730.
- Xanthou, G., T. Alissafi, M. Semitekolou, D.C. Simoes, E. Economidou, M. Gaga, B.N. Lambrecht, C.M. Lloyd, and V. Panoutsakopoulou. 2007. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med* 13:570-578.
- Xystrakis, E., S. Kusumakar, S. Boswell, E. Peek, Z. Urry, D.F. Richards, T. Adikibi, C. Pridgeon, M. Dallman, T.K. Loke, D.S. Robinson, F.J. Barrat, A. O'Garra, P. Lavender, T.H. Lee, C. Corrigan, and C.M. Hawrylowicz. 2006. Reversing the

- defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 116:146-155.
- Yazdanbakhsh, M., P.G. Kremsner, and R. van Ree. 2002. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296:490-494.
- Yu, X., A. Fukunaga, H. Nagai, S. Oniki, N. Honma, M. Ichihashi, T. Matozaki, C. Nishigori, and T. Horikawa. 2006. Engagement of CD47 inhibits the contact hypersensitivity response via the suppression of motility and B7 expression by Langerhans cells. *J Invest Dermatol* 126:797-807.
- Zaretsky, A.G., J.J. Taylor, I.L. King, F.A. Marshall, M. Mohrs, and E.J. Pearce. 2009. T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *J Exp Med* 206:991-999.
- Zhou, W., K. Hashimoto, K. Goleniewska, J.F. O'Neal, S. Ji, T.S. Blackwell, G.A. Fitzgerald, K.M. Egan, M.W. Geraci, and R.S. Peebles, Jr. 2007. Prostaglandin I2 analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. *J Immunol* 178:702-710.
- Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, and J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000-1007.
- Zhu, J., and W.E. Paul. 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 20:4-12.
- Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28:445-489.
- Zosky, G.R., and P.D. Sly. 2007. Animal models of asthma. *Clin Exp Allergy* 37:973-988.