

# Thèse de Doctorat

**Laure CASTAN**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
**grade de Docteur de l'Université de Nantes**  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Immunologie

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : l'institut du thorax, UMR 1087

Soutenue le 20 octobre 2017

## **De l'allergie alimentaire à l'asthme : rôle de CCR9**

### **JURY**

Président du jury	<b>Nelly FROSSARD</b> , Directeur de recherche, INSERM UMR 7200
Rapporteur :	<b>Cécile CHENIVESSE</b> , MCU-PH, CHU de Lille
Examineur :	<b>Yohann WITTRANT</b> , Chargé de recherche, INRA, UMR 1019
Directeur de Thèse :	<b>Antoine MAGNAN</b> , PU-PH, CHU de Nantes, Université de Nantes
Co-directeur de Thèse :	<b>Gregory BOUCHAUD</b> , Chargé de recherche, INRA, UR1268 <b>Sophie BROUARD</b> , Directrice de recherche, CRTI, UMR1064

# Remerciements

*Je tiens en premier lieu à remercier très chaleureusement le professeur Antoine Magnan (dit Papa Magnan) qui m'a accueilli dans l'équipe et a su me faire confiance alors que j'étais nouvelle arrivante dans l'équipe du poumon ! Je vous suis très reconnaissante pour la facilité que vous avez de transmettre et de partager votre passion et vos connaissances et pour votre façon de gérer et d'entourer les gens de votre équipe. Je pense que c'est en grande partie grâce à vous que l'ambiance de notre équipe est si formidable, que tout le monde s'entend bien et travaille comme il l'entend dans les meilleures conditions et toujours avec respect. Vous avez su insuffler votre bonne humeur et votre façon de travailler à tout le monde.*

*Je tiens bien sûr à remercier Hervé le Marec et Richard Redon, directeurs successifs de l'institut du thorax pour m'avoir accueilli dans leur unité.*

*Je remercie également, le docteur Nelly Frossard, le docteur Cécile Chenivresse et le docteur Yohann Wittrant pour avoir accepté gentiment de faire partie de mon jury de thèse et pour le temps qu'ils consacrent à mon travail.*

*Je tiens à remercier très chaleureusement le Docteur Sophie Brouard, le Docteur Arnaud Boureille et le Docteur Muriel Pichavant pour leurs conseils et leurs échanges lors de mes comités de thèse et particulièrement lors du Lungstorming !*

*Je tiens à remercier la plateforme d'unité thérapeutique expérimentale, en particulier les animaliers, Amandine, Alexis, Maleck, Erwan et Julien, pour leur soutien et leur aide avec les petite souris !*

*Je remercie également la plateforme CytoCell et en particulier Juliette Desfrançois et Nadège Marec pour leur aide précieuse et le travail qu'elles accomplissent au quotidien.*

*Je remercie enfin la plateforme MicroPicell pour leur aide sur les coupes histologiques.*

*Un grand merci à tous les membres de l'équipe Allergie de l'INRA ; Sandra, Colette, Chantal, Marie, Olivier, Florence, Marion, Laura, Roby...*

*...et Mathilde, tu as été un vrai modèle pour moi surtout en master, j'ose espérer que j'ai fait une thèse aussi bonne que la tienne !*

*Un grand merci à Philippe Aubert et à Anne Bessard pour le travail que nous avons fait ensemble.*

*Je remercie également ma nouvelle équipe (équipe 3) de nous avoir accueillis, avec nos poumons et nos petites souris asthmatiques! Un grand merci à Gervaise Loirand, Vincent Sauzeau, Marc Rio, Nathalie Vaillant, Céline Menguy, Florian Dilasser, Morgane Rousselle, Chrystelle Cario-Toumaniantz, Aurélie Garnier et Angela Tesse pour leur accueil.*

*Un grand merci également à tous les doctorants qui font vivre cette unité et qui en sont le noyau dur. Je remercie particulièrement, Emeline, Claire, Justine, Andréa, Marine, Nadjat, Pauline...*

*...Nejma, mon petit chaton, j'étais très contente de me retrouver dans ton équipe après la fusion, ton grain de folie et nos discussions a fait que tu es devenue bien plus qu'une simple co-doctorante !*

*Damien, partenaire en crime de Martin, tu as bien égayé ma troisième année, même si je me plaignais souvent de vos plaisanteries, j'en redemandais, merci pour ta bonne humeur quotidienne, et merci pour la nuit des 48h... !*

*Un immense merci à cette équipe de fou qu'est l'(ex) équipe 6. Vous ne savez pas à quel point l'ambiance qui règne dans l'équipe a pu me porter tout le long de cette thèse. Je souhaite donc vous remercier tous très chaleureusement. Tout d'abord Jennifer ma copine de bureau avec qui j'ai eu mille discussions et qui me manque beaucoup, Damien Reboulleau, Pierre-Joseph, Eugénie, Aurore, Jeremy (merci pour ton illustration !), Kelly (henriotte), ma petite stagiaire qui m'a laissé plein de post-it au-dessus de mon bureau que je regarde tous les jours (la truffe, la chamalotte...), tu devrais venir nous voir plus souvent, Luke, Monsieur parfait et notre docteur officiel !*

*Marie-Aude, ma copine de souris, j'ai vraiment apprécié les moments partagés avec toi, même si tu n'as pas été là souvent au final ! On a été très vite complice et soyons honnête les meilleurs moments sont ceux passés à l'animalerie ! Je garderai toujours mon Bertrand comme diplôme officieux d'expérimentation animale...je sais que je me plains tout le temps mais tu adores ça en vrai.*

*Carole (ma maman de labo), je sais que tu n'aimes pas trop qu'on t'appelle comme ça ...mais c'est toujours mignon quand tu joues la maman avec nous ! Tu as été une vraie rencontre dans cette équipe ; toujours là pour remonter le moral des troupes ! Tu resteras celle qui fut à l'origine de mon surnom si charmant...On en aura bien ri quand même !*

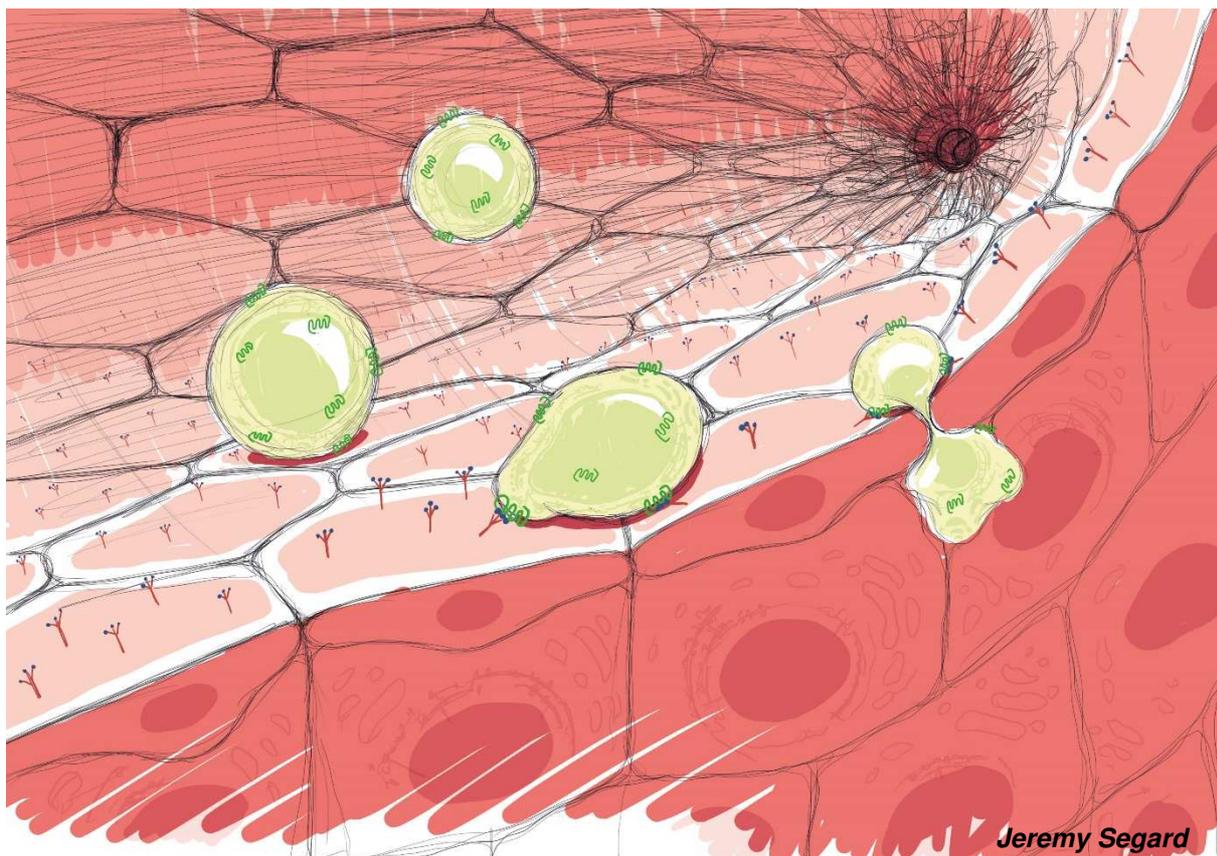
*Maxim, mon premier co-thésard de l'équipe, on aura dû attendre la fin de notre dernière année de thèse pour travailler ensemble ! Et c'est avec toi que j'ai battu mon record de manip au FACS (4h du matin quand même !)*

*Marie, tu n'es pas restée longtemps en stage mais pourtant ton humour et ta joie de vivre ont vraiment marqué cette équipe. Tu as été vraie une bouffée de bonne humeur. Toujours un mot gentil ou un mot pour rire et surtout des soirées mémorables ! Et n'oublie pas tu as intérêt à venir à ma soutenance de thèse sinon....*

*Martin (mon stagiaire quatre étoiles), tu es un peu tête en l'air mais on ne pourrait rêver mieux comme stagiaire (et oui j'adore dire que tu es mon petit stagiaire même si tu as atteint un âge avancé... !). Mais au final tu es devenu bien plus qu'un simple stagiaire ! Heureusement que tu étais là pour partager ces trois ans de thèse avec moi et pour rendre les 48h mythiques et inoubliables ;) . Je n'aurais pas reçu mes milles surnoms sinon... Il va falloir faire une liste d'ailleurs, que je n'en oublie pas ! J'aurais bien aimé rester jusqu'à la fin avec toi mais j'espère bien que tu viendras voir ta little fat en post-doc. Bon courage pour la suite, mais je ne me fais pas trop de soucis pour toi, je sens bien un petit papier Klein M., Garçon D., et al, Nature Mythology d'ici quelques mois !!*

*Un immense merci à Gregory, tu es sans aucun doute celui qui a le plus compté dans cette thèse. Dès le Master tu as su me faire confiance et m'encourager à chaque étape. Je n'en serais probablement pas là ou j'en suis aujourd'hui si tu n'avais pas été là. Malgré tout ce que tu dis, je n'aurais pas pu avoir meilleur encadrant de thèse. Tu as su me soutenir et être là quand il le fallait tout en me donnant la liberté de faire (presque) tout ce que je voulais dans cette thèse. Tu as été un vrai modèle pour moi et je te remercie pour tout ce que tu m'as appris au cours de ces quatre années ! J'espère que l'expérience de ta première thèse encadrée a été aussi bonne qu'elle l'a été pour moi !*

*Pour finir, un grand merci à tous les copains ; mes copines d'ingé, Marion, Estelle, Clélia, Solène, à ma team de sudistes Florence, Manon, Gaétan et ma clonette Sophie pour avoir toujours été là pendant les trois ans et à ma soutenance de thèse. Merci à mes parents qui m'avaient toujours au téléphone alors que j'étais encore au labo au FACS à des heures tardives...et merci en particulier à ma maman qui a accepté de corriger ma thèse, même les parties les plus imbuables ! Enfin, un grand merci à Manu pour m'avoir supporté pendant trois ans, à entendre des jéjunums et des chimiokines à longueur de journée sans savoir ce que ça voulait dire et à m'écouter répéter mes oraux !*



# Table des matières

Remerciements.....	II
Liste des présentations et des publications .....	IX
Liste des tableaux et des figures .....	XI
Liste des abréviations.....	XIII
<b>Partie I : Généralités</b> .....	<b>1</b>
Chapitre 1 : L'allergie .....	1
I. L'allergie alimentaire .....	1
1) Définition et prévalence .....	1
1.1) Définition & symptômes .....	1
1.2) Classement des allergies alimentaires.....	2
1.3) Données de prévalence et études cliniques.....	3
1.4) Augmentation des allergies : une épidémie ?.....	4
1.5) Facteurs de risques des allergies alimentaires .....	5
1.5.a) Facteurs génétiques .....	5
1.5.b) Microbiote .....	6
1.5.c) Période et voie d'introduction des aliments .....	6
1.5.d) Facteurs alimentaires.....	7
2) Le mécanisme de l'allergie alimentaire .....	8
2.1) Le GALT et la tolérance orale.....	8
2.1.a) Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT) .....	8
2.1.b) La tolérance orale .....	9
2.2) Le mécanisme immunitaire de l'allergie IgE-médiée.....	11
2.2.a) La sensibilisation .....	11
2.2.b) Le challenge .....	11
2.2.c) Le paradigme TH1/TH2.....	13
3) Voie de traitement et prévention de l'allergie alimentaire .....	14
3.1) L'éviction .....	14
3.2) L'immunothérapie orale.....	14
3.4) La prévention par les probiotiques et les prébiotiques .....	15
II. L'asthme .....	18
1) Définition et prévalence .....	18
1.1) Définition et symptômes.....	18
1.2) Les différents phénotypes d'asthme .....	19
1.3) Les données de prévalence.....	21
1.4) Facteurs de risque .....	23

2)	Mécanisme de l'asthme .....	24
2.1)	L'infiltrat cellulaire.....	24
2.1.a)	Réponse de type TH2.....	25
2.1.b)	Les T régulateurs dans l'asthme .....	26
2.1.c)	Les TH17 et les neutrophiles.....	27
2.1.d)	Les ILC (innate lymphoid cells) .....	27
2.2)	Importance des cellules épithéliales .....	29
3)	Les traitements actuels et en cours.....	32
3.1)	Anti IL-5.....	32
3.2)	Anti IL-13/IL-4.....	33
3.3)	Anti IL-17.....	33
3.4)	Autres .....	33
III.	La marche atopique .....	35
1)	Définition.....	35
2)	La dermatite atopique .....	36
3)	Donnée de prévalence et étude des cohortes.....	38
4)	Le mécanisme de la marche atopique .....	40
4.1)	Hypothèse des systèmes immunitaires muqueux communs.....	40
4.2)	Rôle des cytokines dérivées des cellules épithéliales.....	41
4.3)	Rôle de la réponse TH17 .....	42
IV.	Les modèles animaux d'allergie.....	44
1)	Les modèles animaux d'allergies sont-ils pertinents ? .....	44
2)	Les modèles animaux de marche atopique.....	45
Chapitre 2 : les chimiokines et leurs récepteurs .....		47
I.	Rôle des chimiokines .....	47
1)	Définition.....	47
2)	Le mécanisme de la migration .....	49
2.1)	La diapédèse .....	49
2.2)	Voie de la PLC (phospholipase C).....	51
2.3)	le recyclage à la membrane .....	52
II.	Les chimiokines et leurs récepteurs dans le système immunitaire.....	53
1)	Organes lymphoïdes primaires .....	53
2)	Organes lymphoïdes secondaires.....	55
3)	Périphérie .....	56
4)	Exemple de l'activation des T par les cellules CD103 <sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques.....	60
III.	Implication des récepteurs de chimiokines dans l'allergie .....	62
1)	Un récepteur intestinal : CCR9 .....	62

2) Les récepteurs de chimiokines dans l'allergie .....	64
<i>Revue : Chemokine receptors in allergic diseases</i> .....	64
<b>Partie II : Résultats et discussion</b> .....	<b>74</b>
I. Objectifs de la thèse.....	74
II. Matériels et méthodes .....	75
1) Modèle animal .....	75
1.1) Mise en place du modèle expérimental.....	75
1.1.a) Modèle de marche atopique.....	75
1.1.b) Modèle d'allergie par sensibilisation cutanée .....	76
1.2) Analyses fonctionnelles respiratoire.....	76
1.2.a) Pléthysmographie .....	76
1.2.b) FlexiVent.....	77
2) Cytométrie en flux.....	77
2.1) Récupération des échantillons .....	77
2.2) Marquage et méthodes d'analyse.....	78
3) Histologie.....	79
3.1) Score histologique.....	79
3.2) Mesure du pourcentage de cellule à mucus .....	80
4) qPCR.....	80
5) Transfert adoptif.....	80
6) Dosage des IgE .....	81
7) Dosage des IgG1 .....	81
8) ELISA inhibition .....	82
9) ELISA avidité .....	82
10) Multiplex .....	82
III. Résultats.....	84
1) CCR9 est indispensable dans l'aggravation de l'inflammation pulmonaire après allergie alimentaire.....	84
<i>Food allergen-sensitized CCR9<sup>+</sup> lymphocytes enhance airways allergic inflammation in mice</i> .....	85
2) CCR9 dans l'allergie alimentaire seule .....	110
2.1) Caractérisation du modèle d'allergie alimentaire .....	110
2.1.a) Caractérisation physiopathologique post modèle de marche atopique....	110
2.1.b) Inflammation systémique post modèle marche atopique.....	111
2.1.c) Analyse de l'inflammation post challenge alimentaire .....	113
2.2) Les souris WT et CCR9 <sup>-/-</sup> ne présentent pas de différence d'inflammation systémique.....	115
3) Modèle d'allergie alimentaire par sensibilisation cutanée.....	117

3.1) La sensibilisation cutanée induit une réponse allergique suite à un challenge .....	117
3.2) Les trois formes de gluten sont capables d'induire la production d'IgG1 et d'IgE spécifique .....	118
3.3) La transformation du gluten par désamination entraîne la formation de nouveaux épitope .....	119
3.4) La sensibilisation cutanée induit une réponse allergique intestinale .....	120
IV. Discussion et perspectives .....	122
Annexes.....	134
<i>Article 1: Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevent food allergy and promotes tolerance in offspring mice.....</i>	<i>134</i>
<i>Article 2: How proteins aggregate can reduce allergenicity : comparison of ovalbumins heated under opposite electrostatic conditions.....</i>	<i>143</i>
Références bibliographiques.....	151

# Liste des présentations et des publications

## Liste des posters et des présentations orales:

Conférence COST impARAS, Helsingor, Danemark, Octobre 2017. 1<sup>er</sup> prix des présentations courtes

Présentation orale: **Food allergy skin sensitization: A comparative study with three different gluten products in Brown Norway rats**

Lungstorming, Marseille, France. Juin 2017

Présentation orale: **CCR9 est essentiel dans l'aggravation de l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin mimant la marche atopique**

CFA (Congrès francophone d'allergologie), Paris, France. Avril 2017

Présentation orale: **CCR9 est essentiel dans l'aggravation de l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin mimant la marche atopique**

WIRM (World immune regulation meeting), Davos, Suisse. Mars 2017

Poster: **Food allergen-sensitized CCR9<sup>+</sup> lymphocytes enhance allergic lung inflammation and asthma characteristics in mice**

ERS (European respiratory society congress), Londres, Royaume-Uni. Septembre 2016

Poster: **The role of the T-cell homing receptor in the immune mechanisms of the atopic march**

Lungstorming, Bombon, France. Juin 2016

Présentation orale: **Rôle des récepteurs de domiciliation cellulaire dans les mécanismes immunologiques de la marche atopique**

CFA (Congrès francophone d'allergologie), Paris, France. Avril 2016

Poster: **The nature of wheat gliadins modifies the immune response in a mice model of food allergy**

ECI (European congress of immunology), Vienne, Autriche. Septembre 2015

Présentation orale: **Maternal exposure to prebiotics prevents food allergy and promotes tolerance in offspring**

Journées scientifiques de l'école doctorale, Nantes, Décembre 2015. 3<sup>ème</sup> prix poster

Poster: **The role of the T-cell homing receptor in the immune mechanisms of the atopic march**

WIRM (World immune regulation meeting), Davos, Suisse. Mars 2015

Poster: **Maternal exposure to prebiotics prevents food allergy and promotes tolerance in offspring**

## Liste des publications:

Maria Luigia Carbone, Gilliane Chadeuf, Sandrine Heurtebise-Chrétien, Xavier Prieur, Thibault Quillard, Yann Goueffic, Nathalie Vaillant, Marc Rio, **Laure Castan**, Maxim Durand, Céline Baron-Menguy, Julien Aureille, Juliette Desfrancois, Angela Tesse, Raul M. Torres & Gervaise Loirand. **Leukocyte RhoA exchange factor Arhgef1 mediates vascular inflammation and atherosclerosis**. J of Clin Investigation 2017. En reviewing

Claude M, Bouchaud G, Lup R, **Castan L**, Tranquet O, Denery-Papini S, Bodinier M, Brossard C. **How proteins aggregate can reduce allergenicity: comparison of ovalbumin heated under opposite electrostatic conditions**. J Agric Food Chem 2017; 24

**Castan L**, Cheminant M-A., Brouard S., Magnan A., Bouchaud G. **Food allergen-sensitized CCR9+ lymphocytes enhance allergic lung inflammation and asthma characteristics in mice**. Allergy 2017. En reviewing

**Castan L**, Magnan A, Bouchaud G. **Chemokine receptors in allergic diseases**. Allergy 2016; 72 (5): 682-690

Bouchaud G\*, **Castan L\***, Chesne J, Braza F, Aubert P, Neunlist M, Magnan A, Bodinier M. **Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice**. Allergy 2016; 71: 68–76

**Castan L**, Colas L, Bouchaud G, Bodinier M, Barbarot S, Magnan A. **Hygiene hypothesis: Where are we? Review of the workshop “Allergies” and “Individualized medicine for chronic diseases (DHU 2020)**. Rev Fr Allergol 2016; 56 (4): 364-371

**Castan L**, Bouchaud G, Magnan A. **Role of chemokine receptors in allergic diseases**. Rev Fr Allergol 2016; 56 (5): 426-433

Magnan A, Chesne J, **Castan L**, Bouchaud G. **Asthma: What is expected of future treatments?** Rev Fr Allergol 2016; 55 (3): 125-127

\*Co-auteurs

## Liste des tableaux et des figures

Tableau 1: Classification des allergies alimentaires. D'après YU, Nature, 2016 .....	3
Tableau 2: Anticorps monoclonaux dirigés contre la réponse TH2 .....	34
Tableau 3: Chimiokines et leurs récepteurs.....	59
Figure 1: Hypothèse de la double exposition aux allergènes. D'après DU TOIT, JACI 2016..	7
Figure 2: Le Tissu lymphoïde associé au tube digestif.....	9
Figure 3: Le mécanisme immunitaire de l'allergie alimentaire.....	12
Figure 4: La balance TH1/TH2 .....	13
Figure 5: Caractéristiques de l'asthme.....	19
Figure 6: Les différents phénotypes d'asthme. D'après WENZEL, Nature Medecine, 2012 et WENZEL, Lancet, 2001 .....	21
Figure 7: Analyse de la prévalence de l'asthme chez les 6/7 ans et les 13/14 ans. ....	22
Figure 8: La synapse immunologique .....	26
Figure 9: Les différents groupes d'ILC (innate lymphoid cell). D'après MORITA, JACI 2016.	28
Figure 10: le mécanisme immunologique de l'asthme .....	31
Figure 11: Hypothèse du trafic cellulaire dans l'asthme. D'après MEDOFF, Annual Review of Immunology, 2008.....	31
Figure 12: Hypothèse de l'explication de la marche atopique après eczéma atopique. D'après DHARMAGE, Allergy, 2014.....	36
Figure 13: Mécanisme immunologique de la dermatite atopique .....	38
Figure 14: Classification des 4 groupes de chimiokines.....	49
Figure 15: Mécanisme de la diapédèse .....	50
Figure 16: Voie de la phospholipase C après activation du récepteur de chimiokine. ....	52
Figure 17: Internalisation et recyclage du récepteur de chimiokine.....	53
Figure 18: Le contrôle du trafic cellulaire par les chimiokines entre la moelle épinière, le sang et les tissus périphériques en période d'inflammation. D'après GRIFFITH, Annual reviews of immunology, 2014.....	57
Figure 19: Stimulation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques CD103 <sup>+</sup> dans la tolérance orale et dans l'allergie .....	61
Figure 20: Modèle de marche atopique .....	75
Figure 21: Modèle d'allergie par sensibilisation cutanée.....	76
Figure 22: Stratégie de gating .....	78
Figure 23: Plaque 96 puits type pour un dosage IgG1 .....	82

Figure 24: Caractérisation physiopathologique de l'allergie alimentaire après modèle de marche atopique.....	111
Figure 25: Phénotypage de différentes populations de cellules immunitaires dans la rate par cytométrie en flux. ....	112
Figure 26: Phénotypage de différentes populations de cellules immunitaires dans les ganglions mésentériques par cytométrie. ....	112
Figure 27: Phénotypage CD3, CD4 et CD8 après challenge alimentaire. ....	113
Figure 28: Mesure du nombre total de lymphocytes CCR9 <sup>+</sup> et de la fréquence de CD4 <sup>+</sup> CCR9 <sup>+</sup> .....	114
Figure 29: Mesure de l'épaisseur de l'oreille après challenge par gavage oral de gluten. N= 8 souris min par groupe .....	115
Figure 30: Phénotypage des populations immunitaires dans les ganglions mésentériques et la rate par cytométrie en flux. ....	116
Figure 31: Mesure de l'épaisseur de l'oreille après injection de l'allergène sensibilisant correspondant. ....	118
Figure 32: Mesure des IgG1 (A) et des IgE (B) spécifiques des trois formes de gluten par ELISA.....	119
Figure 33: Mesure de la force de la liaison IgG1/allergène par des tests d'avidité (A) et des tests d'inhibition (B) .....	120
Figure 34: Nombre de cellules totales, de lymphocytes TCD3 <sup>+</sup> , TCD4 <sup>+</sup> et TCD8 <sup>+</sup> dans différents compartiments.....	121
Figure 35: Protocole de délétion du microbiote intestinal par antibiotiques .....	132

## Liste des abréviations

ACP : analyse en composant principale  
ALA :  $\alpha$ -lactalbumine  
APC : cellule présentatrice d'antigène  
BCR: B cell receptor  
BPCO : bronchopneumopathie obstructive chronique  
CLA: cutaneous lymphocyte antigen  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CSI: corticostéroïdes inhalés  
DA: dermatite atopique  
DAG: diacyl-glycerol  
DAMP: damage-associated molecular pattern  
DC: dendritic cell  
DEP : débit expiratoire de pointe  
Der f: *Dermatophagoides farinae*  
Der p : *Dermatophagoides pteronyssius*  
DO: densité optique  
EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique  
EGFR: epidermal growth factor receptor  
EIA: exercice induced asthma  
EoE: œsophagite à éosinophiles  
FOS: fructo oligosaccharide  
GAALEN: Global Allergy and Asthma Network of Excellence  
GAG: glycosaminoglycanes  
GALT: gut associated lymphoid tissue  
GDP: guanosine di phosphate  
GOS: galacto oligosaccharide  
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G  
GRK: G protein coupled receptor kinase  
GTP: guanosine tri phosphate  
GWAS: genome wide association study

HDM: house dust mite  
HEV: high endothelial venules  
HLA: human leukocyte antigen  
HRB: hyperréactivité bronchique  
ICAM1: InterCellular Adhesion Molecule 1  
IDEC: inflammatory dendritic epidermal cell  
IEL: intra-epithelial lymphocytes  
Ig : immunoglobuline  
IL : interleukine  
ILC: innate lymphoid cells  
IMC: indice de masse corporelle  
IN: intra-nasal  
IP: intra-peritoneal  
IP3: phosphatidylinositol 3 phosphate  
ISAAC: International Study of Asthma and Allergies in childhood  
KO: knock out  
LBA: lavages broncho alvéolaire  
LEAP: learning early about peanut  
LFA1: Lymphocyte function-associated antigen 1  
LP: Lamina propria  
LPS: lipopolysaccharide  
MADCAM1: mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1  
MAPK: mitogen-activated proteins kinases  
MUP: Methylumbelliferyl phosphate  
NO: nitric oxide  
OMS : organisation mondiale de la santé  
OVA: ovalbumine  
PAMP: pathogen-associated molecular pattern  
PAR: protease activated receptors  
PAS: periodic-acid Schiff  
PBS: Phosphate buffered saline  
PECAM1: Platelet endothelial cell adhesion molecule1

PENH: enhanced pause  
PI3K: phosphoinositide 3-kinase  
PIP2: phosphatidyl biphosphate  
PKC: protéines kinases C  
PLC: phospholipase C  
PMA: Phorbol myristate acetate  
PRR: pattern recognition receptors  
PSGL1: P-selectin glycoprotein ligand 1  
RA: acide rétinoïque  
RAG: recombination-activating genes  
RALDH: rétinol déshydrogénase  
RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction  
S1PR: sphingosine-1-phosphate  
SARP: severe asthma research program  
SCORAD: scoring atopic dermatitis  
SVF: serum de veau foetal  
SPF: specific pathogen free  
TCR: T cell receptor  
TECK: thymus expressed chemokine  
TEWL: Trans epidermal water loss  
TLR: toll like receptor  
TMB: tetramethylbenzidine  
TRIS: trishydroxyméthylaminométhane  
TSLP: Thymic stromal lympho-poietin  
VCAM1: vascular cell-adhesion molecule 1  
VEMS: volume expiratoire maximal par seconde  
VLA4: very late antigen 4  
WT: wild type  
ZO : zona occludens

# Partie I : Généralités

## Chapitre 1 : L'allergie

### I. L'allergie alimentaire

#### 1) Définition et prévalence

##### *1.1) Définition & symptômes*

L'ingestion d'antigènes inoffensifs tels que les protéines alimentaires n'induit généralement pas de réponse du système immunitaire. Cette absence de réponse est un mécanisme appelé tolérance orale, qui est gérée par de nombreux acteurs immunitaires, principalement par les lymphocytes T régulateurs (Chinthrajah, 2016) . Chez les patients atteints d'allergie alimentaire, on assiste à une brèche dans la tolérance orale conduisant à la sensibilisation alimentaire puis au développement de la réponse allergique. Toutes les protéines peuvent en soi constituer des allergènes alimentaires mais certains aliments sont plus allergéniques que d'autres. Ainsi le lait, l'œuf, la cacahuète, le sésame, le poisson et le blé représentent les 6 aliments allergéniques majeurs chez les enfants (Perkin & Lack, 2016) . Les allergènes alimentaires peuvent varier en fonction de l'âge mais aussi d'un pays à l'autre. Ainsi, chez les enfants en bas âge, le lait de vache et les œufs sont les allergènes les plus répandus alors que les adultes sont plutôt allergiques aux poissons, aux fruits de mers et aux fruits et légumes (Koplin, 2015) . Par ailleurs, c'est l'allergie à l'œuf qui domine chez les enfants en Australie et en Asie alors que les enfants en Amérique et en Europe occidentale souffrent plutôt d'allergie au lait de vache. De la même manière l'allergie aux produits de la mer est retrouvée chez les adultes en Asie tandis que l'on retrouve plutôt les noix et l'arachide en Europe et aux Etats unis (Prescott et al., 2013) . Après ingestion d'un aliment allergénique, les symptômes de l'allergie peuvent se déclencher très rapidement, de quelques minutes à quelques heures après l'ingestion. Les symptômes sont également très variés, ce qui complexifie le diagnostic des allergies alimentaires. En effet, suite à l'ingestion, les manifestations peuvent aller des simples démangeaisons à une réaction systémique grave : l'anaphylaxie, qui peut alors mettre en péril la vie du patient. Les manifestations des allergies peuvent toucher différents organes ; la peau avec des démangeaisons ou de l'urticaire, l'appareil gastro-intestinal avec des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements ou des diarrhées, mais aussi les voies

respiratoires avec de l'œdème ou de l'asthme (Kulis, Wright, Jones, & Burks, 2015; Sicherer & Sampson, 2006) .

## 1.2) *Classement des allergies alimentaires*

On classifie généralement les allergies alimentaires selon l'importance des immunoglobulines E (IgE) dans la pathologie. Ainsi, il existe trois grands types d'allergies alimentaires : les allergies alimentaires IgE médiées, les allergies alimentaires non IgE médiées et les allergies alimentaires mixtes (Yu, Freeland, & Nadeau, 2016) . Les allergies alimentaires IgE médiées sont les plus courantes et les plus étudiées. Elles sont plus fréquentes chez les enfants qui souffrent généralement d'allergie au lait de vache, aux œufs, au soja et au blé tandis que les allergies persistantes qui se poursuivent à l'âge adulte concernent plutôt l'allergie à la cacahuète, aux noix, aux graines et aux fruits de mer (Savage, Sicherer, & Wood, 2016) . Elles sont associées aux IgE car les individus sensibilisés à un allergène alimentaire produisent des IgE spécifiques d'un épitope de la protéine allergénique qui se fixent sur leur récepteur de haute affinité présent sur les basophiles et les mastocytes. Après une seconde exposition, la liaison entre les IgE et l'allergène induit la dégranulation de ces cellules ce qui entraîne les manifestations allergiques (S. R. Chinthrajah, 2016) . On retrouve différents endotypes au sein des allergies alimentaires IgE médiées. Le syndrome d'allergie orale est une allergie alimentaire à un allergène qui cross-réagit avec un pollen. Les patients atteints de rhinite allergique peuvent ainsi produire des IgE qui vont réagir après une ingestion de fruits ou de légumes possédant une cross-réactivité avec le pollen allergisant (Ivković-Jureković, 2015; Yu et al., 2016) . Ce syndrome se manifeste par des démangeaisons de la gorge pouvant être accompagnées d'un gonflement des lèvres ou de cloques au niveau de la bouche, apparaissant quelques minutes après ingestion (Asero, 1998; Nowak-Węgrzyn, Szajewska, & Lack, 2017) . L'anaphylaxie est la manifestation la plus grave d'une réaction allergique car elle peut être fatale. Elle se manifeste par des nausées, des vomissements, des diarrhées ou des crampes abdominales. Elle peut être accompagnée d'urticaire, d'un œdème de Quincke, d'essoufflement, de tachycardie et d'hypotension (Nowak-Węgrzyn et al., 2017) . L'anaphylaxie à l'effort est également une allergie IgE médiée. Les allergies alimentaires mixtes sont caractérisées par des atteintes gastro-intestinales généralement accompagnées d'hyperéosinophilie. On retrouve dans cette catégorie, l'œsophagite à éosinophiles (EoE), les gastroentérites à éosinophiles et les colites à éosinophiles (Rothenberg, 2004) . L'œsophagite à éosinophiles affecte particulièrement les hommes et est caractérisée par des reflux gastro-œsophagiens, des douleurs abdominales, des vomissements, une perturbation du sommeil et une résistance aux traitements classiques du reflux gastro œsophagien (Nowak-Węgrzyn et al. 2017). On retrouve également dans cette catégorie des dermatites atopiques retardées

## Généralités : l'allergie

associées à l'allergie alimentaire, qui se manifestent 6 à 48 heures après ingestion de l'allergène (Sidbury et al., 2014) . Les allergies alimentaires non IgE médiées impactent majoritairement le tractus gastro-intestinal et n'impactent pas ou peu la peau ou les voies respiratoires. Elles affectent généralement les enfants en bas âge et disparaissent après 1 ou 2 ans. Elles se manifestent par des douleurs abdominales, des diarrhées et des vomissements et le lait de vache est l'allergène majoritaire (Nowak-Wegrzyn et al. 2017).

Sous-type	Age	Allergène	Symptômes
<b>Allergie alimentaire IgE médiée</b>			
	enfants>adulte	Lait, œuf, blé, soja, cacahuètes, noix, poisson, fruit de mer	Démangeaisons, urticaire, œdème de Quincke, douleurs abdominales, vomissement, diarrhées, sifflement
<b>Allergie alimentaire mixtes</b>			
Allergie alimentaire associée à la dermatite atopique	enfants>adulte	Lait, œuf, blé, soja, cacahuètes, noix, poisson, fruit de mer	Exacerbation de la dermatite atopique après ingestion d'un allergène
Œsophagite à éosinophiles	Enfants et adulte	Lait, blé œuf, viande, soja et poulet	Vomissement, défaut de croissance, surcharge fécale, brûlures d'estomac
Autres désordres gastro-intestinal à éosinophiles	Enfants et adulte	Lait, œuf, blé, soja, noix, poisson, fruit de mer, viande	Douleurs intestinales variées
<b>Allergie alimentaire non IgE médiée</b>			
FPIES (food protein induced enterocolitis syndrome)	enfants	Lait, soja, rice, œuf, avoine	Vomissement, diarrhée, défaut de croissance
FPIP (food protein induced proctocolitis)	enfants	Lait, soja, blé, œuf	Saignements rectaux
FPE ( food protein enteropathy)	enfants	Lait, soja blé et œuf	diarrhée, défaut de croissance Malabsorption, stéatorrhée

**Tableau 1: Classification des allergies alimentaires. D'après YU, Nature, 2016**

### 1.3) Données de prévalence et études cliniques

De nombreuses cohortes de patients ont permis l'analyse des données de prévalences de l'allergie alimentaire au niveau mondial. La cohorte EuroPrevall a analysé la prévalence de la sensibilisation à divers allergènes sur une population hétérogène provenant d'Europe, des Etats-Unis et d'Australie. Ainsi, le sérum de 4522 individus de 13 pays différents (Australie, Belgique, Estonie, France, Allemagne, Islande, Italie, Norvège, Espagne, Suède, Suisse, Royaume-Uni et USA) a été testé contre 24 allergènes alimentaires et respiratoires. La sensibilisation aux allergènes alimentaires (tous allergènes confondus) est très variable et atteint son maximum avec 24.6% aux USA. La prévalence la plus élevée aux USA et en Allemagne est celle de la noisette (14.9% et 14.7% respectivement) alors qu'en France, c'est la crevette qui domine suivie du blé avec respectivement 7% et 5.5% (Burney et al., 2010) Une meta-analyse a été réalisé en 2014 sur des études faites sur la prévalence des allergies alimentaires les plus répandues en Europe : lait de vache, œuf, blé, soja, cacahuète, noix,

poisson et fruits de mer. Sur les 42 études incluses dans la meta-analyse, la prévalence des allergies auto diagnostiquées étaient respectivement de 6%, 2.5%, 3.6%, 0.4%, 1.3%, 2.2% et 1.3% (Nwaru et al., 2014) . Les enfants et les populations en bas âge sont les plus touchés par les allergies alimentaires avec une prévalence dans les pays occidentaux pouvant atteindre 10% (Osborne et al., 2011; Prescott et al., 2013) . Les études menées par questionnaire d'auto-diagnostic ont montré que la prévalence des allergies alimentaires pouvait varier de 3% à 35%, en sachant que ces résultats sont largement surestimés par rapport à la réalité (Rona et al., 2007) . Plus généralement, la prévalence de l'allergie alimentaire est estimée à environ 5% à 7% chez les enfants (Branum & Lukacs, 2008; Prescott et al., 2013) et environ 2% chez les adultes (Cianferoni & Spergel, 2009) .

#### *1.4) Augmentation des allergies : une épidémie ?*

Il est important de préciser qu'avant 1870, qui constitue la date du premier épisode de rhume des foies décrit aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, les allergies n'étaient pas connues et encore moins décrites. C'est Blackley qui à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle décrivit pour la première fois les symptômes du rhume des foies. (Platts-Mills, 2015; Waite, 1995) . Par ailleurs, la mention de l'augmentation de la fréquence des allergies alimentaires n'apparaît que dans les années 1990. Au 19<sup>ème</sup> siècle les conditions d'hygiène et de vie étaient bien inférieures à celles d'aujourd'hui. Il est décrit à Chicago que les sources d'eau « potable » étaient situées au même endroit que l'évacuation des eaux usées (Reynolds & Hazen, 1893) . Des changements majeurs apparurent à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle et au début du 20<sup>ème</sup>. En effet, c'est à cette période que la généralisation du traitement des eaux usées fit son apparition avec la chloration (Platts-Mills, 2015) . Les conditions d'hygiène et de vie furent nettement améliorées par la généralisation de l'utilisation d'antibiotiques, l'installation des égouts, l'aseptisation des milieux de vie etc. Tous ces facteurs, ajoutés au déplacement des populations rurales vers la ville ont conduit progressivement à l'appauvrissement de la flore microbienne. Le manque d'exposition à des agents microbiens augmenterait ainsi la susceptibilité aux allergies. C'est Strachan qui en 1989 a élaboré pour la première fois cette théorie, appelée hypothèse hygiéniste (Strachan, 1989) . Plusieurs études laissent en effet penser que le contact prolongé et précoce aux agents infectieux, notamment en milieu rural, limiterait l'apparition des maladies (Ege et al., 2011; Illi et al., 2012) . On constate ainsi depuis plusieurs années une augmentation de la prévalence globale des allergies dans les pays développés (Koplin, 2015) . L'allergie est ainsi devenue un vrai problème de santé publique dans les pays occidentaux et constitue la quatrième maladie mondiale selon l'OMS (Organisation mondiale de la santé) en termes de morbidité (WAO, 2012) . Plusieurs études effectuées sur une même population au cours du temps ont pu démontrer une augmentation de la prévalence des allergies alimentaires ces dernières

années. Venter (Venter et al., 2010) a étudié la prévalence de l'allergie sur une population d'enfants résidant dans une même zone géographique. Il a ainsi pu observer une augmentation de la prévalence entre les années 1993/1994 et 1997/1999, de 0.5% à 1.4%. Aux Etats-Unis, une étude sur une population d'enfants interrogés par un questionnaire a révélé une augmentation de l'allergie à la cacahuète de 0.6% à 1.2% à 2.1% entre les années 1997, 2002 et 2007 (Sicherer & Sampson, 2010) . Plus récemment, une étude faite sur les admissions en hôpital pour anaphylaxie a montré une augmentation de 106% entre 1992 et 2012 sur une population âgée de 0 à 14 ans au Royaume-Uni (Turner et al., 2015) . Aux Etats-Unis, le nombre d'hospitalisation pour anaphylaxie suite à l'ingestion d'un aliment a doublé entre 2000 et 2009 chez une population âgée de moins de 18 ans (Rudders, Arias, & Camargo, 2014) . L'allergie alimentaire semble ainsi avoir atteint un seuil quasi épidémique dans les pays occidentaux avec une augmentation qui demeure aujourd'hui partiellement expliquée par le style de vie, l'environnement ou les facteurs génétiques.

## *1.5) Facteurs de risques des allergies alimentaires*

### 1.5.a) Facteurs génétiques

Un des premiers facteurs mis en cause dans l'allergie est bien sur l'histoire familiale. En effet, les allergies sont héréditaires, avec une prévalence plus élevée chez les enfants dont un ou les deux parents sont allergiques. Un enfant a 7 fois plus de risque de développer une allergie à la cacahuète si un des parents ou un de ses frères et sœurs est déjà allergique (Hourihane, Dean, & Warner, 1996; Lack, 2012) . L'environnement peut par ailleurs influencer sur la génétique. En effet, la prévalence de l'allergie alimentaire chez des enfants nés en Australie mais d'origine asiatique est 3 à 4 fois plus élevée que celle trouvée chez des enfants caucasiens nés en Australie (Jennifer J Koplin, 2015) . Paradoxalement, la prévalence des allergies est relativement peu élevée en Asie. Ces résultats démontrent donc que l'exposition à un nouvel environnement ou au contraire l'absence d'un environnement protecteur peut avoir une influence sur les prédispositions génétiques. La première étude d'association pangénomique (genome wide association study ou GWAS) menée sur l'allergie alimentaire sur des enfants aux USA a identifié un variant génétique des gènes HLA-DR et HLA-DQ comme facteur de risque de l'allergie à la cacahuète (Hong et al., 2015) . Par ailleurs on sait depuis quelques années maintenant que les mutations délétères du gène de la filaggrine sont associées avec la prévalence de l'allergie dont celle notamment à la cacahuète (Brown et al., 2011) .

### 1.5.b) Microbiote

Les allergies sont généralement associées au mode de vie des pays occidentaux. Selon la théorie de l'hygiène, le manque d'exposition aux agents infectieux et aux parasites durant l'enfance augmenterait la susceptibilité aux maladies allergiques. Peu d'études montrent une association claire entre la moindre diversité de la flore microbienne et l'allergie mais certaines ont observé une diminution nette des maladies allergiques chez les populations vivant en milieu rural (Ege et al., 2011; Fuchs et al., 2012; Illi et al., 2012) .Par ailleurs, les souris subissant un traitement antibiotique à spectre large ont tendance à développer plus d'allergies (Stefka et al., 2014) . Chez les humains, des études mettent en évidence l'association entre allergie et dysbiose du microbiote intestinal (Abrahamsson et al., 2012) . Le microbiote des patients allergiques semble donc différent de celui des personnes saines. Une étude examinant la composition du microbiote intestinal sur 76 enfants à haut risque d'atopie a démontré que les enfants n'ayant pas développé de maladie présentaient une composition différente de ceux qui ont effectivement développé des allergies, et ce avant 3 ans (Kalliomäki et al., 2001) . Ces observations ont conduit les chercheurs à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'administration de pré et de probiotiques afin de stimuler le microbiote intestinal.

### 1.5.c) Période et voie d'introduction des aliments

Jusqu'à récemment, les recommandations en matière de diversification alimentaire des nouveaux nés étaient de retarder le plus possible l'introduction des allergènes dans le régime alimentaire. Aujourd'hui, cette vue change et il est de plus en plus admis que l'introduction précoce des allergènes protégerait contre le développement des allergies alimentaires. Ainsi, la consommation précoce de cacahuète durant les premier mois de vie est associée à la diminution de la prévalence de l'allergie à cet aliment (du Toit, Tsakok, Lack, & Lack, 2016; Toit et al., 2008) . De plus la sensibilisation aux allergènes alimentaires ne se fait pas uniquement par leur consommation mais aussi par d'autres voies d'exposition dont la peau. Il est aujourd'hui admis que la consommation précoce des protéines allergéniques induirait la tolérance orale alors que le contact cutané avec de faibles doses d'allergène induirait la sensibilisation. Par ailleurs on sait aujourd'hui que les enfants souffrant de dermatite atopique ont un risque plus élevé de développer des allergies alimentaires (Amat et al., 2015) . Ces enfants peuvent donc être préalablement exposés aux allergènes alimentaires par une peau altérée avant de développer l'allergie alimentaire. En effet, le contact cutané avec les allergènes alimentaires peut se faire de façon variable ; par les mains, les meubles, les téléphones portables, le sol, etc et ces protéines peuvent pénétrer une peau lésée et être

captées par les cellules de Langerhans (Lack, 2012; Perry, Conover-Walker, Pomés, Chapman, & Wood, 2004) . Il est ainsi proposé que le premier site d'exposition et de priming des lymphocytes soit la peau. Les lymphocytes T spécifiques de la cacahuète chez les patients allergiques expriment l'antigène CLA<sup>+</sup> exprimés généralement par les lymphocytes cutanés (Chan et al., 2012) . La peau et spécialement celle des enfants souffrant de maladies inflammatoires cutanées, représenterait donc un site privilégié de sensibilisation alimentaire.

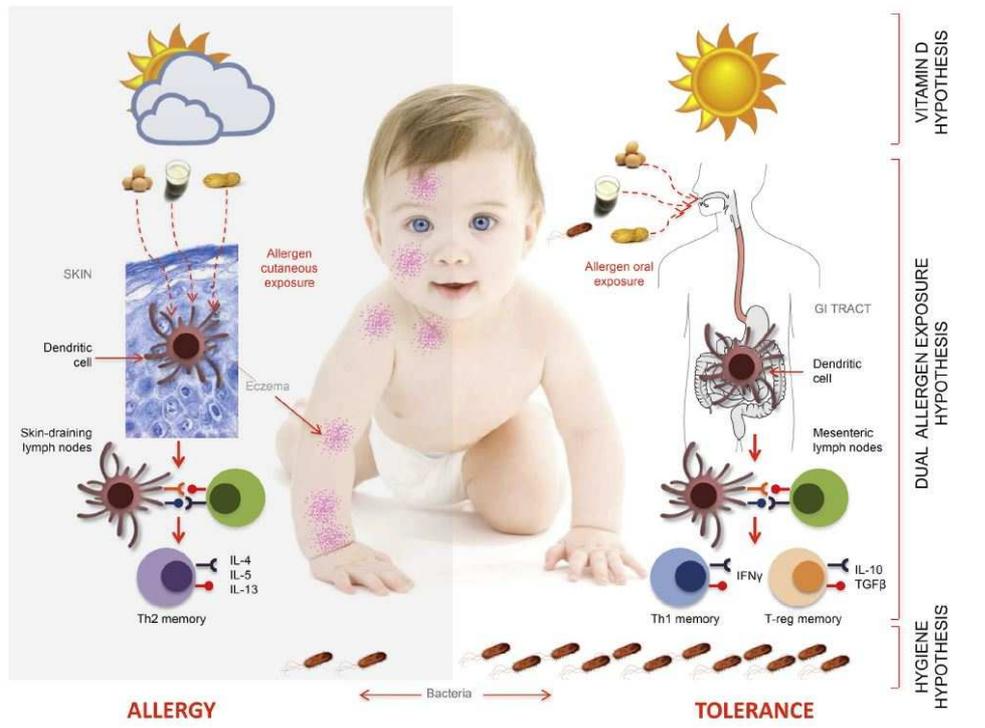


Figure 1: Hypothèse de la double exposition aux allergènes. D'après DU TOIT, JACI 2016

### 1.5.d) Facteurs alimentaires

Au cours les dernières décennies, notre régime alimentaire a beaucoup changé. Ces changements pourraient pour certains auteurs expliquer l'augmentation des maladies allergiques. Tout d'abord, le manque ou au contraire l'excès de vitamine D a été incriminé dans les allergies alimentaires. Certaines études ont en effet montré que la supplémentation en vitamine D était associée à un risque plus élevé d'allergie alimentaire (Milner, Stein, McCarter, & Moon, 2004) . Au contraire, certaines études montrent que le manque de soleil et donc de vitamine D dû notamment à la naissance des enfants en hiver, serait à l'origine de l'augmentation des allergies alimentaires (Vassallo & Camargo, 2010) . Plus probablement le régime occidental riche en graisse serait une des causes de cette augmentation. En effet, les populations occidentales consomment aujourd'hui plus d'acide gras saturé  $\omega$ -6 que  $\omega$ -3,

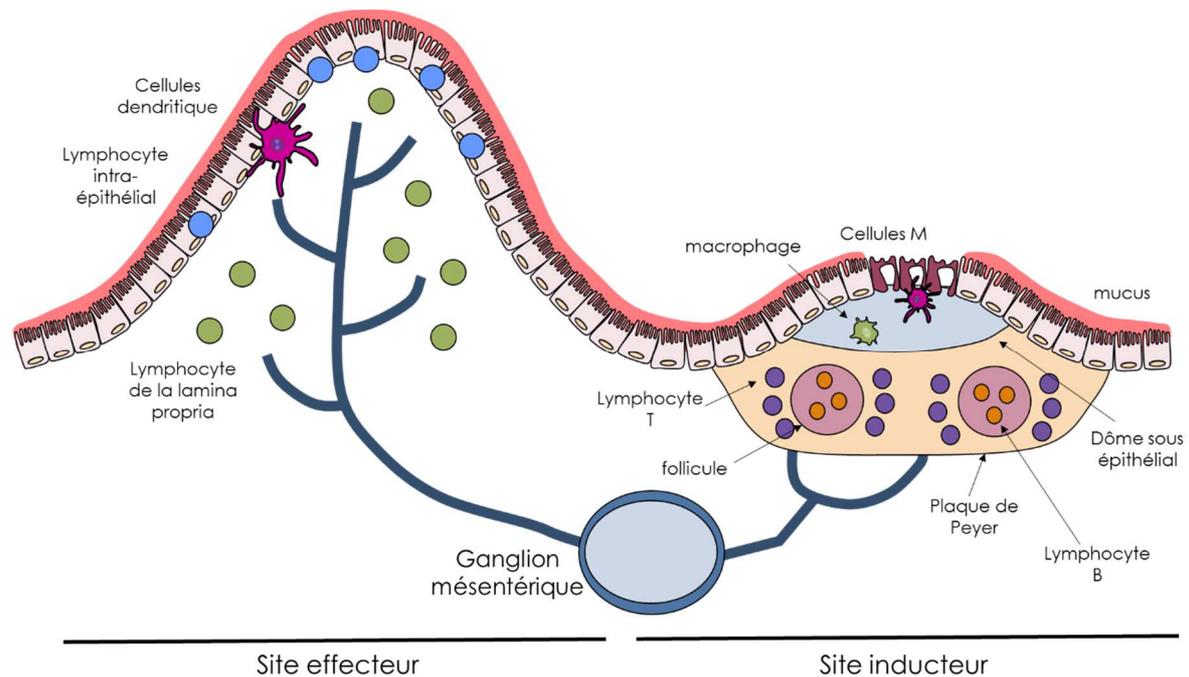
entraînant un déséquilibre entre ces deux types d'acide gras. Les acides gras  $\omega$ -6 sont en effet à l'origine de la synthèse des prostaglandines  $E_2$ , connues pour leurs propriétés pro-inflammatoires notamment sur les TH17 (Boniface et al., 2009; Devereux & Seaton, 2005) . Par ailleurs l'influence de l'obésité sur les allergies a également été étudiée. L'obésité induit un état inflammatoire général de l'organisme qui pourrait entraîner une augmentation du risque de développer des allergies alimentaires. Une étude a ainsi montré que l'atopie était plus fréquente chez les enfants obèses (Visness et al., 2009) .

## 2) Le mécanisme de l'allergie alimentaire

### *2.1) Le GALT et la tolérance orale*

#### 2.1.a) Le tissu lymphoïde associé au tube digestif (GALT)

Le tractus gastro-intestinal est le plus large réservoir de cellules immunitaires du corps humain. Sa fonction principale est de protéger l'organisme des pathogènes extérieurs, qui sont directement en contact avec l'épithélium intestinal. Il est séparé du lumen par une seule couche de cellules épithéliales constituant une véritable barrière contre le milieu extérieur. Ces cellules sécrètent de nombreux facteurs contribuant à cet effet barrière dont les mucines, des peptides antimicrobiens ou encore des immunoglobulines A (IgA) (Berin & Sampson, 2013) . Il peut être divisé en sites inducteurs et site effecteurs. Les sites inducteurs sont constitués du GALT (gut-associated lymphoid tissue), des plaques de Peyer et des ganglions mésentériques. Les sites effecteurs sont constitués de la lamina propria et de l'épithélium (Pabst & Mowat 2012; Brandtzaeg et al. 2008). Le GALT est une structure indispensable dans le processus de reconnaissance et de capture des antigènes tels que les bactéries et les virus. Des cellules spécialisées appelées microfold ou cellules M, présentes dans l'épithélium intestinal sont considérées comme lieu stratégique pour le transport des antigènes du lumen vers les organes lymphoïdes secondaires (Pabst & Mowat, 2012) . Cependant le système immunitaire, exposé quotidiennement à une importante quantité de protéines, doit faire le tri entre pathogènes réels, antigènes inoffensifs et bactéries commensales. Cet état de non-réponse du système immunitaire est appelé tolérance orale et intervient lorsque les cellules immunitaires sont confrontées à des antigènes non pathogènes comme les protéines présentes dans notre régime alimentaire. Plusieurs processus sont alors induits afin de prévenir la réponse immunitaire (Pabst & Mowat 2012). Une brèche dans la tolérance orale est à l'origine du développement des allergies alimentaires.



**Figure 2: Le Tissu lymphoïde associé au tube digestif**

### 2.1.b) La tolérance orale

La capacité d'un antigène administré par voie orale à supprimer les réponses immunitaires a été décrite pour la première fois en 1911 par OSBORNE & WELLS (Brandtzaeg, Kiyono, Pabst, & Russell, 2008; O Pabst & Mowat, 2012) . Plus tard, on a découvert que ce processus provenait de cellules lymphocytaires. L'existence de ces populations possédant un phénotype suppressif fut pour la première fois mise en évidence dans les plaques de Peyer en 1978 (Kagnoff, 1978; Ngan & Kind, 1978) . Cependant il a été montré que c'est plutôt dans les ganglions mésentériques que ce processus avait lieu puisque la mise en place de la tolérance orale est impossible après ablation de ces ganglions (Spahn et al., 2002; Worbs et al., 2006) .La tolérance orale est assurée par des cellules lymphocytaires T dites régulatrices (Treg). Chez les souris comme chez les humains, la suppression des populations régulatrices CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> entraîne l'apparition d'eczéma, des allergies alimentaires et une augmentation d'IgE (Torgerson et al., 2007) . Lors de la sélection thymique, les lymphocytes T et B reconnaissant les antigènes du soi sont naturellement éliminées par un processus de sélection négative. Certaines cellules T exprimant le facteur de transcription Foxp3 et reconnaissant les antigènes du soi avec haute affinité, deviennent ce qu'on appelle des T régulateurs naturels (nTreg). Ces deux processus de tolérance requièrent cependant l'interaction préalable des cellules lymphocytaires avec leur antigène associé. En conséquence ni la sélection négative ni les Treg naturels ne peuvent participer à la tolérance orale. D'autres mécanismes sont donc

mis en jeu, notamment l'implication des cellules présentatrices d'antigènes (Pabst & Mowat 2012). Les antigènes alimentaires se retrouvent très rapidement dans l'organisme. En effet des protéines alimentaires administrées par voie orale sont détectées dans l'épithélium intestinal et dans la lamina propria seulement quelques minutes après ingestion (Goubier et al., 2008) . Des cellules présentatrices d'antigène chargées de fragment antigénique comme les cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> sont observées chez des souris 30 à 60 min après gavage (Chirido, Millington, Beacock-Sharp, & Mowat, 2005) . Ainsi, les protéines alimentaires passent rapidement et efficacement la barrière intestinale quelques minutes seulement après leur ingestion. Des petits peptides sont susceptibles de traverser l'épithélium par voie paracellulaire à travers les jonctions serrées. Les plus grosses protéines peuvent, elles, être prises en charge par voie transcellulaire par les entérocytes (Ménard, Cerf-Bensussan, & Heyman, 2010) . Plus généralement, les antigènes sont pris en charge par des cellules présentatrices d'antigènes dont les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques CX3CR1<sup>+</sup> sont notamment connues pour étendre leurs dendrites jusque dans le lumen pour y capter les antigènes (Niess et al., 2005) . Ces cellules n'expriment pas le récepteur CCR7 et ne migrent donc pas vers les ganglions mésentériques et ne peuvent pas présenter l'antigène à des cellules T naïves (Bogunovic et al., 2009; Schulz et al., 2009) . Au contraire les cellules dendritiques migratoires CD103<sup>+</sup> présentes abondamment dans la lamina propria apportent les antigènes jusque dans les ganglions mésentériques et sont largement impliquées dans la tolérance orale. En effet, les Treg induits (CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup>) sont générés à partir de cellules TCD4<sup>+</sup> naïves qui se différencient en cellules T régulatrices sous l'effet de l'environnement inflammatoire (Hadis et al., 2011) , Ces cellules ont la capacité d'induire l'expression des récepteurs de chimiokines sur les cellules T (Jaensson et al., 2008) , et particulièrement sur les Treg. Cette induction est en partie due à la capacité de ces cellules dendritiques de métaboliser le rétinol (vitamine A) en acide rétinoïque par l'action de l'enzyme rétinol déshydrogénase (RALDH2) (Iwata et al., 2004) . Les cellules CD103<sup>+</sup> induisent ainsi l'expression des molécules CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  sur les lymphocytes T (Iwata et al., 2004) . Plusieurs études ont reporté une réduction de la tolérance orale chez des souris déficientes en  $\alpha 4\beta 7$  ou MadCam-1, son ligand (Wagner et al., 1996) ou encore chez les souris déficientes en CCR9 (Cassani et al., 2011) . Cette tolérance peut néanmoins être restaurée par transfert adoptif de cellules Treg de souris sauvages (Cassani et al., 2011) . Ainsi la tolérance orale requerrait l'expression des molécules de domiciliation cellulaire par Treg induits, lors de leur passage dans les ganglions mésentériques.

## *2.2) Le mécanisme immunitaire de l'allergie IgE-médiée*

### 2.2.a) La sensibilisation

La première phase de la réponse allergique est la sensibilisation. Lorsque l'allergène alimentaire est ingéré et passe au niveau de l'épithélium intestinal, il est pris en charge par une cellule présentatrice d'antigène (APC). Cette cellule va alors le phagocyter et le réduire en fragments antigéniques, qui après la migration de la cellule vers les ganglions mésentériques, seront présentés aux cellules T CD4<sup>+</sup> naïves dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Des molécules de costimulation CD80/CD86 et CD28 portées par les T ainsi que les molécules d'adhérence LFA-1 et ICAM-1 sont nécessaires afin d'engager la synapse immunologique entre le CMH II et le récepteur T (TCR). En parallèle, les cellules épithéliales produisent différentes cytokines et chimiokines tel que la TSLP, l'IL-33, l'IL-25 ou les TNF, qui créent un environnement pro-TH2 propice au développement de la réponse allergique (Lambrecht & Hammad, 2015) . Sous l'effet de ces différents stimuli, les cellules T naïves vont se différencier en lymphocytes de type TH2 produisant majoritairement les cytokines IL-4, IL-5 et IL-13. La liaison entre la molécule OX40 présente sur les cellules dendritiques et son ligand entraîne la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes TH2 (Berin & Shreffler, 2008) . Les TH2 ainsi que les cytokines sécrétées vont induire la commutation de classe des cellules B activées, qui vont alors sécréter des IgE et perdre leur marqueur de surface CD20 (Boyman et al., 2015) . Les IgE vont alors se fixer sur leur récepteur de haute affinité FcεRI présent sur les mastocytes et les basophiles, afin de préparer le complexe immun créé lors d'une exposition ultérieure (Gould & Sutton, 2008) .

### 2.2.b) Le challenge

Chez les patients allergiques, la réexposition à un allergène alimentaire induit la création du complexe entre les IgE et le récepteur FcεRI et l'allergène sur les mastocytes et les basophiles. Cette fixation entraîne en quelques minutes la sécrétion de nombreux médiateurs chimiques tels que l'histamine, les leucotriènes, les prostaglandines, des tryptases et des protéases (Galli & Tsai, 2012; Johnston, Chien, & Bryce, 2014) . D'autres cellules sont également recrutées sur le site d'inflammation par l'intermédiaire de leurs récepteurs de chimiokines comme CCR4 pour les TH2, attiré par ses ligands CCL22 et CCL17 produits par les tissus, les éosinophiles, stimulés par la production d'IL-5, ou encore les TH17 produisant de l'IL-17 et de l'IL-22, permettant le recrutement des neutrophiles (Boyman et al., 2015) . Plus récemment le rôle de

l'IL-33 et de son récepteur ST2 a également été montré dans l'allergie. En effet, l'IL-33 ne cause pas directement la dégranulation des mastocytes mais intervient dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-13 (Hsu, Neilsen, & Bryce, 2010) , et dans l'altération de la barrière épithéliale (Boyman et al., 2015) . L'IL-4, l'IL-13 et l'IL-9 sont également à l'origine de la stimulation des macrophages (macrophages M2). Tous ces acteurs immunitaires induisent des réactions inflammatoires entraînant une vasodilatation, une contraction des muscles lisses et une surproduction de mucus (Galli & Tsai, 2012) . Le récepteur de basse affinité CD23 est également impliqué dans l'amplification de la réponse allergique IgE spécifique. En effet, CD23 est exprimé par les cellules épithéliales intestinales et les lymphocytes B et peut réguler de manière positive la production d'IgE (Gould & Sutton, 2008) . Par exemple, l'expression de CD23 par les cellules épithéliales permet d'amplifier la réponse allergique en stimulant le passage du complexe IgE-antigène à travers l'épithélium par voie transcellulaire (Palaniyandi, Tomei, Li, Conrad, & Zhu, 2011) . Une fois dans la lamina propria, les IgE peuvent alors se fixer sur leur récepteur de haute affinité. De plus l'IL-4 et l'IL-13 peuvent stimuler la production de CD23 et ainsi faciliter la capture de l'antigène (W. Yu, Freeland, & Nadeau, 2016) .

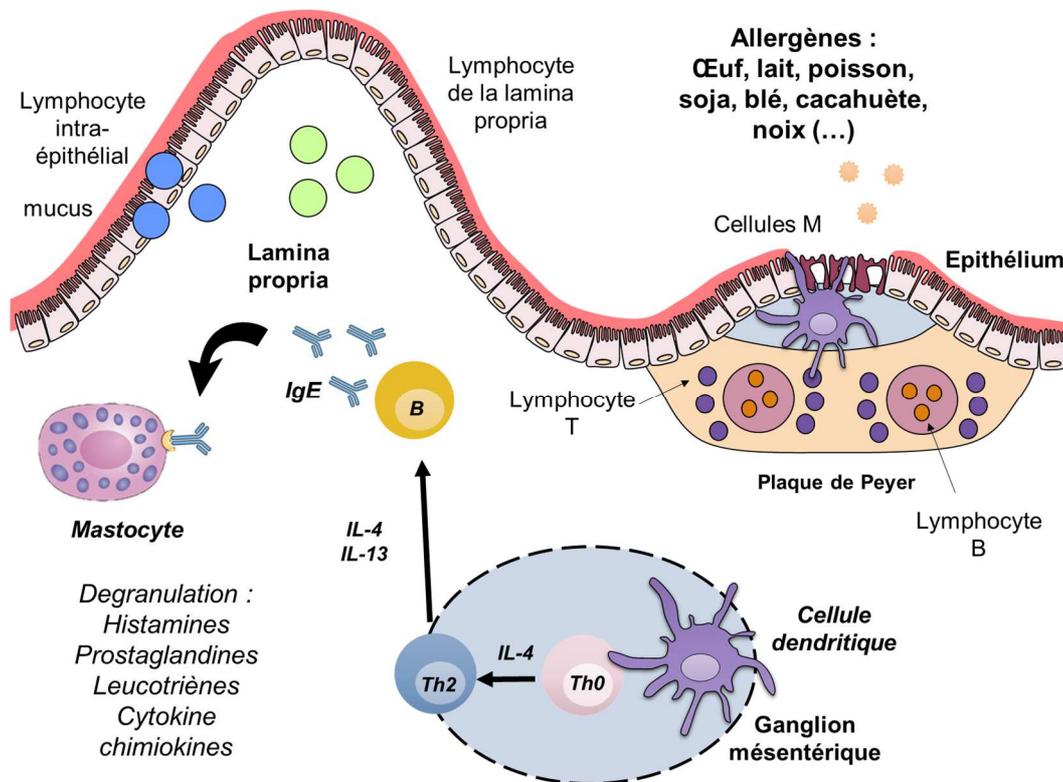
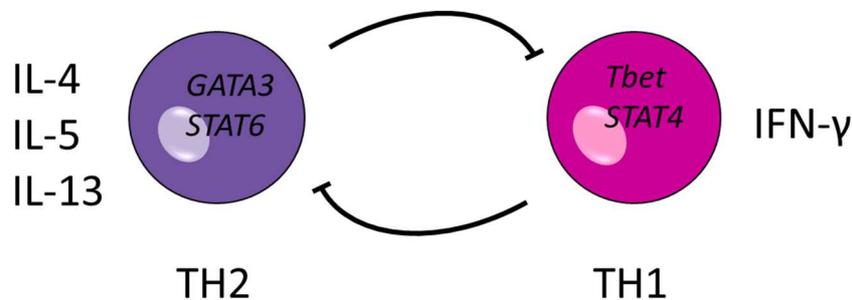


Figure 3: Le mécanisme immunitaire de l'allergie alimentaire

### 2.2.c) Le paradigme TH1/TH2

Le paradigme ou la balance TH1/TH2 est un concept élaboré dans les années 90 qui a marqué l'histoire de l'allergologie (Maggi, 1998) . Après la découverte des sous populations TH1 et TH2 et de l'implication des TH2 dans l'allergie, il a été postulé que l'allergie résulte d'une modification de la balance TH1/TH2 en faveur des TH2. Ce changement s'illustre d'une part par une diminution des cytokines de la réponse TH1 telle que l'IL-12 ou IFN- $\gamma$  et par la réduction de l'activité immunosuppressive des cellules Tregulatrice. Les TH1 sont les cellules immunitaires consacrées à la défense contre les micro-organismes (bactéries, virus) et sont impliqués dans les maladies auto-immunes : on parle de réponse cellulaire. Les TH2 pour leur part sont impliqués dans la défense contre les parasites et dans les maladies allergiques : on parle alors d'immunité humorale (Mosmann & Sad, 1996) compte tenu de l'importance des anticorps dans ce processus. Par ailleurs ce concept s'accorde largement avec la théorie de l'hygiène. En effet la dérégulation de la balance TH1/TH2 est associée au manque de diversité microbienne, ce qui ne « sollicite » donc pas assez le sous-type TH1. A l'inverse la présence d'infection chez le jeune enfant favorise les réponses TH1 aux dépens des réponses TH2. La découverte de nouveaux sous types cellulaires comme les TH17 ou les cellules lymphoïdes innées, ou encore la présence des Treg, complexifient les mécanismes de l'allergie et démontrent que le concept de balance TH1/TH2 est réducteur. En effet, les TH17 sont aujourd'hui connus pour avoir un rôle dans les maladies allergiques comme le psoriasis (Di Cesare, Di Meglio, & Nestle, 2009) ou la dermatite atopique (Koga, Kabashima, Shiraishi, Kobayashi, & Tokura, 2008) , mais aussi l'asthme dans les formes les plus sévères (Chesné et al., 2015) .



**Figure 4: La balance TH1/TH2**

### 3) Voie de traitement et prévention de l'allergie alimentaire

#### 3.1) L'éviction

Il n'y a pas aujourd'hui de véritable traitement à l'allergie alimentaire. L'éviction reste le seul réel traitement avec l'emploi d'adrénaline en cas d'ingestion, avant les manifestations graves. L'adrénaline peut annuler l'effet d'un œdème, de l'urticaire, de la bronchoconstriction ou de l'hypotension en quelques minutes si elle est prise à temps. Un traitement rapide moins de 6 minutes après ingestion avec de l'adrénaline est en effet plus efficace qu'une prise 20 minutes après ingestion de l'allergène. La rapidité de la prise du traitement est donc un point crucial dans le traitement de la crise allergique (Ho, Wong, & Chang, 2014) . Cependant l'éviction ne représente pas un traitement curatif et le patient s'expose à un risque non négligeable d'ingérer accidentellement l'allergène. Par ailleurs la gestion du traitement d'éviction est lourde et selon l'allergène, il peut être difficile à respecter. Il peut être en effet très difficile de trouver des aliments qui ne contiennent pas certains allergènes comme les œufs, le blé ou l'arachide. 50% des enfants allergiques ont reporté une ingestion accidentelle de l'allergène 5 ans après leur diagnostic et 75% d'entre eux après 10 ans (Luyt, Ball, Kirk, & Stiefel, 2016) .

#### 3.2) L'immunothérapie orale

L'immunothérapie permet de désensibiliser un patient à un allergène alimentaire en lui donnant de faibles doses croissantes (mg) de l'allergène quotidiennement sur une période de plusieurs mois afin de l'habituer à l'allergène et d'empêcher toute réponse allergique lorsqu'il ingèrera des traces dans certains aliments. L'immunothérapie représente aujourd'hui un progrès majeur dans le traitement des allergies car il permet aux patients d'ingérer de faibles doses de l'allergène sans prendre de risque ou d'empêcher une réaction qui pourrait être mortelle après une ingestion accidentelle (W. Yu et al., 2016) . Le premier essai clinique de désensibilisation par immunothérapie orale a été publié en 2005 ; les patients recevaient alors de faibles doses de noisette par voie sublinguale (Enrique et al., 2005) . Aujourd'hui de nombreux patients peuvent prendre part à des essais d'immunothérapie orale au sein des CHU.

### 3.4) La prévention par les probiotiques et les prébiotiques

S'il est encore aujourd'hui compliqué de traiter les allergies alimentaires, c'est bien vers la prévention qu'il faut se tourner afin d'empêcher leur apparition. Plusieurs essais cliniques ont ainsi étudié l'effet des probiotiques et des prébiotiques sur le développement des allergies. Les probiotiques sont « un ou un mélange de plusieurs micro-organismes vivants qui, ingérés par un hôte, améliorent sa santé en agissant sur les propriétés de la flore microbienne » (Gibson et al., 2017; O'Sullivan, Thornton, O'Sullivan, & Collins, 1992). Les probiotiques sont généralement retrouvés naturellement dans les produits alimentaires fermentés (yaourt, lait, viande...) mais ils sont aujourd'hui ajoutés dans d'autres produits afin d'augmenter les propriétés bénéfiques de l'aliment pour la santé du consommateur. Les bactéries du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont les probiotiques les plus connus et les plus utilisés en industrie agro-alimentaire (Farnworth, 2008). Chez la souris, l'administration de probiotique en périnatal (gestation et/ou allaitement) (Saliganti, Kapila, Sharma, & Kapila, 2015) ou directement dans le régime alimentaire (Velez et al., 2015) réduit le développement de la réponse allergique dans des modèles d'allergie alimentaire à l'ovalbumine (OVA). L'administration orale de probiotique (*Lactobacillus plantarum*) diminue également le développement des lésions cutanées dans un modèle de dermatite atopique spontanée sur des souris NC/Nga (Kim et al., 2015). Enfin dans un modèle d'asthme allergique à l'ovalbumine, des souris Balb/c supplémentées en probiotique (*Lactobacillus rhamnosus*) dès leur naissance présentent une diminution de nombre d'éosinophiles, une diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une inflammation pulmonaire réduite (Harb et al., 2013). Chez l'humain, des probiotiques (*Lactobacillus GG*) ont été donnés en périnatal aux mères allergiques et à leurs enfants 6 mois après la naissance. La prévalence de l'eczéma dans le groupe d'intérêt a alors diminué de moitié (23% contre 46% pour le groupe placebo) (Isolauri, Arvola, Sütas, Moilanen, & Salminen, 2000; Kalliomäki et al., 2001). Dans une étude également faite sur des mères en périnatal, des probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus GG*, *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium animalis*) ont été donnés à des femmes enceintes et jusqu'à trois mois après l'accouchement. A l'âge de 6 ans, les auteurs retrouvent une incidence plus faible de la dermatite atopique dans le groupe traité ( $p=0.027$ ). En revanche la prévalence de l'asthme et de la rhinite allergique n'a pas été significativement modifiée par le régime enrichi en probiotique (Simpson, Dotterud, Storrø, Johnsen, & Øien, 2015). Une autre étude a analysé l'incidence de l'administration de probiotique (*Lactobacillus rhamnosus*) dans un essai d'immunothérapie orale à la cacahuète chez des enfants de 10 ans. Le groupe traité (cacahuète + probiotique) présente une réduction des réponses après test cutané (skin prick test) à la cacahuète, une diminution du taux d'IgE spécifique de la cacahuète et une

augmentation du taux d'IgG4 (Tang et al., 2015). Une méta-analyse faite sur la supplémentation en probiotique chez des femmes pendant la grossesse, durant l'allaitement ou chez de jeunes enfants a démontré que les probiotiques réduisaient uniquement le risque de dermatite atopique mais aucune n'étude ne montre clairement une incidence sur toute autre forme d'allergie (Cuello-Garcia et al., 2015). Les prébiotiques sont « des ingrédients alimentaires non digestibles qui exercent un effet bénéfique sur l'hôte en stimulant de façon sélective la croissance et/ou l'activité d'une ou de plusieurs espèces bactériennes déjà établies dans le colon, et ainsi améliorent la santé de l'hôte » (Gibson et al., 2017; Roberfroid, 2007) . Les seuls composés réellement reconnus comme prébiotiques sont l'inuline, le lactulose et les galacto- et fructo-oligosaccharides (Roberfroid, 2007) . Plusieurs études ont montré que la supplémentation en prébiotiques chez l'homme ou chez la souris protège contre le développement des allergies. Chez la souris, il a été montré dans plusieurs études que la supplémentation en prébiotiques en périnatal et/ou durant les premières semaines de la vie, protégeait contre le développement d'allergies. La supplémentation des souris en prébiotiques (galacto-oligosaccharide et inuline) durant les premières semaines de vie a diminué l'asthme allergique dans des modèles d'asthme à l'OVA ou HDM (Trompette et al., 2014; Vos et al., 2007) . Enfin la supplémentation en prébiotiques (oligosaccharides et inuline) des mères gestantes et/ou durant l'allaitement réduit la sensibilisation et le développement d'allergie alimentaire à l'OVA et au blé chez les souriceaux (Hogenkamp, Knippels, Garssen, & Esch, 2015) . Chez l'humain, une étude faite sur 259 enfants à risque d'atopie a montré que la supplémentation en galacto et fructo-oligosaccharides durant les 6 premiers mois de la vie diminue la prévalence de la dermatite atopique (Arslanoglu et al., 2008; Moro et al., 2006) . Dans une étude de notre groupe, des mères BALB/c ont été supplémenté avec de l'inuline et des galacto-oligosaccharide (ratio 1:9) tout le long de leur gestation et pendant la lactation. Les souriceaux soumis à un protocole d'allergie alimentaire semblent être protégé contre le développement de la réponse allergique par rapport aux souriceaux non supplémentés en prébiotiques (Bouchaud et al., 2016) .

### POINTS CLES

- Le lait, l'œuf, la cacahuète, les noix, le soja, les fruits de mer et le poisson constituent les allergènes alimentaires majeurs
- Les symptômes des allergies alimentaires sont très variés et multi-organes : ils peuvent affecter la peau, l'intestin, la gorge ou les voies respiratoires
- L'allergie alimentaire est une brèche dans la tolérance orale caractérisée par une augmentation des IgE spécifiques de l'allergène et une réponse TH2 plus importante
- La prévalence des allergies alimentaires est estimée entre 5 et 7% chez les enfants et à 2% chez les adultes
- Il n'existe pas aujourd'hui de réel traitement aux allergies alimentaires

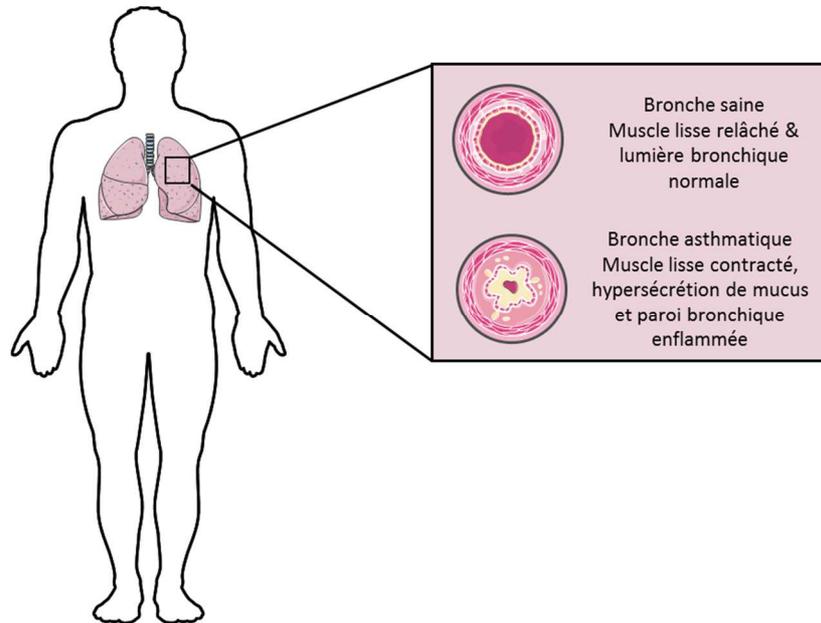
## II. L'asthme

### 1) Définition et prévalence

#### 1.1) Définition et symptômes

L'asthme est une maladie chronique inflammatoire des bronches. C'est la maladie chronique la plus répandue dans le monde. Cette inflammation est accompagnée d'une hyperréactivité bronchique (HRB) favorisant la bronchoconstriction, induisant des sifflements, une dyspnée, une oppression thoracique et de la toux. L'asthme est également caractérisé par un épaississement de la paroi des voies aériennes et par une augmentation de la production de mucus par les cellules épithéliales. Cela augmente la dyspnée, favorise la toux et définit le remodelage bronchique. Les symptômes de l'asthme peuvent être variables d'un patient à l'autre ( Global Atlas of Asthma, 2013) . Afin de diagnostiquer l'asthme, plusieurs tests sont pratiqués comme la spirométrie qui permet de mesurer le volume expiré maximal par seconde (VEMS) qui correspond à la quantité d'air expiré au cours de la première seconde d'une expiration forcée. Le VEMS est diminué dans l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) qui comporte aussi une obstruction bronchique ( Global Atlas of Asthma, 2013) . Lorsque la spirométrie est normale, en dehors des symptômes, l'asthme peut être diagnostiqué en mettant en évidence l'HRB au cours d'un test à la métacholine. L'asthme peut être grave, 400 000 décès ont été comptabilisés dans le monde en 2015 (GBDS, 2017) . Dans le cas de l'asthme sévère, la maladie induit un handicap respiratoire important, avec une dégradation de la qualité de vie, un absentéisme scolaire et au travail et des hospitalisations répétées. Ainsi l'asthme génère des coûts directs et indirects importants pour la société. Les coûts directs sont caractérisés par la prise en charge des hospitalisations, les visites en urgence, les tests de diagnostics, les traitements médicaux etc., alors que les coûts indirects s'illustrent par l'impact sur le travail comme la perte de productivité, l'accumulation des jours de congés etc. Une étude a mis en évidence le poids économique important de l'asthme des adultes aux Etats-Unis, même en dehors de l'asthme sévère. Sur une cohorte de 50000 adultes, 2000 d'entre eux soit 4% ont rapporté souffrir d'asthme. Ces sujets étaient plus fréquemment en congé maladie avec en moyenne 1.4 jour de plus d'absence par an que les sujets sains. Par ailleurs, les patients asthmatiques ont généré 2000\$ de plus de prise en charge médicale par personne (Sullivan et al., 2011) . En Europe, une étude a mesuré les charges économiques de l'asthme sur 462 patients adultes diagnostiqués asthmatiques de 11 pays européens différents. La moyenne totale des coûts par an s'élevait à 1500 euros par patient en comptant les coûts directs et indirects. Le coût total des 11 pays représentés étaient de 4.3 milliards d'euro par an ramenés à 19.3 milliards d'euros sur la totalité du continent

européen (Accordini et al., 2012) . En 2003, il a été estimé que l'asthme génère en Europe et aux USA un surcoût de 18 milliards de dollars par an ( Global Atlas of Asthma, 2013) .



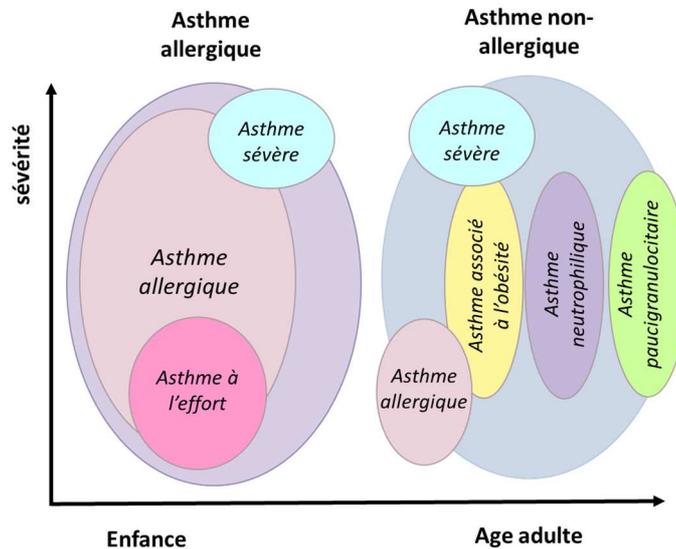
**Figure 5: Caractéristiques de l'asthme**

## 1.2) Les différents phénotypes d'asthme

Le terme phénotype est défini ici comme « les propriétés observables d'un organisme qui sont produites par les interactions entre le génotype et l'environnement » (Wenzel, 2012) . Ainsi, le phénotype d'une maladie est la description de ses caractéristiques observables sans tenir compte des particularités physiopathologiques. En revanche, l'endotype décrit les sous-types physiopathologiques particuliers de la maladie. Les phénotypes d'asthme décrivent les particularités cliniques et morphologiques ainsi que les réponses aux traitements ; les différents endotypes caractérisent les sous-types en fonction des mécanismes cellulaires et moléculaires (Agache, Akdis, Jutel, & Virchow, 2012) . Récemment, l'approche mathématique et statistique permettant l'analyse de larges cohortes de patients en « cluster » ou l'analyse en composantes principale (ACP) a permis l'émergence de plusieurs endotypes d'asthme chez les adultes comme chez les enfants (Agache et al., 2012; Haldar et al., 2008) . Un programme d'étude de l'asthme sévère aux Etats-Unis, le SARP (Severe Asthma Research Program) a publié une étude sur deux groupes de patients asthmatiques classés respectivement comme sévère et modéré. L'analyse de différents paramètres tels que la réactivité bronchique en réponse à la métacholine, le taux d'IgE dans le sang, le taux d'éosinophiles dans le sang ou encore la mesure du NO (nitric oxide) expiré, a permis de

différencier ces patients selon leur profil inflammatoire (Wenzel, 2012; Woodruff et al., 2009) . L'asthme peut être catégorisé en deux grands phénotypes introduit par Rackemann en 1947 (RACKEMANN, 1947) : l'asthme extrinsèque dit asthme allergique et l'asthme intrinsèque dit non allergique. L'asthme extrinsèque est un asthme précoce qui arrive dès l'enfance, généralement chez des patients atopiques ; il est caractérisé par une forte réponse de type TH2, une hyperéosinophilie bronchique et parfois sanguine et un niveau élevé d'IgE. Il est également caractérisé par une hyperplasie des cellules productrices de mucus, une altération globale de l'épithélium bronchique et une hypertrophie des cellules musculaires lisses (Agache et al., 2012) . Cet asthme est généralement associé à d'autres maladies atopiques comme la rhinite allergique ou la dermatite atopique. En effet, 40% des personnes souffrant de ce type d'asthme possèdent des antécédents de dermatite atopique alors que seulement 4% des patients avec un asthme non allergique ont eu une dermatite atopique (Haldar et al. 2008 ; Wenzel 2012). Par ailleurs ces personnes présentent des taux supérieurs en cytokines de type TH2 et plus de mastocytes (Humbert et al., 1996) . Les cytokines de type TH2 (IL-4, IL-5, IL-13), le nombre d'éosinophiles dans les crachats supérieur à 2% du total, ou encore les élévations du taux de periostine (Woodruff et al. 2009) sont reconnus comme des marqueurs de ce type d'asthme. L'asthme intrinsèque se manifeste à l'âge adulte, vers 40 ans chez des patients non allergiques. Il est également caractérisé par une réponse de type TH2 et une hyperéosinophilie mais les tests cutanés sont en règle générale négatifs pour les pneumallergènes. Ces patients présentent généralement un asthme plus sévère, parfois associé avec une polypose naso-sinusienne. D'autres patients présentent un asthme non allergique et non éosinophilique avec une inflammation de type paucigranulocytaire. Ces patients sont souvent résistants aux corticoïdes : ils représentent ainsi une frange de la population asthmatique difficile à traiter et non contrôlés. On retrouve dans cette catégorie l'asthme de l'obèse. En effet, l'obésité étant une maladie inflammatoire générale, elle est souvent associée à de nombreuses comorbidités. Les patients obèses sont généralement plus essouffés, souffrent de reflux gastro-oesophagien ou sont sujets à un affaiblissement des muscles, tous ces paramètres pouvant ressembler à de l'asthme et en compliquer l'expression clinique (Pakhale et al., 2010) . Enfin certains patients manifestant des symptômes de crise d'asthme après l'effort possède un asthme appelé asthme induit par l'effort ou EIA (exercice induced asthma) (Wenzel, 2012) . Cet asthme a également été associé à des antécédents d'allergie et à des pourcentages plus élevés d'éosinophiles dans les crachats. L'asthme sévère peut donc apparaître dans les deux grands phénotypes. Une étude de WENZEL en 1999 catégorise l'asthme sévère en deux grands groupes : l'asthme sévère éosinophilique (+) et l'asthme sévère non éosinophilique (-) en se basant sur le statut inflammatoire des patients (WENZEL et al., 1999) . Le groupe éosinophilique + présentent des caractéristiques classiques de l'asthme avec un niveau élevé d'éosinophiles malgré les traitements par corticostéroïdes.

Par ailleurs le pourcentage de neutrophiles est significativement élevé dans le groupe éosinophiles – comparé au groupe éosinophile +. Ainsi en se basant sur la prédominance d'une population cellulaire on peut distinguer trois phénotypes d'asthme : l'asthme éosinophilique, l'asthme neutrophilique et l'asthme paucigranulocytaire (Wenzel, 2001) .

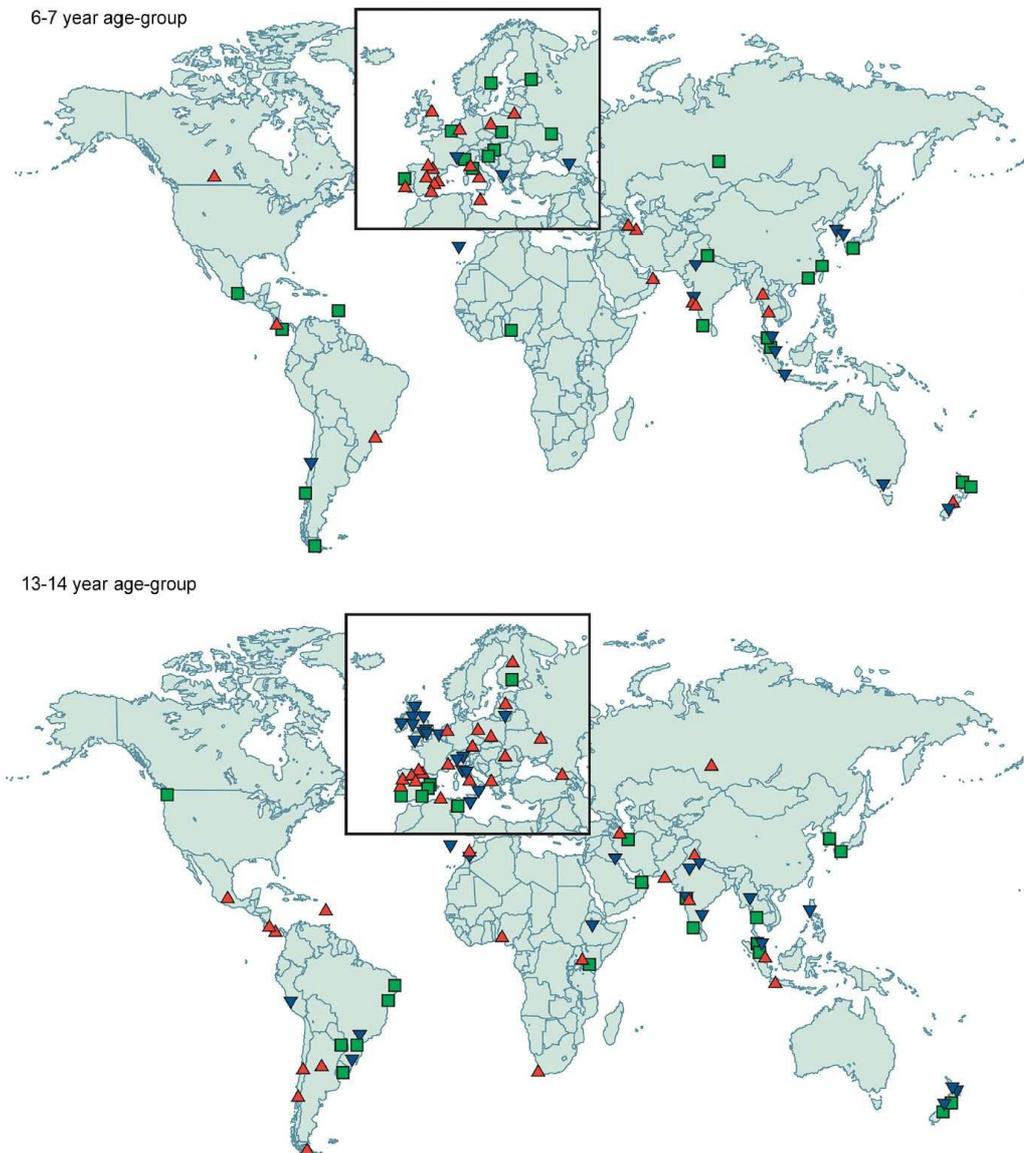


**Figure 6: Les différents phénotypes d'asthme. D'après WENZEL, Nature Medecine, 2012 et WENZEL, Lancet, 2001**

### 1.3) Les données de prévalence

Le projet ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), démarré en 1991 a pour but d'évaluer et de quantifier la prévalence de l'asthme de l'enfant chez deux populations : les 6/7 ans et les 13/14 ans. Suivi par plus de 100 pays, le projet ISAAC a recruté près de 2 millions d'enfants sur les 25 dernières (Asher et al., 1995) . Les données ont permis d'observer une augmentation de la prévalence de l'asthme dans la plupart des pays de 1993 à 2003 mais elle reste inchangée dans les pays industrialisés qui avaient déjà une forte prévalence (Asher et al., 2006) . La prévalence de l'asthme chez les enfants de 6 et 7 ans en Europe occidentale est alors estimée au minimum à 7.4% en Autriche et au maximum à 20.9% au Royaume-Uni. Pour les enfants de 13 et 14 ans elle est respectivement de 8.3% en Belgique et de 26.7% en Irlande (Asher et al., 2006) . Chez les adultes, plusieurs études ont analysé la prévalence de l'asthme. L'organisation mondiale de la santé a ainsi lancé dans les années 2000 une vaste étude sur 70 pays, analysant la prévalence de l'asthme d'une population âgée de 18 à 45 ans (World Health Survey). La proportion de l'asthme diagnostiqué, de l'asthme traité et de l'asthme auto-reporté est respectivement de 4.3%, 4.5% et 8.6% (To et al., 2012) . Cette étude renforce le fait que l'asthme continue d'être un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. L'étude GAALLEN (Global Allergy and Asthma Network

of Excellence) a suivi une population âgée de 18 à 75 ans sur 15 pays Européens dans les années 2008 et 2009. La prévalence de l'asthme en France est ainsi estimée à 10.3% (Jarvis et al., 2012) . On estime aujourd'hui que l'asthme atteint ainsi 300 millions de personnes dans le monde (Bousquet et al., 2010) .



**Figure 7: Analyse de la prévalence de l'asthme chez les 6/7 ans et les 13/14 ans.** Triangle bleu: réduction de la prévalence supérieure à un écart-type par an. Carré vert: pas de changement de la prévalence. Triangle rouge: augmentation de la prévalence d'au moins un écart-type par an.  
D'après ASHER, Lancet, 2006

### 1.4) *Facteurs de risque*

L'apparition de l'asthme est fortement associée à des facteurs de risque environnementaux ou génétiques. En effet, il est reconnu aujourd'hui que des populations possédant un patrimoine génétique semblable peuvent présenter un taux d'asthme très différent en fonction de leur lieu de résidence. Par exemple, la population rurale de Chine possède un taux très faible d'asthme (1.25%) tandis qu'à Pékin, à tout juste 200 km, la prévalence de l'asthme est de 3.68% (Zhu et al., 2015) . Un exemple intéressant est celui de la Carélie, région coupée en deux parties à la fin de la Seconde Guerre Mondiale, une Russe et une Finlandaise. La prévalence de l'asthme est très différente entre les deux parties. En effet, si la Carélie Russe a un mode de vie traditionnel, la partie Finlandaise a adopté un mode de vie plutôt occidental. La prévalence de l'asthme en Carélie Finlandaise est 5.5 fois supérieure à celle retrouvée en Carélie Russe (Laatikainen et al., 2011) . Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse hygiéniste qui établit un lien entre le manque d'exposition microbienne retrouvé notamment dans les pays occidentaux et l'élévation de la prévalence des maladies allergiques. La pollution est également un facteur de risque connu et avéré de l'asthme. En effet la pollution urbaine est un des facteurs expliquant l'augmentation importante de la prévalence de l'asthme dans les pays les plus développés. Des études montrent que les enfants vivant entre 100 et 500 mètres des zones de trafic routier ont plus de risque de développer de l'asthme (Guarnieri & Balme, 2014) . Un autre facteur aggravant est la fumée de cigarette, et particulièrement pour les personnes exposées dès leur plus jeune âge ou in utero, par exposition indirecte de la mère. Le risque de développer de l'asthme est plus important chez les personnes qui fument. Une étude en Ecosse a montré que l'interdiction de fumer dans les lieux publics a permis une réduction des admissions à l'hôpital pour exacerbation de l'asthme (Mackay, Haw, Ayres, Fischbacher, & Pell, 2010) . Enfin l'obésité a été associée avec la prévalence et la sévérité de l'asthme. Une meta-analyse a montré que le surpoids et l'obésité (IMC respectivement supérieur à 25 et supérieur à 30), étaient corrélés à l'incidence de l'asthme avec un odd ratio de 1.51 (intervalle de confiance 1.27–1.80) (Beuther & Sutherland, 2007) . Une étude sur des enfants et des adolescents de 6 à 19 ans a montré que le surpoids, l'obésité et l'obésité morbide sont associés à l'asthme avec des odd ratio de 1.22 (IC 1.20-1.24), 1.37 (IC 1.34-1.40) et 1.68 (IC 1.64-1.73) respectivement (Black, Smith, Porter, Jacobsen, & Koebnick, 2012) . L'obésité peut potentialiser l'asthme et sa sévérité. En effet l'obésité est un syndrome métabolique touchant l'organisme dans son ensemble. Tout d'abord, l'expansion du tissu adipeux au niveau thoracique réduit le volume résiduel pulmonaire et limite le débit ventilatoire. Enfin, les symptômes de l'asthme sont plus sévères chez les obèses et les traitements moins efficaces. En effet, le tissu adipeux présente une infiltration supplémentaire

de macrophages et de mastocytes, induisant une réponse pro-inflammatoire et une surproduction de cytokine et d'adipokine (Lugogo, Bappanad, & Kraft, 2011; Lugogo, Kraft, & Dixon, 2010) .

## 2) Mécanisme de l'asthme

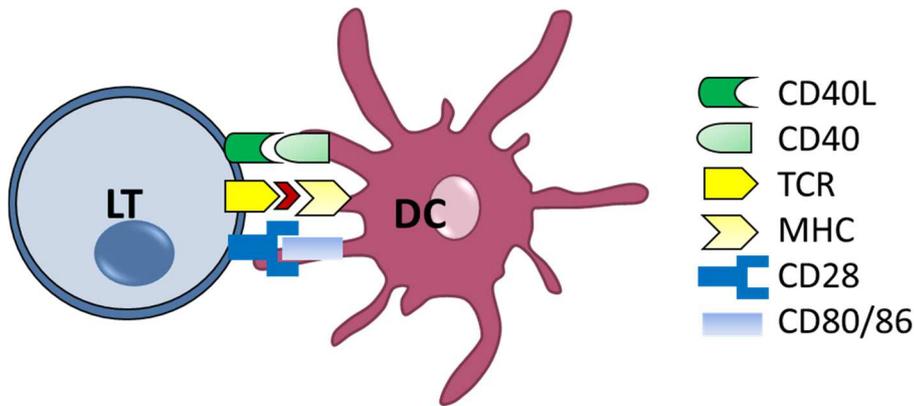
### *2.1) L'infiltrat cellulaire*

Le mécanisme de l'asthme allergique suit les mêmes étapes que le mécanisme de l'allergie alimentaire. Il débute par la sensibilisation des lymphocytes à un allergène aéroporté, capturé par des cellules présentatrices d'antigène telles que les cellules dendritiques, localisées au niveau du sous épithélium muqueux. La capture de l'antigène est un processus actif, facilité par la sécrétion de nombreux facteurs chimioattractants par les cellules épithéliales bronchiques tels que CCL20, CCL19 et CCL27 les ligands respectifs de CCR6, CCR7 et CCR10, exprimés par les cellules dendritiques. La liaison des récepteurs de chimiokines à ces facteurs induit la migration des cellules dendritiques vers l'épithélium (Hammad et al., 2010) . Les cellules dendritiques ont la capacité de digérer les antigènes afin de les fragmenter en peptides courts, qui seront présentés par la suite dans le contexte du CMH aux récepteurs TCR et BCR des lymphocytes T et B (Holgate, 2012; Medoff, Thomas, & Luster, 2008) . Une fois les cellules dendritiques matures et activées, elles peuvent migrer vers les ganglions lymphatiques où elles sensibilisent les lymphocytes. Les lymphocytes T mémoires et effecteurs spécifiques de l'allergène peuvent alors sortir du ganglion lymphatique et migrer vers les tissus sous l'influence de différents facteurs. Les T mémoires peuvent alors résider à long terme et être activés en cas de réexposition à l'allergène (Medoff et al., 2008) . La réexposition au même allergène induit une rapide exacerbation des réponses pulmonaires inflammatoires. La phase précoce de la réponse arrive très rapidement, dans les 5 minutes à une heure après exposition : c'est la conséquence directe de la dégranulation mastocytaire. De nombreux médiateurs chimiques sont alors libérés et induisent une vasoconstriction et une bronchoconstriction. La phase tardive, qui arrive quelques heures plus tard est caractérisée par l'infiltration de cellules inflammatoires (Islam & Luster, 2012; Muro, Minshall, & Hamid, 2000) . Plusieurs études ont démontré qu'après un challenge respiratoire à un allergène, les lymphocytes T ne prolifèrent pas in situ mais sont recrutés à partir des ganglions lymphatiques vers les bronches (Harris, Watt, Ronchese, & Le Gros, 2002). Ainsi les stratégies thérapeutiques visant les récepteurs de chimiokines et donc l'inhibition du recrutement cellulaire devraient se révéler efficaces contre l'asthme.

### 2.1.a) Réponse de type TH2

Les cellules présentatrices d'antigène vont dans les ganglions lymphatiques présenter l'allergène aux cellules T naïves et stimuler leur différenciation en TH2. La présentation des peptides allergéniques aux lymphocytes T se fait par l'engagement du TCR et du CMH II ; en parallèle plusieurs molécules de co-stimulation sont nécessaires afin que la synapse immunologique se crée. Ainsi, les molécules CD80 et CD86 des cellules dendritiques se lient au CD28 présent sur les lymphocytes T, ainsi que la molécule CD40 et son ligand CD40L. La différenciation en TH2 est stimulée par la présence d'IL-4. Si les molécules de co-stimulation sont absentes, cela induit une anergie ou l'apoptose des cellules (Holgate, 2012; Rudd, Taylor, & Schneider, 2009) . Les études initiales sur des cohortes de patients asthmatiques ont montré que le challenge respiratoire induisait une augmentation du nombre de lymphocytes CD4<sup>+</sup> produisant de l'IL-4 et une augmentation de la concentration en IL-5 dans les lavages broncho-alvéolaires (Robinson et al., 1992) . Par ailleurs, les souris déficientes pour les cytokines de type TH2 présentent une inflammation des voies aériennes réduite (Brusselle et al., 1994) . Ainsi, l'asthme provoque une réaction de type TH2, avec une sécrétion des trois cytokines caractéristiques des réponses TH2 : l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'IL-4 est importante pour la différenciation et la prolifération des TH2, l'IL-5 permet le recrutement des éosinophiles, tandis que l'IL-13 possède plusieurs effets, dont un rôle central dans l'hyperréactivité bronchique et le remodelage pulmonaire (Finkelman, Hogan, Hershey, Rothenberg, & Wills-Karp, 2010) . L'IL-13 est également nécessaire dans la différenciation des cellules caliciformes et la production de mucus (Wills-Karp et al., 1998) . Le recrutement des lymphocytes de type TH2 est régulé par l'expression des récepteurs de chimiokines CCR4, CCR8 et CX3CR1. En effet une augmentation de leur expression ainsi que celle de leur ligand (CCL17 et 22, CCL1 et CX3CL1 respectivement) a été constatée dans les lavages broncho alvéolaires de patients asthmatiques ou chez des souris après challenge respiratoire (Mutalithas et al., 2010; Panina-Bordignon et al., 2001; Pilette, Francis, Till, & Durham, 2004) . Une cellule clé dans le mécanisme immunologique de l'asthme est bien sûr l'éosinophile. L'asthme est en effet caractérisé le plus souvent par une importante éosinophilie bronchique. Les éosinophiles sont recrutés par l'IL-5 ainsi que par la sécrétion par les cellules épithéliales bronchiques de chimiokines comme CCL11, CCL24 et CCL26 appartenant à la famille des éotaxines. Ces molécules se lient alors au récepteur de chimiokine CCR3 porté par les éosinophiles (Lambrecht & Hammad, 2015) . Les éosinophiles permettent d'entretenir les réponses inflammatoires par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , ou de chimiokines telles que RANTES, GM-CSF ou CXCL8 (IL-8). Ils

stimulent donc la prolifération et la différenciation des TH2 de manière indirecte et participent au recrutement de différentes cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages...) (Jacobsen, Zellner, Colbert, Lee, & Lee, 2011) .



**Figure 8: La synapse immunologique**

### 2.1.b) Les T régulateurs dans l'asthme

Chez les sujets sains, la réponse immunitaire déclenchée face à un allergène est la tolérance ; elle s'illustre notamment par l'action des cellules T régulatrices sécrétant de l'IL-10 et du TGF- $\beta$ . Les cellules T régulatrices exprimant le Foxp3 sont des cellules essentielles dans la suppression de l'inflammation dans les maladies allergiques. Dans une première étude, il a été montré que le transfert adoptif de Tregs générés *in vitro* à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves mises en présence de TGF- $\beta$ , induit la suppression de l'asthme allergique aux acariens chez la souris (Chen et al., 2003; Ray, Khare, Krishnamoorthy, Qi, & Ray, 2010) . Par ailleurs ce même transfert montre une réduction des réponses inflammatoires pulmonaires notamment par l'action de l'IL-10 et du TGF- $\beta$  (Lewkowich et al., 2005) . Cependant même s'il est clair que les Trégulateurs sont des cellules importantes dans la suppression de l'inflammation dans l'allergie chez la souris, des résultats contradictoires ont été soulevés chez l'homme. En effet, chez les patients asthmatiques le nombre de Treg retrouvés dans les expectorations et dans le sang est inférieur à celui retrouvé chez des contrôles. De plus leur activité suppressive semble réduite (Mamessier et al., 2008) . Chez les enfants asthmatiques, le pourcentage de Treg est retrouvé diminué dans les lavages broncho-alvéolaires (Hartl et al., 2007) alors que c'est plus ambigu chez les adultes. En effet, certaines études montrent une augmentation des Treg (Smyth, Eustace, Kolsum, Blaikely, & Singh, 2010) tandis que d'autre montrent une diminution des Treg dans l'asthme de l'adulte (Barczyk et al., 2014) . Ces données contradictoires sur les analyses de cohortes humaines peuvent être expliqués par le fait que les patients des essais cliniques sont souvent des patients contrôlés qui ne présentent pas alors d'inflammation en continue. Par ailleurs, chez la souris, on procède au phénotypage

cellulaire après un challenge intra-nasal ; en revanche chez l'homme le moment du prélèvement est un point déterminant qui peut faire varier le niveau de cellules Trégulatrices.

### 2.1.c) Les TH17 et les neutrophiles

Mêmes si l'asthme est régulièrement associé à l'éosinophilie, les neutrophiles jouent également un rôle, particulièrement chez les patients atteints d'asthme sévère ou tardif, présentant une inflammation mixte TH2/TH17 (Manni et al., 2014) . Les TH17 sont un type particulier de lymphocytes CD4<sup>+</sup> sécrétant la cytokine IL-17, le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et le récepteur de chimiokine CCR6 (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005) . La différenciation et la prolifération des TH17 s'effectuent sous l'influence des cytokines IL-6, IL-23 et du TGF- $\beta$ . Les patients asthmatiques présentent une augmentation de la concentration en IL-17 pulmonaire corrélée à un asthme neutrophilique et plus sévère (Molet et al., 2001) . En effet la réponse TH17 est fortement associée au recrutement des neutrophiles et à une augmentation importante de l'hyperréactivité bronchique (He, Oyoshi, Jin, & Geha, 2007; Wilson et al., 2009) . Les neutrophiles sont recrutés par l'IL-8 (CXCL8), l'IL-17, CXCL1 et CXCL2 sécrétées par les cellules épithéliales bronchiques et d'autres cellules inflammatoires (Nembrini, Marsland, & Kopf, 2009) . Par ailleurs, une augmentation de l'IL-8 et de l'IL-17 est constatée dans les expectorations induites et les biopsies bronchiques de patients asthmatiques (Bullens et al., 2006) .

### 2.1.d) Les ILC (innate lymphoid cells)

Découvertes à la fin des années 2000, les cellules lymphoïdes innées ou ILC sont un groupe de cellules immunitaires innées qui ne sont ni des T ni des B mais qui possèdent une fonction effectrice similaire. Elles ont la particularité de ne pas posséder de récepteur à antigène dépendant des gènes de recombinaison (RAG recombination activating gene) ; elles n'expriment donc pas le TCR ou le BCR et ne sont donc pas spécifiques d'un antigène (Artis & Spits, 2015) . Les ILCs répondent à divers facteurs comme les cytokines, ou des facteurs sécrétés en réponse aux PAMPs et DAMPs. Elles sont classées en trois grands groupes (ILCs 1, 2 et 3) qui reprennent les caractéristiques fondamentales des différents groupes de lymphocytes T auxiliaires, en suivant le même schéma de production cytokinique et de facteurs de transcription (Morita, Moro, & Koyasu, 2016) . Le groupe des ILCs le plus associé à l'asthme est celui des ILC2. Semblables aux TH2, les ILC2 secrètent de l'IL-5, de l'IL-13, et également de l'IL-9 et expriment le facteur de transcription GATA-3. Elles expriment en revanche très peu d'IL-4 (Spits et al., 2013) . Les ILC2 sont activés par l'IL-33, l'IL-25 et le TSLP. De par leurs caractéristiques proches des TH2, il a été à juste titre suggéré que les ILC2 pouvaient être impliquées dans l'asthme. En effet, les ILC2 sont fortement corrélées à la

voie de l'IL-33 et de son récepteur ST2, que l'on retrouve dans les mécanismes de l'asthme. Il est admis que les TH2 sont les premières cellules clés à intervenir dans l'hyperréactivité bronchique mais que les ILC2 contribuent aux réponses inflammatoires de type TH2, notamment par la voie de l'IL-33 (Kearley, Buckland, Mathie, & Lloyd, 2009) . L'administration intra-nasale d'IL-25 ou d'IL-33 induit l'expansion des ILC2 au sein des poumons, des lavages broncho-alvéolaire et des ganglions médiastinaux (Barlow et al., 2012; Bartemes et al., 2012) . Par ailleurs, cette expansion est suivie d'une production importante d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2 (Klein Wolterink et al., 2012) . Concernant le mécanisme d'action des ILC2, il a été décrit que l'activité protéasique de la papaïne pouvait activer les ILC2. Une autre étude a montré que l'administration intra-nasale de papaïne à des souris RAG1<sup>-/-</sup> (déficientes en lymphocyte mais possédant des ILC) induisait une hyperéosinophilie, une hypersécrétion de mucus et une augmentation de l'IL-5 et de l'IL-13 dans les lavages broncho alvéolaire, ce qui n'est pas le cas chez des souris RAG2<sup>-/-</sup>/ IL2rg<sup>-/-</sup> (déficientes en ILC2) (Halim, Krauss, Sun, & Takei, 2012).

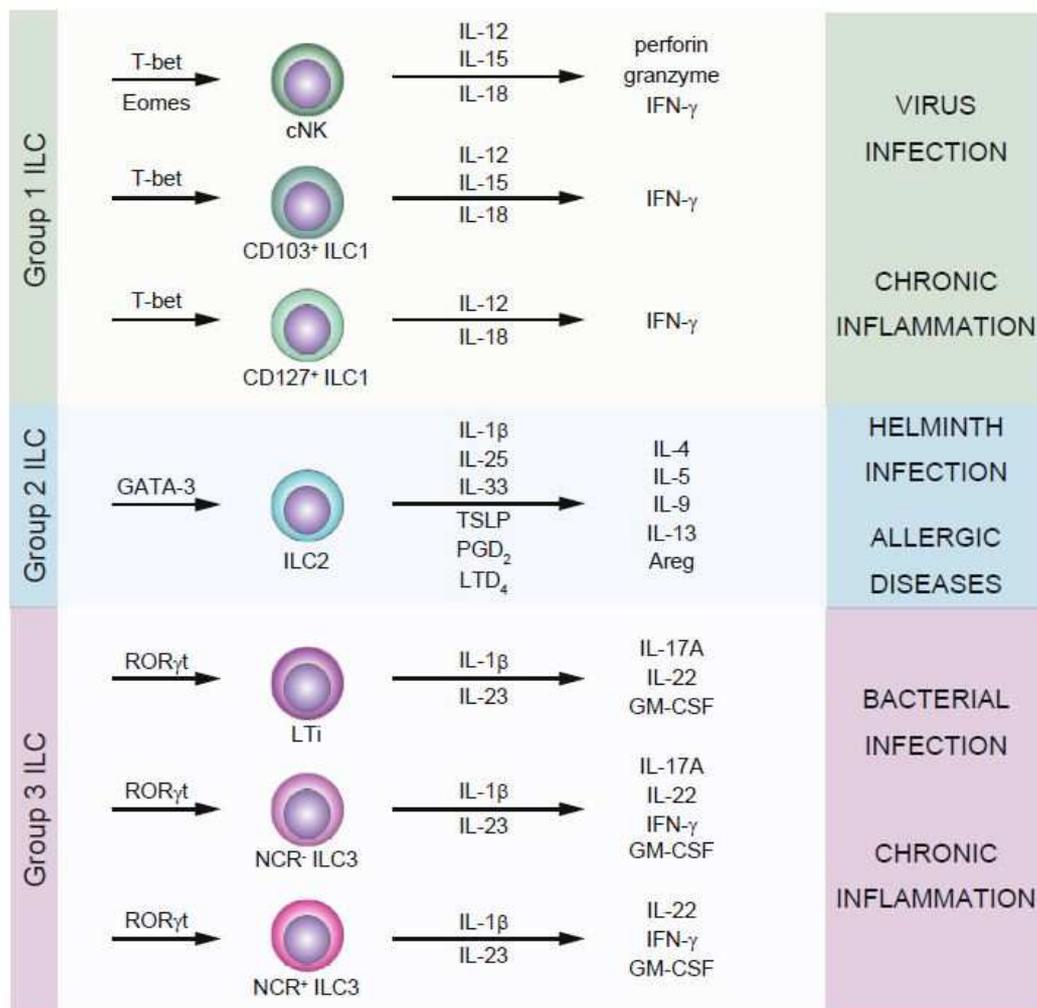


Figure 9: Les différents groupes d'ILC (innate lymphoid cell). D'après MORITA, JACI 2016

## 2.2) Importance des cellules épithéliales

L'épithélium pulmonaire représente la première ligne de défense entre l'organisme et l'environnement extérieur, chargé de bactéries, de virus et d'allergènes (Lambrecht & Hammad, 2012) . L'épithélium pulmonaire est constitué d'une couche de cellules épithéliales divisées en deux sous-types majeurs : les cellules sécrétrices et les cellules ciliées. Les cellules sécrétrices ou cellules caliciformes sécrètent différentes mucines (principalement MUC5AC et MUC5B) permettant de recouvrir l'épithélium d'un gel épais et visco-élastique qui forme une barrière physique imperméable contre les pathogènes (Erle & Sheppard, 2014) . Les cellules épithéliales sont capables d'exprimer à leur surface des molécules de reconnaissance des pathogènes appelées PRR (pattern recognition receptors) qui se lient soit aux « pathogen-associated molecular pattern » (PAMPS) présent sur les bactéries, soit aux « damage-associated molecular pattern » (DAMPS) sécrétés après un stress cellulaire ou une lésion tissulaire (Lambrecht & Hammad, 2012) . L'intégrité de l'épithélium est assurée par des protéines de jonctions appelées jonctions serrées qui maintiennent les cellules épithéliales entre elles et assurent le maintien de leur polarité. Un des allergènes les plus connus responsable de l'asthme est l'acarien (HDM house dust mite). La protéine allergénique majeure est Der p (*Dermatophagoides pteronyssinus*). Le potentiel allergénique de l'HDM est contenu dans la matière fécale des acariens, naturellement composée de plusieurs enzymes protéolytiques dont des protéases. Ces enzymes ont la capacité de cliver les molécules des jonctions serrées permettant ainsi l'entrée des allergènes dans le milieu intérieur (Gregory & Lloyd, 2011) . Il a été montré que les protéases de l'HDM pouvaient activer la lyse intracellulaire des protéines ZO-1 et de l'occludine constituants principaux des jonctions serrées (Wan et al., 2001) . Par ailleurs, l'HDM peut aussi interagir avec les cellules épithéliales et activer des récepteurs appelés PAR (protase activated receptors). Cette interaction entraîne alors l'infiltration leucocytaire et amplifie la réponse à l'allergène. L'activation des PAR peut également déclencher la dégranulation des cellules granulocytaires (Reed & Kita, 2004) . Enfin, l'HDM contient des endotoxines et du LPS (lipopolysaccharide), qui permettent l'activation des TLR (toll like receptor) notamment TLR4 et TLR2, exprimés par les cellules épithéliales et les cellules dendritiques (Hammad et al., 2009) . L'activation des TLR induit également l'activation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) qui entraîne alors le recrutement et la prolifération de cellules inflammatoires et la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires. L'épithélium pulmonaire possède un rôle central dans l'activation des réponses innées et adaptives du système immunitaire. En effet, la sécrétion de cytokines telles que l'IL-25, l'IL-33 et le TSLP favorise fortement les réponses TH2 ainsi

que le recrutement des éosinophiles. L'IL-25 est membre de la famille de l'IL-17 et est sécrétée par les cellules épithéliales, les TH2, les mastocytes, les basophiles et les éosinophiles (Andreacos & Papadopoulos, 2014) . L'IL-33 fait partie de la famille de l'IL-1, et est sécrétée principalement par les cellules épithéliales, les macrophages, les mastocytes et les monocytes (Mitchell & O'Byrne, 2017) . L'IL-33 lie le récepteur ST2 présent sur de nombreuses cellules dont les éosinophiles, les basophiles les ILC2 et les CD8 (Pecaric-Petkovic, Didichenko, Kaempfer, Spiegl, & Dahinden, 2009; Yang et al., 2011) . L'IL-33 est appelée « alarmine » car elle est produite après une lésion de l'épithélium en tant que signal de danger. L'IL-25 et l'IL-33 ont la capacité de stimuler les réponses TH2, en inhibant la production d'IL-12, en activant certaines chimiokines participant au recrutement des TH2 et en stimulant l'expression du marqueur de surface OX40 qui dirige la différenciation des T naïfs en TH2 (Lambrecht & Hammad, 2012) . Des taux élevés d'IL-33 et de ST2 peuvent être retrouvés dans le sérum de patients asthmatiques (Kamekura et al., 2012) . Le TSLP (thymic stromal lymphopoietin) est une cytokine dont la sécrétion par l'épithélium est médiée par l'action des protéases et l'altération des tissus. Son récepteur est exprimé par la plupart des cellules immunitaires ainsi que par les cellules épithéliales (Mitchell & O'Byrne, 2017) . Le TSLP participe également à l'activation des réponses TH2 dont la production d'IL-13 ainsi qu'à la différenciation et à la prolifération des basophiles (Semlali, Jacques, Koussih, Gounni, & Chakir, 2010) . Chez des souris déficientes pour le gène du récepteur au TSLP, la réponse inflammatoire suite à un modèle d'asthme allergique à l'ovalbumine est fortement réduite mais peut être restaurée après reconstitution par des cellules CD4<sup>+</sup> TSLPR<sup>+</sup> (Al-Shami, Spolski, Kelly, Keane-Myers, & Leonard, 2005) . Les cellules épithéliales sont enfin connues pour sécréter de nombreux médiateurs chimioattractants tels que CCL2 et CCL20 qui attire respectivement les monocytes et les cellules dendritiques vers les poumons (Hammad et al., 2009; Nathan, Peterson, Chakir, & Wills-Karp, 2009) . Enfin, en réponse aux cytokines IL-4 et IL-13 produites par les TH2, les cellules épithéliales peuvent sécréter de l'IL-8, CCL11 et CCL17, permettant de recruter respectivement les neutrophiles, les éosinophiles et les TH2 (Lordan et al., 2002; Matsukura et al., 2001) .

Généralités : l'allergie

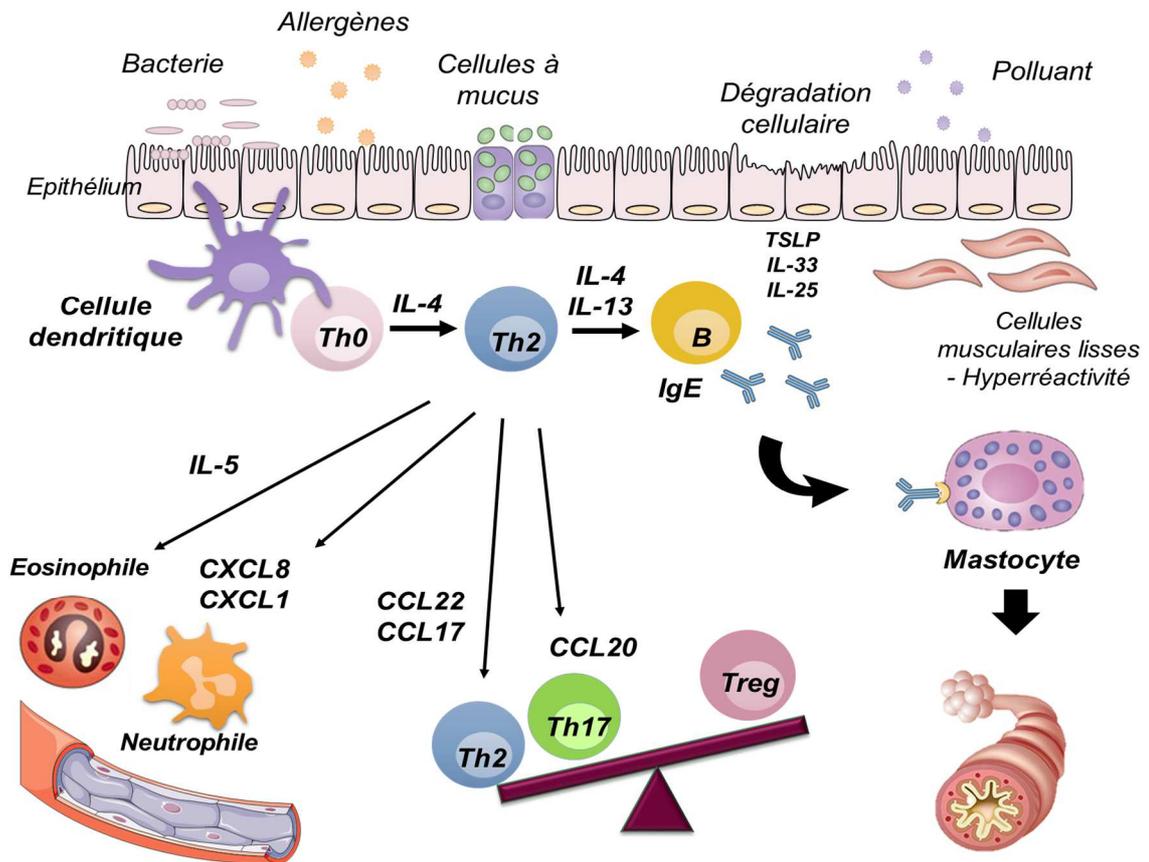


Figure 10: le mécanisme immunologique de l'asthme

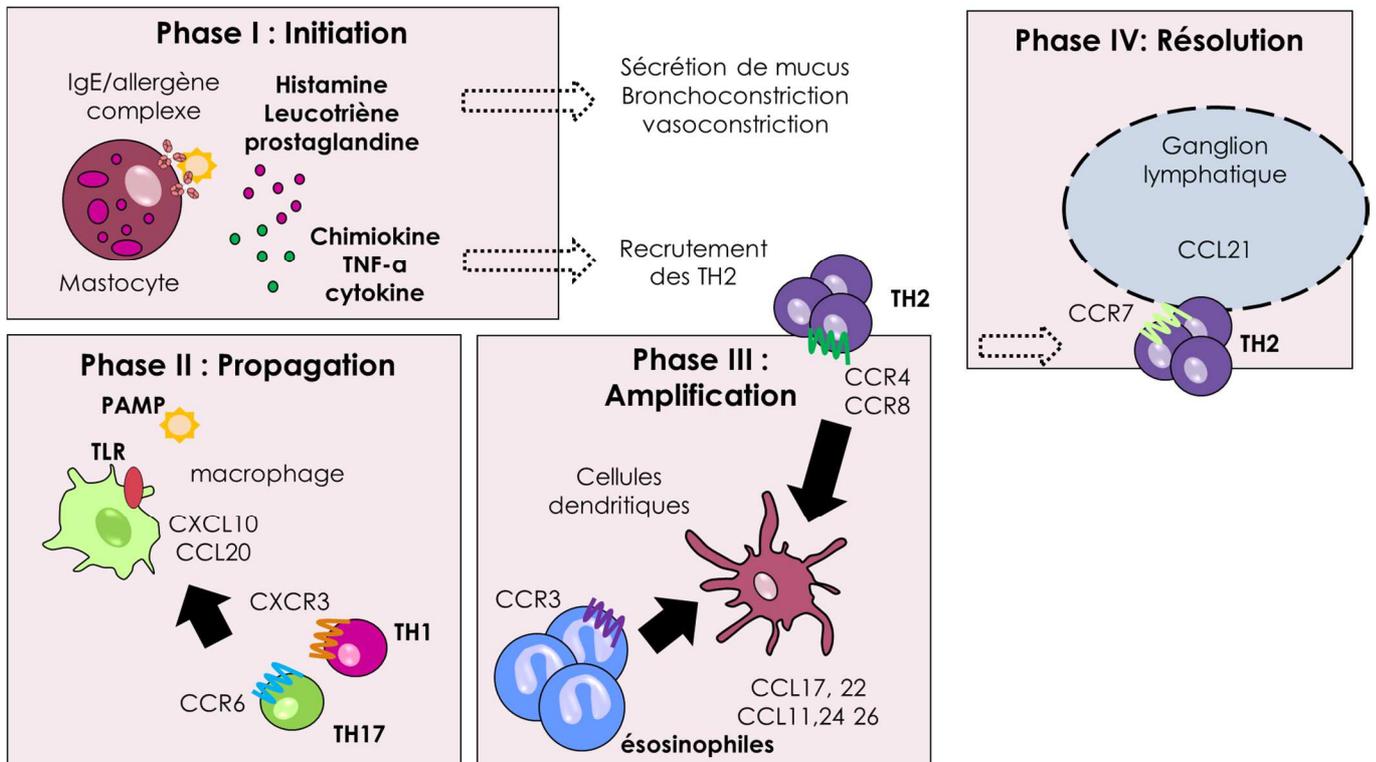


Figure 11: Hypothèse du trafic cellulaire dans l'asthme. D'après MEDOFF, Annual Review of Immunology, 2008

### 3) Les traitements actuels et en cours

Les traitements de fond de l'asthme sont divisés en deux catégories : les bronchodilatateurs et les anti-inflammatoires bronchiques. Parmi les bronchodilatateurs on retrouve les  $\beta$ 2-mimétiques qui sont des agonistes des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques. Ils agissent en relaxant les muscles lisses bronchiques. Les autres bronchodilatateurs font partie de la famille des anticholinergiques avec des agonistes des récepteurs muscariniques et des agonistes des récepteurs nicotiniques. Leur action est moins rapide et moins importante que celle des  $\beta$ 2-mimétiques. Parmi les anti-inflammatoires bronchiques, les plus efficaces et les plus utilisés sont les corticostéroïdes inhalés (CSI). Cependant, même si la majorité des asthmes sont aujourd'hui bien contrôlés par des traitements standards, 5 à 10% des patients restent encore mal contrôlés (Global Atlas of Asthma, 2013) . Ces asthmes dits sévères sont traités par une corticothérapie lourde possédant des effets secondaires importants. Grâce au développement de larges cohortes et de l'analyse en cluster, différents phénotypes d'asthme ont émergé permettant l'apparition de thérapies ciblées. Les travaux de recherche ont permis l'émergence de nouveaux traitements basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ainsi, le premier traitement issu des biotechnologies est l'anti-IgE ou Omalizumab. Il est réservé aux asthmes allergiques non contrôlés malgré un traitement de fond administré à forte dose. Plus récemment, d'autres biothérapies ciblant l'activité Th2 dans l'asthme ont vu le jour.

#### *3.1) Anti IL-5*

Un des premiers essais cliniques utilisant un anti IL-5 fut conduit en 2000 par une étude randomisée en double aveugle et contrôlée par placebo sur 24 hommes asthmatiques. Le traitement, donné par voie intraveineuse, a montré une diminution du taux d'éosinophiles totaux dans les crachats jusqu'à 4 semaines après le traitement, en réponse à un test de provocation par l'allergène (Leckie et al. 2000). En revanche il n'y avait aucun effet sur le VEMS ou l'hyperréactivité bronchique. Deux autres études ont confirmé plus tard l'efficacité de l'anti IL-5 sur la réduction des exacerbations de l'asthme en ciblant les patients sur la présence d'une éosinophilie bronchique. La première sur 20 patients a confirmé la réduction des éosinophiles sanguins et présents dans les expectorations et une amélioration du VEMS 8 semaines après injections (Nair et al., 2009) ; la deuxième a observé une réduction des exacerbations sur un échantillon de 60 personnes asthmatiques (Agache et al., 2012; Pranab Halder et al., 2008) . Deux anti-IL-5 ont aujourd'hui l'autorisation de mise sur le marché (AMM), le Mepolizumab et le Reslizumab. Le Benralizumab, dirigé contre une sous-unité du récepteur à l'IL-5 n'a pas encore d'AMM (Fahy, 2014) .

### *3.2) Anti IL-13/IL-4*

L'interleukine-13 peut se lier avec deux récepteurs différents. Le premier est un hétérodimère composé de la chaîne  $\alpha 1$  du récepteur à l'IL-13 (IL-13R $\alpha 1$ ) et de la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-4 (IL-4R $\alpha$ ). Le deuxième récepteur est le monomère IL-13R $\alpha 2$ . Cette caractéristique particulière a été exploitée pour développer des anticorps bloquant à la fois les voies de signalisation de l'IL-4 et de l'IL-13. Le Dupilumab a été testé dans plusieurs essais cliniques chez des patients présentant des asthmes modérés à sévères. Le Dupilumab donné par voie sous-cutanée a permis une réduction des exacerbations et une amélioration de la fonction pulmonaire ainsi qu'une réduction du taux de cytokines de types TH2 (Wenzel et al., 2013) . Une autre étude en double aveugle a montré une amélioration de la fonction pulmonaire et une diminution des exacerbations chez des patients porteurs d'un asthme non contrôlé par rapport à des thérapies classique (Wenzel et al., 2016) . D'autres types d'anticorps monoclonaux anti IL-13 sont également testés en essais cliniques tels que le Tralokinumab qui bloque la liaison de l'IL-13 avec ses récepteurs IL-13R $\alpha 1$  et IL-13R $\alpha 2$  (Fahy 2014).

### *3.3) Anti IL-17*

Les patients souffrant d'asthme sévère et ne répondant pas aux traitements classiques y compris les corticostéroïdes ne répondent généralement pas bien non plus aux thérapies ciblant les cytokines de types TH2. Ainsi des thérapies ciblant l'IL-17 ont vu le jour afin de bloquer sa voie de signalisation. L'anticorps monoclonal anti IL-17R, Brodalumab aujourd'hui commercialisé dans le traitement du psoriasis a été testé dans l'asthme. L'essai clinique n'a cependant pas été concluant et aucune différence n'a été montrée dans la population générale de l'étude. En revanche, à cause de la grande hétérogénéité de l'asthme, plusieurs clusters peuvent se dégager d'une même population de patients asthmatiques. Ainsi, les auteurs observent une amélioration du score de contrôle de l'asthme et du VEMS seulement dans le cluster de patients présentant une réversibilité importante après test aux bronchodilatateurs (32.8%) (Busse et al., 2013) . D'autres anticorps tels que le Secukinumab et l'Ixekizumab sont également testés dans des essais cliniques sur différentes maladies inflammatoires dont l'asthme (Nirula et al., 2016) .

### *3.4) Autres*

Il existe également d'autres thérapies en cours de développement toujours basées sur l'inflammation. Ainsi la cytokine TSLP (thymic stromal lymphopoietin) produite par les cellules épithéliales bronchiques lors d'un épisode inflammatoire a été ciblée par un anticorps

## Généralités : l'allergie

monoclonal et testée sur une cohorte de 31 patients souffrant d'asthme modéré. Le traitement, injecté par voie intraveineuse a permis la réduction de la bronchoconstriction et du taux d'éosinophiles sanguins (Gauvreau et al., 2014) . GATA-3, le principal facteur de transcription impliqué dans les voies de signalisation TH2 a également été ciblé par une DNazyme capable de cliver et d'inactiver le mRNA de GATA3. Dans une cohorte de 40 asthmatiques, l'étude montre une amélioration du VEMS chez les patients traités par rapport aux patients sous placebo (Krug et al., 2015) .

Anticorps	Industrie pharmaceutique	Cible
Omalizumab	Genentech/Roche/Novartis	Anti IgE
Mepolizumab	GlaxoSmithKline	Anti IL-5
Benralizumab	MedImmune/AstraZeneca	Anti IL-5R $\alpha$
Reslizumab	Teva Pharmaceutical Industries	Anti IL-5
Lebrikizumab*	Genentech/Roche	Anti IL-13R $\alpha$
Tralokizumab	MedImmune/AstraZeneca	Anti IL-13R $\alpha$
Dupilumab	Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi	Anti IL-4R $\alpha$ et IL-13R $\alpha$
Brodalumab	Amgen	Anti IL-17

**Tableau 2: Anticorps monoclonaux dirigés contre la réponse TH2 (\* : essai clinique stoppé)**

### POINTS CLES

- L'asthme affecte environ 10% de la population générale et 300 millions de personnes dans le monde
- Il existe deux grands phénotypes d'asthme : l'asthme allergique d'origine précoce et l'asthme non allergique à démarrage tardif
- Le mécanisme inflammatoire de l'asthme implique aussi bien la réponse innée (cellules dendritiques, éosinophiles, neutrophiles, ILC) que la réponse adaptative (TH2, TH17) et les cellules épithéliales (chimiokine, IL-25, IL-33, TSLP)
- 5 à 10% des patients ne réagissent pas aux traitements habituels corticoïdes et bronchodilatateurs
- Des traitements innovants basés sur les biotechnologies sont aujourd'hui utilisés ou en cours tel que l'anti-IgE ou l'anti-IL-5

## III. La marche atopique

### 1) Définition

Une des premières études faites sur l'animal et mimant la marche atopique fut celle de Spergel en 1998. Les souris étaient alors sensibilisées par voie cutanée à l'ovalbumine grâce à des patchs placés au niveau de l'abdomen pendant une semaine et cela répété trois fois. Après sensibilisation, certaines souris ont reçu une nébulisation d'ovalbumine (Spergel et al., 1998). Les résultats démontrent qu'une seule dose d'OVA nébulisée est suffisante pour induire une hyper-réactivité bronchique caractérisée par la présence d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaires et une augmentation de la résistance pulmonaire. Cette étude est ainsi l'une des premières à montrer dans un modèle murin une corrélation entre la sensibilisation cutanée et le développement d'asthme allergique. Par la suite, Spergel définira la marche atopique comme étant : « l'histoire naturelle des manifestations allergiques, caractérisée par une séquence typique de progression des maladies atopiques ; dermatite atopique puis asthme au cours de la vie » (J M Spergel et al., 1998). Cette définition suggère que la

dermatite atopique est le « point d'entrée » de la maladie allergique. La dermatite atopique coexiste souvent avec l'allergie alimentaire durant la petite enfance. Ces doubles manifestations sont peut-être expliquées par le fait que la dermatite atopique serait la conséquence directe de l'allergie alimentaire. En effet, 35% des enfants porteurs d'une dermatite atopique présentent également des IgE spécifiques d'une allergie alimentaire (Eigenmann, Sicherer, Borkowski, Cohen, & Sampson, 1998) . Il n'est donc pas sûr encore aujourd'hui que l'allergie alimentaire soit une des premières étapes de la marche atopique ou bien que cela soit un facteur indépendant. En effet, comme l'allergie alimentaire et la dermatite atopique coexistent chez la plupart des enfants, on ne sait pas clairement si la progression de la maladie vers de l'asthme est due à la dermatite atopique ou à l'allergie alimentaire elle-même (Bantz, Zhu, & Zheng, 2014) . Il est estimé qu'un tiers des enfants souffrant de dermatite atopique et/ou d'allergie alimentaire vont développer de l'asthme plus tard dans leur vie (Alduraywish et al., 2016; van der Hulst, Klip, & Brand, 2007) .

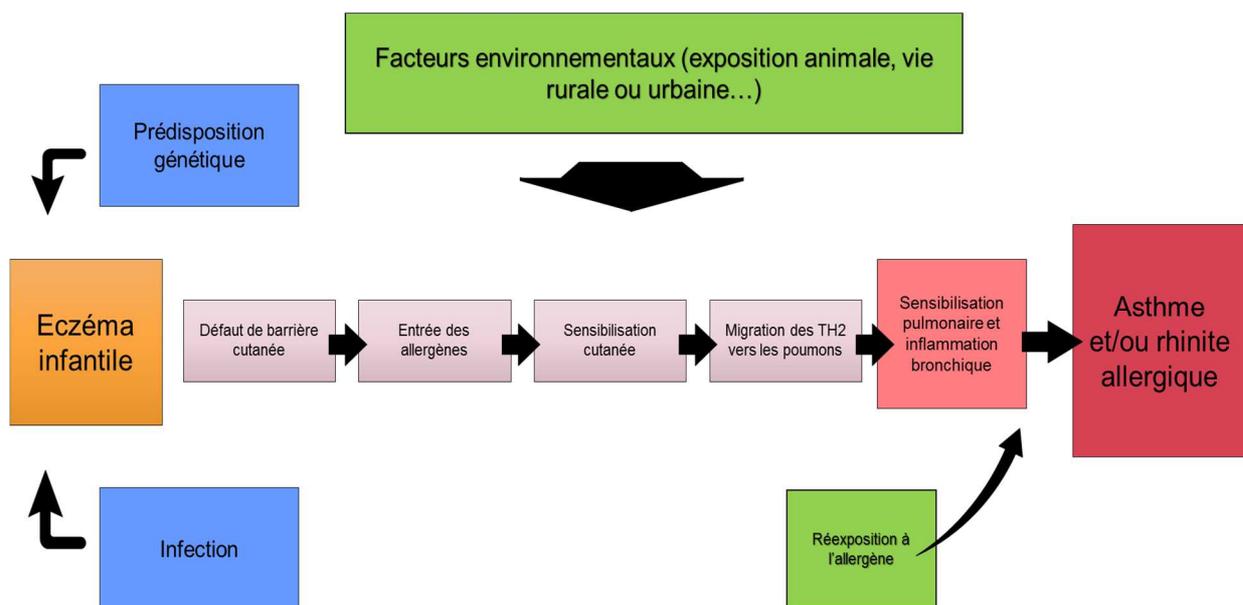


Figure 12: Hypothèse de l'explication de la marche atopique après eczéma atopique. D'après DHARMAGE, Allergy, 2014

## 2) La dermatite atopique

La dermatite atopique, aussi appelée eczéma atopique est une maladie inflammatoire chronique de la peau, caractérisée par un prurit, et des lésions érythémateuses (Weidinger & Novak, 2016) . La dermatite atopique est l'une des maladies chroniques les plus répandues surtout dans les pays développés et affecte environ 15 à 30% des enfants et 2 à 10% des

adultes avec une prévalence qui ne cesse d'augmenter (Williams, Stewart, von Mutius, Cookson, & Anderson, 2008) . 45% des patients affectés le sont durant les 6 premiers mois de la vie, 60% durant la première année de vie et 85% avant 5 ans (Bieber, 2008) . Cependant, dans 70% des cas, la maladie disparaît ou s'améliore considérablement après l'enfance (Peters et al., 2010) . La dermatite atopique se manifeste par différents symptômes, généralement variant avec l'âge. Ainsi, durant la petite enfance, les premières lésions eczémateuses apparaissent au niveau des joues et de la tête. Plus tard, les lésions apparaissent plutôt au niveau du dos, des articulations ou des membres. A l'âge adulte, elles sont localisées au niveau des articulations, de la tête et du cou. A chaque période de la vie ces plaques démangent, peuvent perturber le sommeil et altérer la qualité de vie des patients (Bieber, 2008) . Le mécanisme de la dermatite atopique peut être divisé en deux grandes catégories : la perte de fonction barrière de la peau et l'inflammation cutanée. En effet, l'altération de la peau favorise l'entrée de différents pathogènes, d'allergènes et autres toxines, polluants, irritants etc. Cette perte de fonction barrière est reconnue comme l'un des mécanismes principaux induisant la dermatite atopique (Cork et al., 2006) . La dégradation de la barrière cutanée est souvent associée à la colonisation bactérienne par *Staphylococcus aureus* ce qui est le cas chez 90% des patients atteints de dermatite atopique (Leyden, Marples, & Kligman, 1974) . Cliniquement cette dégradation est mesurée par l'augmentation du TEWL (trans epidermal water loss), un paramètre mesurant le dessèchement de la peau. Génétiquement, cette altération peut être associée à des mutations de la filaggrine, une protéine de structure clé présente dans l'épiderme. Les mutations de la filaggrine sont considérées comme un facteur majeur de risque de développer une dermatite atopique et à plus long terme son évolution vers de l'asthme au cours de la marche atopique (Marenholz et al., 2006) . Ces mutations peuvent être d'ailleurs aussi associées à la présence d'allergie alimentaire. Une étude a montré que ces mutations augmenteraient le risque d'apparition de l'allergie alimentaire et des sensibilisations alimentaires chez les enfants (Venkataraman et al., 2014) . L'inflammation cutanée est le deuxième paramètre clé dans la dermatite atopique. L'infiltrat cellulaire est principalement composé de cellules TH2, TH22 et TH17 avec la présence de chimiokines, de cytokines (IL-25 et IL-33 notamment) et de molécules d'adhésion spécifique de la peau comme l'antigène CLA (cutaneous lymphocyte antigen) porté par les lymphocytes cutanés (Weidinger & Novak, 2016) . De nombreuses cytokines entrent également en jeu particulièrement le TSLP (thymic stromal lymphopoietin) qui entraîne le remodelage et la fibrose tissulaire. Le TSLP produit par les kératinocytes stimule également la maturation et la prolifération des cellules dendritiques, la polarisation des cellules T en TH2 et la différenciation des B (Leyva-Castillo, Hener, Jiang, & Li, 2013) . La capture des antigènes se fait essentiellement par les cellules de Langerhans et par les cellules dendritiques inflammatoires épidermiques IDEC (inflammatory dendritic epidermal cell) (Novak, 2012) .

L'altération de la barrière cutanée ainsi que la colonisation bactérienne favorise l'exacerbation et rend la maladie chronique. Ceci est renforcé par la production de protéases, la libération d'enterotoxines et la dégranulation mastocytaire provoquée par les IgE. L'inflammation cutanée affecte également la structure de l'épiderme et peut altérer la fonction des protéines de jonction. Tous ces paramètres contribuent à transformer une lésion cutanée simple en maladie chronique (Weidinger & Novak, 2016) .

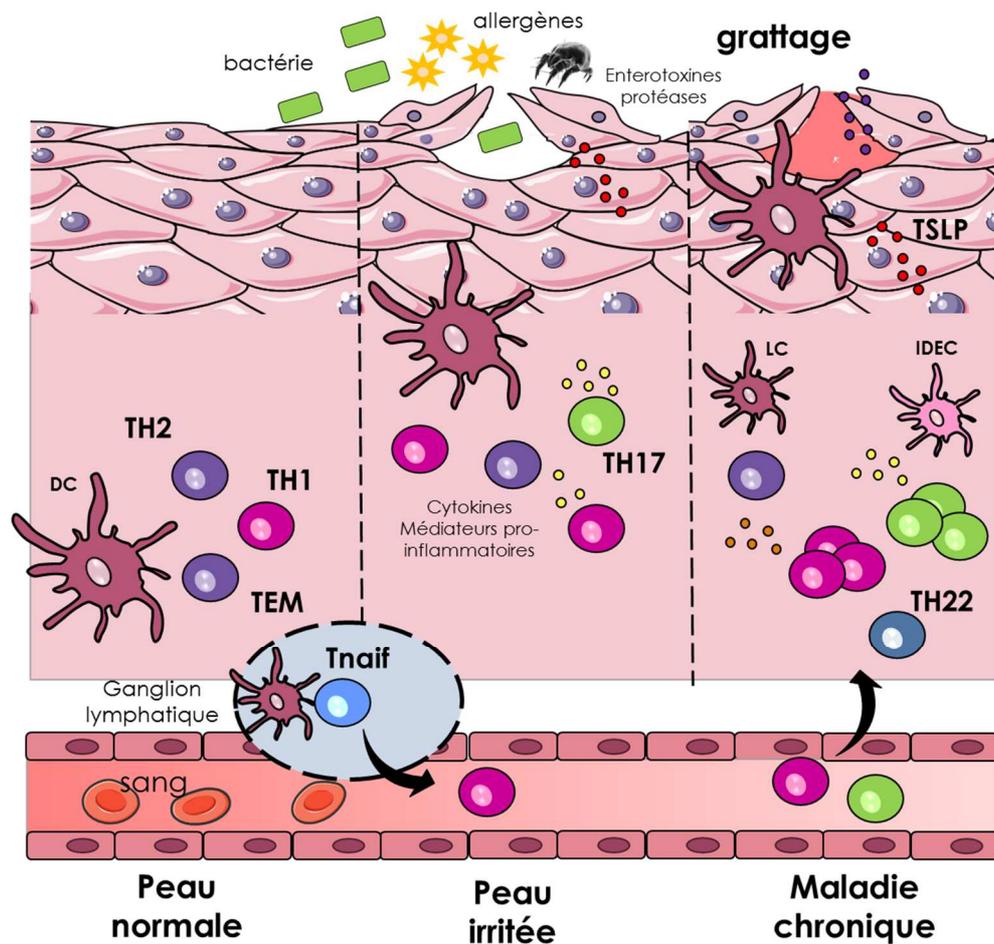


Figure 13: Mécanisme immunologique de la dermatite atopique

### 3) Donnée de prévalence et étude des cohortes

Plusieurs études de population ont analysé l'incidence de la dermatite atopique ou des allergies alimentaires chez le jeune enfant sur l'asthme quelques années après. Dans une première étude, 8500 enfants de 7 ans ainsi que leurs parents ont été suivis de 1968 à 2004. L'analyse portait essentiellement sur les réponses à un questionnaire d'autodiagnostic. Les résultats montrent que la dermatite atopique est très significativement associée à l'asthme de l'adolescent et de l'adulte à 95% (Burgess et al., 2008) . Une cohorte de 3000 enfants âgés de 1 à 2 ans a été suivie pendant 5 ans et l'incidence de l'asthme et de la rhinite allergique a

été évaluée par des questionnaires. Les enfants présentant un eczéma atopique à cet âge (17.6%) ont eu 3 fois plus de risque de développer de l'asthme et des rhinites allergiques par rapport aux enfants sans dermatite atopique (von Kobyletzki et al., 2012) . Plusieurs études se sont également intéressées à l'incidence de la sensibilisation alimentaire et de la dermatite atopique sur l'apparition de l'asthme. La cohorte ORCA (observatoire des risques respiratoires associés à la dermatite atopique) a suivi 200 enfants souffrant de dermatite atopique jusqu'à l'âge de 6 ans. Les résultats basés notamment sur l'analyse du SCORAD (scoring atopic dermatitis) et sur des prick-tests ont permis l'identification de 3 clusters. Le premier comprenant des enfants n'ayant pas ou peu de sensibilisation alimentaire et respiratoire et une dermatite atopique modérée (n=94), le deuxième cluster comprenant des enfants présentant une dermatite atopique plus sévère et des sensibilisations alimentaires et/ou respiratoire connues et multiples (n=84) et enfin le troisième cluster comprenant des enfants présentant une dermatite atopique modérée, pas de sensibilisation alimentaire ou respiratoire mais une histoire parentale d'asthme (n=36). Sur ces trois clusters, le pourcentage d'enfants présentant de l'asthme à l'âge de 6 ans était plus élevé dans le cluster 2 (36.1%) et le cluster 3 (33.3%) contre 14.9% pour le cluster 1. Les enfants porteurs d'une dermatite atopique ont plus de risque de développer de l'asthme s'ils souffrent également de multiples sensibilisations alimentaires et/ou respiratoires ou s'ils sont issus d'une famille dont certains membres sont aussi asthmatiques (Amat et al., 2015) . Différentes études se sont également penchées sur l'incidence de la sensibilisation à un allergène alimentaire particulier sur l'apparition de l'asthme. Ainsi, l'allergie à l'œuf chez des enfants a été associée significativement à la présence d'allergie respiratoire à l'âge de 4 ans (asthme et rhinite) ( $p < 0.05$ ) (Tariq, Matthews, Hakim, & Arshad, 2000) . Une étude suivant des enfants atteints d'allergie au lait de vache a analysé leur hyperréactivité bronchique à l'âge de 8 ans. Par rapport aux contrôles, les enfants allergiques au lait présentaient une inflammation pulmonaire plus importante caractérisée par une mesure du NO exhalé supérieure ( $P = 0.0009$ ) et une mesure des IgE positive ( $P = 0.027$ ) (Malmberg, Saarinen, Pelkonen, Savilähti, & Mäkelä, 2010) . Une autre étude analysant la sensibilisation alimentaire d'enfants à 6, 12 et 24 mois a montré que 31% des enfants sensibilisés à un aliment à 6 et 12 mois ont développé un asthme 12 ans plus tard. Si ces enfants étaient sensibilisés à un allergène alimentaire et respiratoire ce chiffre passe alors à 53% (S. Alduraywish et al., 2016; van der Hulst, Klip, & Brand, 2007) . Ainsi, la sensibilisation alimentaire augmente bien le risque d'asthme ou de rhinites allergiques plus tard dans la vie ; par ailleurs on estime également l'évolution de la maladie vers de l'asthme chez 30% des enfants sensibilisés.

## 4) *Le mécanisme de la marche atopique*

### *4.1) Hypothèse des systèmes immunitaires muqueux communs*

Plusieurs mécanismes ont été proposés mais aujourd'hui rien n'est clairement admis. Le système immunitaire des muqueuses est le système immunitaire que l'on peut retrouver au niveau de l'intestin, de la filière uro-génitale et des poumons. Toutes ces surfaces ont en commun le fait d'être en contact permanent avec l'environnement extérieur et sont donc soumises à des pathogènes. Les muqueuses représentent la première interface de défense entre l'hôte et l'environnement et agissent comme de véritables barrières. Le concept de système immunitaire muqueux commun est apparu en 1978 avec BIENENSTOCK. Il suggère que les tissus lymphoïdes muqueux interagissent les uns avec les autres et fonctionnent comme un seul organe (Bienenstock, McDermott, Befus, & O'Neill, 1978) . Des études ont en effet montré que le système immunitaire peut fonctionner en réseau entre les différents organes et que la stimulation d'un compartiment pouvait en affecter un autre. Ainsi, l'utilisation d'antibiotiques chez les nouveau-nés a été associée à un risque plus élevé de développer de l'asthme (Sobko et al., 2010) . De plus on sait aujourd'hui que les patients atteints de bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO) ont deux à trois fois plus de risque de développer une maladie inflammatoire de l'intestin (Keely, Talley, & Hansbro, 2012) . Ces patients présentent par ailleurs une perméabilité intestinale plus importante (Rutten et al., 2014) . Les poumons et l'intestin dérivent du même feuillet embryonnaire et présentent des similarités de structure ; il est donc logique de penser que ces deux sites peuvent interagir. Depuis quelques années, le microbiote et particulièrement le microbiote intestinal est au centre de toutes les attentions. Il est en effet suggéré qu'en plus de son rôle connu et avéré dans le fonctionnement de l'intestin, le microbiote aurait d'autres effets non négligeables sur d'autres organes notamment le poumon. Une dysbiose au sein du microbiote intestinal ou une altération de son contenu a été associée avec un risque accru de développer de l'asthme particulièrement dans les premières années de vie. Cependant chez les adultes asthmatiques, on ne retrouve aucune différence dans la composition du microbiote intestinal par rapport aux personnes saines (Hua, Goedert, Pu, Yu, & Shi, 2016) . Un régime riche en fibres donné à des souris permet de prévenir le développement de l'asthme (Trompette et al., 2014) . Comprendre comment le microbiote interagit avec d'autres organes et comment se régule l'axe intestin-poumon permettrait peut-être de comprendre l'augmentation des maladies allergiques d'aujourd'hui. En effet cette augmentation, due notamment à notre mode de vie et notre régime alimentaire peut peut-être être expliquée par des modifications de notre microbiote (Budden et al., 2017) . Appréhender le système immunitaire des muqueuses comme un seul et même

organe pourrait peut-être étendre nos connaissances sur son fonctionnement. Ainsi les maladies allergiques ne sont plus vues aujourd'hui comme une maladie d'organe mais comme une maladie multifactorielle, affectant l'organisme dans son ensemble.

#### *4.2) Rôle des cytokines dérivées des cellules épithéliales*

Plusieurs études ont mis en cause les cytokines dérivées des cellules épithéliales comme le TSLP, l'IL-25 et l'IL-33 dans les mécanismes de la marche atopique. En effet, ces cytokines sont associées avec la réponse TH2 et sont généralement retrouvées augmentées dans le sang des patients allergiques, toutes maladies confondues. Dans un modèle murin de dermatite atopique associée à l'IL-13, une étude montre que les souris provoquées par voie intra-nasale par de l'ovalbumine présentent une hyperréactivité bronchique, une production de mucus et une inflammation pulmonaire plus importante si elles ont été soumises au protocole de dermatite atopique avant. Par ailleurs, chez les souris déficientes pour le récepteur au TSLP, la réponse TH2 est diminuée ; les souris présentent alors à la fois une diminution des symptômes de la dermatite atopique et de l'inflammation pulmonaire (W.-J. J. Zhu et al., 2015) . Une autre étude impliquant le TSLP a montré que les souris sur-exprimant le TSLP ou subissant des injections de TSLP et exposées par voie cutanée à de l'ovalbumine développaient une inflammation plus sévère lorsqu'elles étaient aussi challengées avec le même allergène au niveau des poumons (Han et al., 2012) . En utilisant un KO (knock-out) conditionnel du TSLP dans les kératinocytes, une équipe a montré que le TSLP produit par les kératinocytes est essentiel dans la mise en place de l'inflammation cutanée et le déclenchement de l'asthme allergique, dans un modèle murin mimant la marche atopique (Leyva-Castillo et al., 2013) . Une étude similaire a montré que le TSLP sécrété par les kératinocytes était indispensable à l'inflammation pulmonaire dans un modèle de marche atopique avec induction de dermatite atopique par application de MC903, un analogue de la vitamine D (Zhang et al. 2009). Plusieurs études de l'équipe de Ziegler ont montré que le TSLP était indispensable dans la phase de sensibilisation cutanée dans des modèles de marche atopique (Han et al, 2012 et Han et al. 2014). En revanche, l'IL-33 paraît essentielle dans le développement de la réponse allergique après provocation (Muto et al, 2014). En effet, les souris déficientes pour l'IL-33 ou celles traitées par un anticorps anti-IL-33 ont bien des IgE anti-OVA mais présentent une réduction des signes de l'allergie alimentaire tels qu'une réduction du nombre de basophiles et sont protégées contre la baisse de la température rectale après challenge (Muto et al, 2014). Dans un modèle de marche atopique cutanée/intestinal à l'OVA, les auteurs montrent que l'induction de l'allergie alimentaire TSLP-dépendante nécessite également la présence de l'IL-33 car son blocage permet une amélioration du score clinique (diarrhée notamment) (Han et al., 2017) . La même équipe avait

auparavant démontré le caractère indispensable du TSLP et de l'IL-25 dans la réponse allergique clinique au niveau intestinal (diarrhée et anaphylaxie) dans un modèle d'allergie à l'OVA (H Han et al., 2012) . Concernant l'IL-33 et son récepteur ST2, une équipe a analysé leur rôle dans la marche atopique en utilisant des souris déficientes pour ST2 et soumises à un protocole de sensibilisation cutanée à l'OVA suivie de challenges intranasaux au même allergène. Le nombre d'éosinophiles dans les lavages broncho-alvéolaire, la sécrétion des cytokines et des chimiokines de types TH2 dans les poumons ainsi que le taux d'IgE spécifiques de l'OVA étaient diminués dans les souris ST2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris sauvages (Morita et al., 2012) . En revanche, la réponse TH17 ne semble pas être altérée. Récemment, une équipe a étudié l'effet de l'injection intradermale d'IL-33 dans un modèle murin de sensibilisation cutané ; cela provoque une exacerbation de l'inflammation des voies aériennes, caractérisée par une augmentation de l'infiltrat cellulaire et une augmentation des IgE spécifiques de l'allergène (Hongwei Han & Ziegler, 2017) . Une autre étude a montré une diminution des éosinophiles et des cytokines de type TH2 dans les poumons de souris ST2<sup>-/-</sup> après sensibilisation et challenge intranasal, mais pas de réduction des éosinophiles ni de la réponse TH2 au niveau cutané chez ces souris comparées aux souris sauvages, cette étude confirme ainsi le caractère essentiel de l'axe IL-33/ST2 dans la phase de challenge (Shimura et al., 2016) . Dans un modèle de marche atopique cutanée/intestinal à l'OVA sur des souris déficientes pour ST2 et des souris dépourvues de mastocytes, les auteurs observent une diminution de la réponse allergique clinique chez les deux souches de souris KO. Par ailleurs, cette réponse est restaurée si les souris sont reconstituées par des PBMC provenant uniquement de souris sauvages mais pas de souris ST2<sup>-/-</sup>. Ces résultats permettent de formuler l'hypothèse que l'IL-33, sécrétée après une agression des cellules épithéliales permet de promouvoir la dégranulation des mastocytes et la réponse anaphylactique après sensibilisation cutanée (Galand et al., 2016) .

### *4.3) Rôle de la réponse TH17*

On sait aujourd'hui que les lymphocytes TH17 sont impliqués dans les maladies auto-immunes comme l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale qui mime la sclérose en plaque chez les souris ou encore l'arthrite rhumatoïde. Par ailleurs, l'IL-17 est exprimé par les cellules bronchiques des patients asthmatiques sévères (Chakir et al., 2003) . L'expression de l'IL-17 est augmentée dans le sérum et les expectorations induites de patients asthmatiques et est corrélée au taux de neutrophiles et à la réponse à la métacholine (Bullens et al., 2006; Wong et al., 2001) . Ainsi, il a été suggéré que l'IL-17 pourrait être impliquée également dans la marche atopique. Dans un modèle de sensibilisation cutanée suivie d'un challenge intranasal à l'ovalbumine, une équipe a démontré que les souris présentaient une plus forte production

de CXCL2 (ligand des neutrophiles) et un infiltrat neutrophilique plus important. Par ailleurs, le blocage de l'IL-17 par un antagoniste permet d'inverser cette situation. Les cellules dendritiques migrant de la peau vers les ganglions lymphatiques expriment plus d'IL-23 et stimulent la sécrétion d'IL-17 par les cellules T naïves. Ces résultats peuvent être inhibés par l'injection d'anti-IL-23 *in vitro* et par l'injection intradermique d'anti-TGF $\beta$  *in vivo* (He et al., 2007) . Ces résultats semblent suggérer que la sensibilisation cutanée initiale induirait une expression d'IL-17, responsable de l'inflammation ultérieure des voies aériennes. Dans un modèle similaire mimant la marche atopique sur des souris IL-4/IL-13 double KO, une équipe a montré que les souris sensibilisées à l'OVA présentaient une réponse TH2 altérée, un taux d'IL-17 plus élevé et une diminution de l'infiltrat cutané éosinophilique. Par ailleurs, le challenge intra-nasal ultérieur induit une régulation positive de l'expression de l'IL-17 dans les poumons, une augmentation des neutrophiles dans les lavages broncho alvéolaires et une hyper réactivité à la métacholine; cette réponse peut être inversée par l'utilisation d'un antagoniste de l'IL-17 (He et al., 2009) . Ces résultats suggèrent donc qu'en l'absence des cytokines de type TH2 IL-4 et IL-13, la sensibilisation cutanée induit une réponse TH17 responsable de l'inflammation pulmonaire subséquente.

#### POINTS CLES

- La marche atopique est l'évolution naturelle des maladies allergiques, caractérisée par une dermatite atopique et/ou une allergie alimentaire pendant l'enfance suivie d'asthme ou de rhinite allergique
- On estime que 30% des enfants souffrant de dermatite atopique et/ou d'allergie alimentaire vont développer de l'asthme plus tard
- La dermatite atopique est caractérisée par une altération de la barrière cutanée et à une inflammation
- L'allergie est reconnue aujourd'hui comme une maladie multifactorielle dans laquelle les systèmes immunitaires muqueux interagiraient entre eux
- Le mécanisme de la marche atopique n'est aujourd'hui toujours pas décortiqué ; le rôle des cytokines dérivées des cellules épithéliales TSLP et IL-33 a été investigué

## IV. Les modèles animaux d'allergie

### 1) Les modèles animaux d'allergies sont-ils pertinents ?

Les modèles animaux ont énormément contribué à la compréhension des mécanismes immunitaires de l'allergie et restent toujours indispensables pour en disséquer les mécanismes les plus compliqués. Si la souris reste à ce jour l'animal le plus utilisé dans les modèles d'allergie, elle présente pourtant des différences évidentes avec l'homme dans le fonctionnement de son système immunitaire (Graham & Nadeau, 2014) . Les animaux domestiques tels que les chiens, les chats ou les chevaux développent spontanément des maladies allergiques mais leur inclusion dans des modèles reste bien sûr très compliquée et infaisable éthiquement. Chez la souris cependant, des différences peuvent être trouvées en fonction de la souche. En effet, la souris Balb/c présente par exemple des taux plus élevés d'IgE spécifiques de la cacahuète par rapport à d'autres souches (Bøgh et al., 2016) . Smit a démontré que les splénocytes des souris Balb/c allergiques à la cacahuète sécrétaient plus d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 que les souris C3H suggérant ainsi que ces souris sont préférables pour mimer la réponse allergique (Smit et al., 2011) . Le rat Brown Norway représente également une alternative car il possède un fort taux d'IgE (Bøgh et al., 2016) . Le choix de l'allergène ainsi que la voie d'exposition sont des éléments cruciaux lors de la mise en place d'un modèle d'allergie. En effet l'ovalbumine est souvent utilisée comme allergène respiratoire alors que ce n'en est pas un chez les humains. Mais l'ovalbumine peut également être utilisée en tant qu'allergène alimentaire afin de mimer l'allergie à l'œuf. La voie de sensibilisation est cruciale dans le développement d'un modèle d'allergie pertinent. Si l'injection intra-péritonéale de protéine de blé est suffisante pour induire une réponse spécifique IgE chez la souris, il est préférable de sensibiliser par voie orale pour des modèles d'allergie à la cacahuète ou au lait de vache (Bøgh et al., 2016; Denery-Papini et al., 2011) . La peau représente également une voie de sensibilisation possible dans le cadre d'une allergie alimentaire. En effet, une étude sur une cohorte humaine a démontré que l'exposition cutanée à la cacahuète était suffisante pour induire une allergie alimentaire (Fox, Sasieni, du Toit, Syed, & Lack, 2009) . Chez la souris, Spergel a montré que la sensibilisation à l'ovalbumine par voie cutanée en absence d'adjuvant induisait une concentration en IgE spécifiques de l'allergène supérieure à celle retrouvée sur des modèles d'allergie par injection intra-péritonéale avec adjuvant (hydroxyde d'aluminium) (J M Spergel et al., 1998) . Pour mimer l'asthme, les modèles utilisés sont plus généralement des modèles d'asthme aigu plutôt que des modèles chroniques, typiques de l'asthme développé par l'humain (Jensen-Jarolim, Pali-Schöll, & Roth-Walter, 2017; Kumar, Herbert, & Foster, 2016) . Concernant les allergènes, à part l'ovalbumine, on retrouve

maintenant de plus en plus l'utilisation d'extrait total d'HDM. Dans la plupart de ces modèles, la sensibilisation est faite par voie intra-péritonéale ou intra-nasale puis le challenge est fait par aérosol ou par injection intra-nasale. (Jensen-Jarolim et al., 2017) . La capacité allergisante d'un allergène est parfois contenue au sein de son activité protéasique. En effet, l'HDM contient des protéases causant une altération de la barrière et induisant une production de cytokines pro-inflammatoire par les cellules épithéliales. La papaïne, une protéase dérivée du fruit possède les mêmes propriétés. Elle est ainsi régulièrement utilisée en tant qu'allergène dans des modèles d'allergie. Elle stimule en effet la réponse TH2 (M. L. Tang et al., 2015) , stimule les cellules épithéliales(Kouzaki, O'Grady, Lawrence, & Kita, 2009) et induit la production de l'IL-33, notamment par les ILC2 (Halim et al., 2012) .

## 2) Les modèles animaux de marche atopique

Quelques études ont essayé de mimer la marche atopique en utilisant des modèles animaux combinant soit des protocoles de dermatite atopique et d'asthme soit des protocoles d'allergie alimentaire et d'asthme. Parmi ces modèles, si tous parviennent à mimer la marche atopique et parfois à induire une aggravation de l'asthme après induction de l'allergie alimentaire, peu essaient de décortiquer les mécanismes immunitaires. Dans un modèle OVA / latex (allergène alimentaire/allergène respiratoire), une étude montre que la première sensibilisation à l'ovalbumine stimule la réponse TH2 et augmente la réactivité bronchique au latex après challenge intranasal (Blumchen et al., 2006) . Dans un modèle d'allergie alimentaire par sensibilisation intra-péritonéale et challenge intra gastrique à l'ovalbumine, suivi d'une exposition intra-nasale à l'HDM, une étude montre que l'allergie alimentaire exacerbe l'hyperréactivité bronchique illustrée par une augmentation de l'infiltrat cellulaire et une augmentation de l'hyper réactivité des voies aériennes (Brandt, Scribner, Akei, & Rothenberg, 2006) . Concernant les modèles de marche atopique basés sur des protocoles de dermatite atopique, les souris NC/nga sont très utilisées car elles développent spontanément des lésions de la peau. Originaires du Japon, ces souris présentent les mêmes caractéristiques que la dermatite atopique lorsqu'elles sont élevées en conditions normales non SPF (specific pathogen free) (Vestergaard et al., 1999) . Ainsi des souris NC/nga exposées par voie intra-nasale à de l'HDM de façon répétée développent une inflammation des voies aériennes, mimant la marche atopique (Lee, Lee, Jung, Kim, & Choi, 2015) . D'autres modèles ont également été développés en utilisant la mutation du gène de la filaggrine. Ainsi les souris dites « flaky tail » Flg<sup>fl/fl</sup> dont le gène de la filaggrine est muté, présentent spontanément une dermatite atopique. Ces souris sont ainsi utilisées dans des modèles de marche atopique, car elles développent aussi naturellement une inflammation pulmonaire (Saunders et al., 2016) . La dermatite atopique chez les souris peut également être déclenchée par application de

substances chimiques. Ainsi l'application d'un analogue de la vitamine D3 induit des symptômes similaires à la dermatite atopique chez des souris Balb/c. L'exposition de ces mêmes souris à de l'OVA par injection intra-nasale permet de mimer par la suite la marche atopique (Zhang et al., 2009) . La marche atopique peut être mimée par application successive d'un allergène par voie cutanée puis par voie respiratoire. C'est le principe du modèle de Spergel avec de l'ovalbumine appliquée à l'aide d'un patch sur l'abdomen puis inhalée par voie intra-nasale (J M Spergel et al., 1998) . L'utilisation du TSLP est également répandue dans les modèles de marche atopique. Il a en effet été montré que le TSLP jouerait un rôle prépondérant dans la dermatite atopique et à plus long terme dans la marche atopique. Ainsi l'injection intradermique de TSLP suivie d'une exposition gastro-intestinale à un allergène (OVA) aggrave les symptômes d'allergie alimentaire dont la diarrhée et l'anaphylaxie (H Han et al., 2012; Hongwei Han et al., 2014) . Des modèles de marche atopique ont enfin été utilisés pour mimer l'impact d'une allergie cutanée sur les symptômes gastro-intestinaux. Ainsi des souris ont été exposées par voie cutanée à de la cacahuète avant d'être gavées avec le même allergène afin d'évaluer l'effet d'une exposition cutanée sur le développement de l'allergie alimentaire (Wavrin, Bernard, Wal, & Adel-Patient, 2014) .

# Chapitre 2 : les chimiokines et leurs récepteurs

## I. Rôle des chimiokines

### 1) Définitions

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques de faible poids moléculaire (7-12kDa) qui contrôlent la migration et le positionnement des cellules immunitaires (Schulz, Hammerschmidt, Moschovakis, & Förster, 2016) . Découverte au début des années 90, l'IL-8 (CXCL8) fut la première chimiokine à être caractérisée pour son rôle dans la migration des neutrophiles (Baggiolini, Dewald, & Moser, 1997) . Elles sont classées dans quatre groupes selon la place de deux résidus cystéine sur les quatre au total. Ainsi, on distingue le groupe des CCL, dont les deux cystéines sont placées l'une à côté de l'autre, le groupe des CXCL dans lequel les cystéines sont séparées par un acide aminé, et le groupe des XCL ou CL est caractérisé par la perte des deux premières cystéines. Le groupe CX3CL constitué d'une seule chimiokine, la fractalkine, possède trois acides aminés entre les cystéines. Chez l'humain, une cinquantaine de chimiokines ont été identifiées, réparties dans les quatre groupes : 27 CCL, 17 CXCL, 2 XCL et 1 CX3CL. On totalise respectivement 22, 15, 1 et 1 chimiokines chez les souris (Schulz et al., 2016) . Les chimiokines sont produites afin de recruter les cellules au niveau des sites d'inflammation. Elles induisent ainsi l'expression d'intégrines telles que LFA-1 (intégrin lymphocyte function associated antigen) (Constantin et al., 2000) . Lorsqu'une chimiokine se lie avec son récepteur, le signal est transduit par l'intermédiaire d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G (Moser, Wolf, Walz, & Loetscher, 2004) . La plupart des chimiokines peuvent aussi se lier aux glycosaminoglycanes (GAG), qui sont des structures carbonées liées aux protéines, exprimées à la surface des cellules ou faisant partie de la matrice extracellulaire (Kufareva, Salanga, & Handel, 2015) . Les GAGs permettent une adhérence plus forte des chimiokines au niveau de la surface des cellules endothéliales, notamment celles des veinules à endothélium épais (HEV) (Schumann et al., 2010) . Tous les récepteurs de chimiokines font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G ou GPCR (Schulz et al., 2016) . Les récepteurs peuvent être liés par plusieurs chimiokines différentes mais toujours appartenant à la même famille. Certains récepteurs sont liés exclusivement à une unique chimiokine, tandis que d'autres peuvent se lier à une dizaine de chimiokines au total (Ransohoff, 2009) . Par exemple, CXCL12 est le seul ligand de CXCR4 alors que CCR1 possède 6 ligands (Sokol & Luster, 2015) . On classifie

généralement les chimiokines et leurs récepteurs selon leur fonction : homéostatique ou inflammatoire. Certaines chimiokines contribuent ainsi à l'homéostasie des cellules, comme le développement et la différenciation des T, la migration des cellules souches hématopoïétiques, ou encore l'organogénèse des tissus lymphoïdes (Zlotnik, Burkhardt, & Homey, 2011) . D'autres chimiokines ne sont produites qu'en réponse à une infection ou une inflammation. Cependant cette classification n'est pas exclusive puisque certaines chimiokines peuvent être à la fois homéostatiques et inflammatoires (Stone, Hayward, Huang, E Huma, & Sanchez, 2017) . Les chimiokines homéostatiques ne possèdent en général qu'un seul récepteur, comme CXCL12 qui se lie uniquement à CXCR4 et qui participe à l'homéostasie des cellules au sein de la moelle osseuse. CCL25, exprimé dans le thymus et son récepteur CCR9 exprimé par les T, participent à la colonisation et la maturation des T au sein du thymus (Stone et al., 2017) . La majorité des autres chimiokines et leurs récepteurs sont exprimés en réponse à des stimuli inflammatoires. Le système chimiokine/récepteurs est un système très complexe et plastique. La grande flexibilité de ce système est tout d'abord due au grand nombre de chimiokines existantes, à leur capacité à interagir avec d'autres molécules telles que les glycosaminoglycanes mais aussi à la régulation de leur expression par des facteurs de transcription (Ransohoff, 2009) . Par ailleurs c'est un système redondant. En effet la plupart des chimiokines peuvent se lier et activer plusieurs récepteurs. A l'inverse, les récepteurs de chimiokines peuvent répondre à plusieurs chimiokines. Si l'on parle souvent de redondance, il se pourrait que cette particularité soit en fait une stratégie permettant aux leucocytes de répondre à différents stimuli inflammatoires. Une conséquence importante de cette redondance est que si plusieurs ligands sont capables de lier le même récepteur, ils vont alors rentrer en compétition. Ainsi le degré de saturation d'un récepteur par une chimiokine associée dépend de la concentration de son ligand mais également de la concentration des autres chimiokines capables de lier le même récepteur (Stone et al., 2017) .

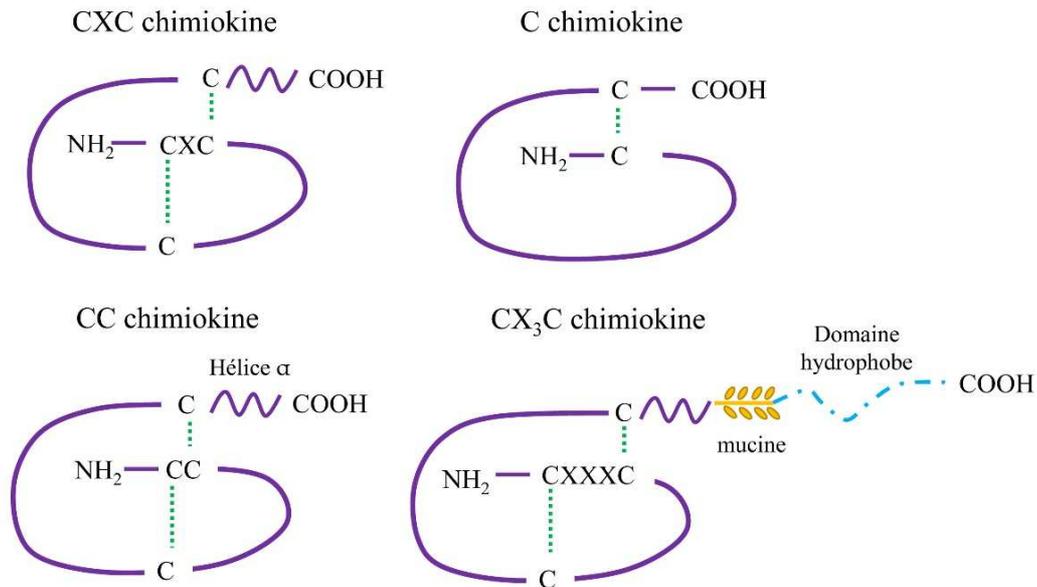


Figure 14: Classification des 4 groupes de chimiokines

## 2) Le mécanisme de la migration

### 2.1) La diapédèse

Le chimiotactisme cellulaire est principalement provoqué par l'action d'un gradient de chimiokines. Plus que la migration, les chimiokines ont en réalité pour premier rôle l'arrêt des cellules au niveau de l'épithélium ou de l'endothélium. En effet, une fois excrétées dans le sang par les cellules endothéliales, elles forment un gradient de concentration permettant aux cellules exprimant les récepteurs correspondant de s'arrêter et d'induire le changement de conformation des intégrines, permettant ainsi une adhérence de haute affinité avec l'endothélium (Ransohoff, 2009). La diapédèse est constituée de trois étapes majeures : le roulement, l'activation et l'adhérence, qui permettent la transmigration de la cellule à travers un épithélium. Ces étapes ont été découvertes au cours du 19<sup>ème</sup> siècle notamment par Henri Dutrochet (WILSON, 1947). Le roulement est contrôlé par des sélectines : les P, L et E-sélectines qui interagissent avec leur ligand PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1). Les L-sélectines sont exprimées majoritairement par les leucocytes, alors que les E-sélectines et les P-sélectines sont exprimées par les cellules endothéliales (Kansas, 1996; Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007; McEver & Cummings, 1997). Les intégrines participent également au roulement. Les cellules exprimant l'intégrine α4β7 peuvent se lier au ligand « mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule » (MADCAM1); les lymphocytes exprimant l'intégrine « very late antigen 4 » (VLA4) peuvent rouler sur les cellules endothéliales exprimant le ligand « vascular cell-adhesion molecule 1 » (VCAM1) (Berlin et al.,

1995) . Divers signaux médiés essentiellement par les chimiokines et les intégrines actives entrent en jeu, pour convertir le roulement (rolling) de la cellule sur la surface de l'endothélium en arrêt total. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le roulement est rapidement arrêté par la liaison entre les chimiokines et leurs récepteurs, ainsi que par la liaison entre les intégrines exprimées par les leucocytes (VLA4 et LFA1) et des molécules de la famille des immunoglobulines, ICAM1 et VCAM1, exprimées par les cellules endothéliales (Campbell et al., 1998; Campbell, Qin, Bacon, Mackay, & Butcher, 1996) . Durant un épisode inflammatoire les cellules endothéliales activées par les cytokines pro-inflammatoires sécrètent des molécules d'adhérence au niveau de leur surface ou transportent des molécules par voie transcellulaire (Middleton et al., 1997) . Par exemple, les cellules à mucus sécrètent la chimiokine CCL5 (RANTES) afin de déclencher l'arrêt des monocytes en roulement (von Hundelshausen et al., 2001) . La liaison entre les chimiokines et leur récepteur active ces intégrines, et peuvent réguler leur affinité. Chez les monocytes, l'augmentation de l'affinité de VLA4 pour son ligand VCAM1 induit des changements de conformation et l'arrêt des cellules sur l'endothélium (Chigaev, Wu, Williams, Smagley, & Sklar, 2011; Ley et al., 2007) . La migration transendothéliale est la dernière étape. Elle peut se faire de manière paracellulaire mais également par voie transcellulaire. La liaison entre les molécules d'adhérence des cellules endothéliales induit une augmentation de l'espace inter-endothélial, ce qui facilite la migration des leucocytes à travers les jonctions membranaires. La transmigration des leucocytes est également associée à une augmentation du calcium intracellulaire qui permet une ouverture de l'espace inter-cellulaire par l'intermédiaire de l'activation des chaînes légères de myosine (Huang et al., 1993) . La migration transcellulaire est utilisée par une minorité de cellules dont celles présentes au niveau du système nerveux central (Feng, Nagy, Pyne, Dvorak, & Dvorak, 1998) et dans des modèles *in vitro* (Millán et al., 2006) .

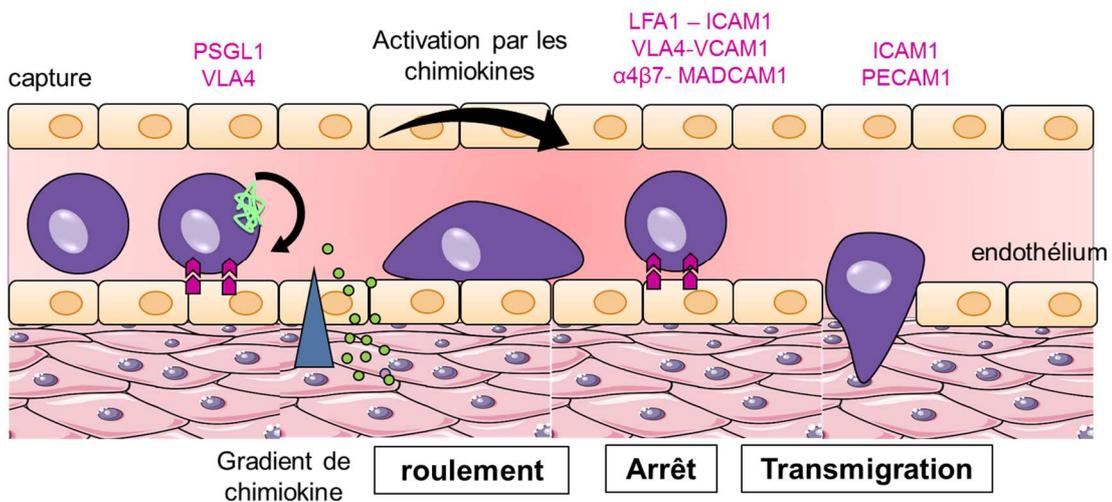
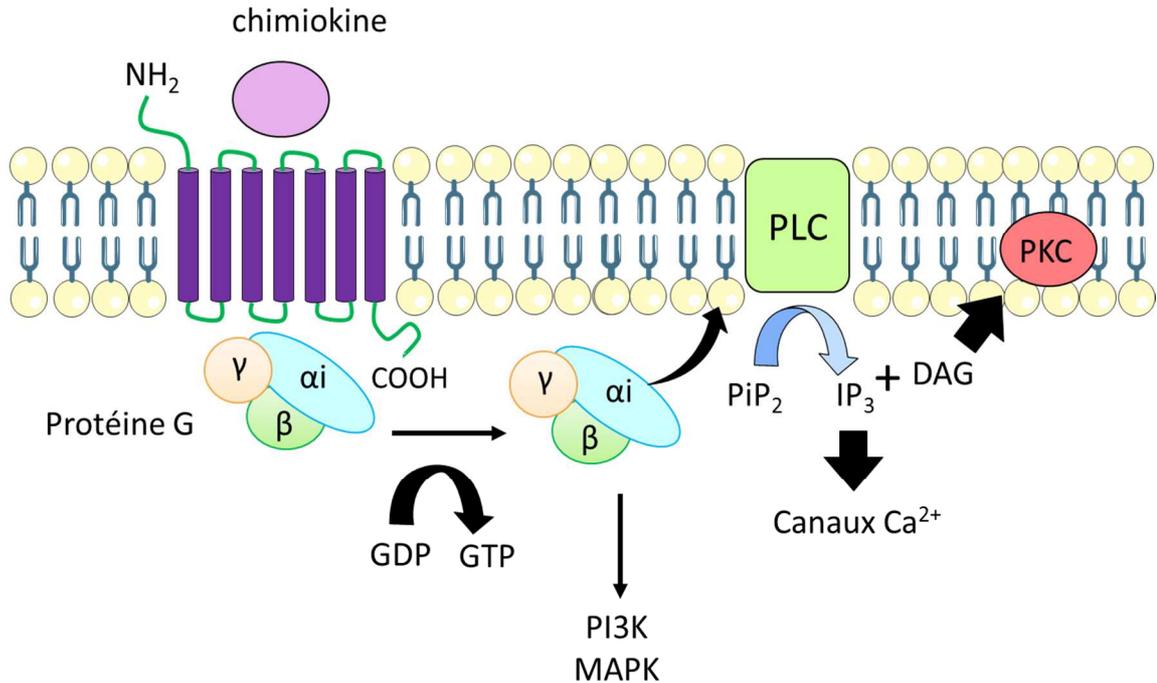


Figure 15: Mécanisme de la diapédèse

## *2.2) Voie de la PLC (phospholipase C)*

Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs couplés aux protéines G possédant 7 domaines transmembranaires. La transduction fonctionne donc comme pour tous les autres GPCR. En effet, les protéines G sont inactives quand elles sont couplées au guanosine diphosphate (GDP) et s'active lorsque le GDP est échangé par une guanosine triphosphate (GTP) (Curnock, Logan, & Ward, 2002; Murdoch & Finn, 2000) . Lorsque la chimiokine se lie à son récepteur, cela entraîne l'échange du GDP par un GTP ce qui induit la dissociation de la protéine G en deux sous-unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ , cette dernière étant capable d'activer une phospholipase C (PLC) membranaire (Ritter & Hall, 2009) . La majorité des chimiokines transduisent le signal par l'intermédiaire de la sous unité  $G\alpha_i$ . La PLC est par la suite responsable du clivage du phosphatidyl biphosphate ( $PIP_2$ ) en diacy-glycerol (DAG) et phosphatidylinositol 3 phosphate ( $IP_3$ ). L' $IP_3$  permet la libération du calcium intracellulaire stocké au niveau du réticulum endoplasmique et le DAG permet l'activation de protéines kinases C (PKC). Les sous unités  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$  peuvent également activer la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) indépendamment, ce qui induit l'activation d'autres kinases dont les MAPK (mitogen-activated proteins kinases) (Servant et al., 2000) . Le PI3K phosphoryle le  $PIP_2$  en  $PIP_3$  qui s'accumule au niveau de la membrane cellulaire. Sa présence induit alors des changements morphologiques de la cellule ainsi qu'une polymérisation de l'actine qui permet une meilleure polarisation de la cellule vers la plus haute concentration du gradient de chimiokine (Devreotes & Janetopoulos, 2003; Jin & Hereld, 2006) .



**Figure 16: Voie de la phospholipase C après activation du récepteur de chimiokine.** (PiP<sub>2</sub>: phosphatidyl inositol 4,5 diphosphate, Ip<sub>3</sub>: inositol 3 phosphate, DAG: diacylglycerol, PKC: protéine kinase C, PLC: phospholipase C, PI3K: phosphoinositide 3-kinase)

### 2.3) le recyclage à la membrane

Une fois les signaux intracellulaires activés, les récepteurs entrent dans un processus de désensibilisation et d'internalisation, un mécanisme rétroactif permettant de protéger les cellules d'une sur-stimulation (Bennett, Fox, & Signoret, 2011). Après activation du ligand, le domaine intra-cellulaire du récepteur est phosphorylé par des kinases comme GRK (G protein coupled receptor kinase). Cette phosphorylation entraîne l'internalisation du récepteur dans des vésicules d'endocytose tapissées de clathrines et sa dégradation par des lysosomes (Ferguson, 2001). Par ailleurs les chimiokines sont capables de réguler leur propre internalisation. Ainsi, CCR7 est internalisé grâce à l'arrestine 3 lorsqu'il est lié à CCL19 mais pas avec CCL21 (Byers et al., 2008). Les arrestines jouent un rôle important dans ce processus, en se fixant avec haute affinité au récepteur phosphorylé, elles permettent l'endocytose (Neel, Schutyser, Sai, Fan, & Richmond, 2005). Premièrement, les arrestines se lient au récepteur phosphorylé et bloquent ainsi stériquement l'interaction entre le récepteur et la protéine G (Vroon, Heijnen, & Kavelaars, 2006). En second, elles sont responsables de l'internalisation du GPCR dans les vésicules d'endocytose tapissées de clathrines qui entraîne la dégradation, la déphosphorylation et le recyclage à la membrane (Kelly, Bailey, & Henderson, 2008; Wolfe & Trejo, 2007). Ainsi, les neutrophiles déficients pour le gène de la

$\beta$ -arrestine présente une sur-production du calcium intracellulaire et une internalisation réduite de CXCR2 en réponse à CXCL1 (Su et al., 2005) . Les lymphocytes déficients pour la  $\beta$ -arrestine ont une migration altérée in vitro après activation du couple CXCR4/CXCL12. Par ailleurs, cette étude montre le rôle majeur que jouent les  $\beta$ -arrestines dans l'asthme allergique puisque les souris déficientes pour la  $\beta$ -arrestine ont une moindre accumulation des TH2 au niveau des poumons (Walker et al., 2003) .

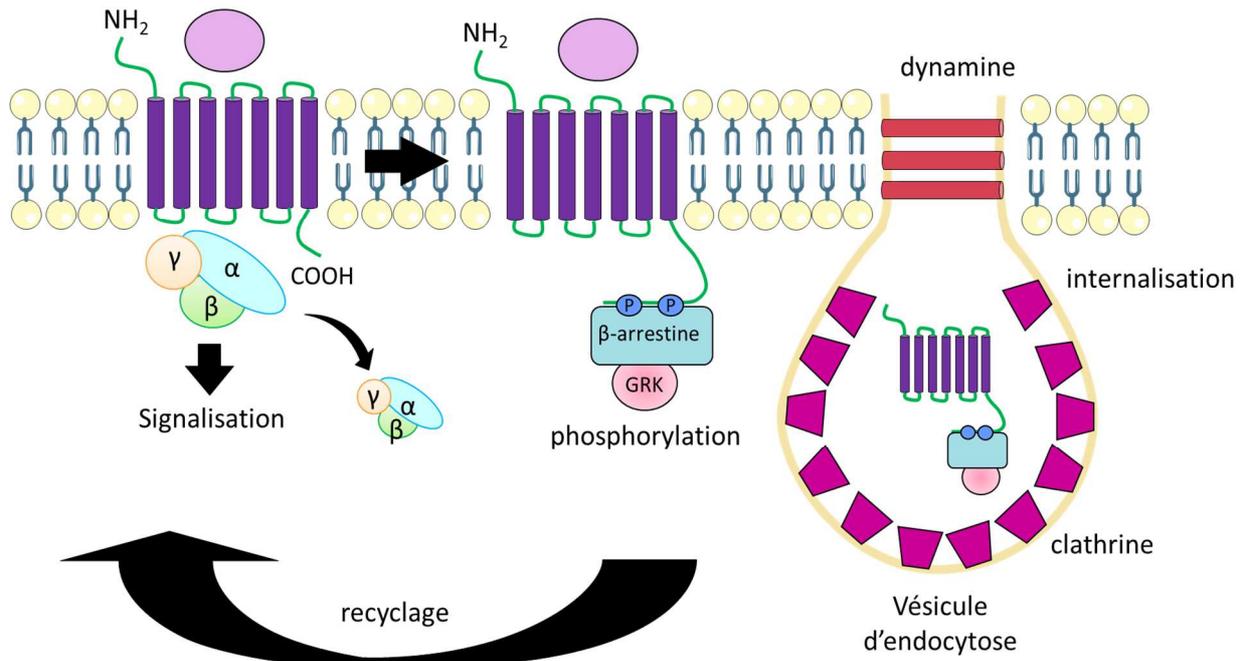


Figure 17: Internalisation et recyclage du récepteur de chimiokine

## II. Les chimiokines et leurs récepteurs dans le système immunitaire

### 1) Organes lymphoïdes primaires

Les organes lymphoïdes primaires sont le siège du développement et de la différenciation des précurseurs cellulaires en cellules immunitaires matures. Ces processus sont en partie contrôlés par l'expression des chimiokines et de leurs récepteurs. Le thymus permet le développement des lymphocytes T. Il est responsable de la différenciation, de l'expansion et de la sélection des précurseurs hématopoïétiques. Au fur et à mesure des étapes de différenciations, les lymphocytes T sont constamment en mouvement, celui-ci étant régi par

les chimiokines qui les guident de compartiment en compartiment. Le développement cellulaire des lymphocytes T est ainsi contrôlé en majeure partie par les couples CCR9/CCL25, CXCR4/CXCL12 et CCR7/CCL21 (Griffith, Sokol, & Luster, 2014; Love & Bhandoola, 2011) . En effet les souris déficientes pour CCR7 ou CCR9 présentent une réduction massive du nombre de thymocytes car ces deux récepteurs sont responsables de la colonisation du thymus par les progéniteurs hématopoïétiques (Liu et al., 2006; Schulz et al., 2016) . Les progéniteurs entrent ainsi dans le thymus par l'expression de CXCR4 qui se lie au CXCL12 exprimé par les cellules épithéliales (Griffith et al. 2014). Ensuite, ces cellules se différencient en double négatifs CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> et commencent à proliférer au niveau des jonctions cortico-médullaires. Les doubles négatifs exprimant les récepteurs CCR9 et CXCR4, sont alors testés selon le réarrangement de leur TCR et entrent dans le processus de sélection positive et négative; s'ils passent cette sélection, ils se différencient en double positifs CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> au niveau du cortex. Les cellules doubles positives expriment en plus le récepteur CCR4 et CCR7 ce qui permet leur différenciation en simple positif et le passage dans la médulla (Bunting, Comerford, & McColl, 2011) . La sortie des cellules simples positives CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> est régulée par l'expression du récepteur de la sphingosine-1-phosphate (S1PR). La rétention et la maturation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse sont largement régulées par l'axe CXCR4/CXCL12. Ces cellules expriment une grande quantité de CXCR4 à leur surface qui se lie à CXCL12 au niveau des ostéoblastes, des cellules endothéliales et des fibroblastes (Sugiyama, Kohara, Noda, & Nagasawa, 2006) . L'axe CXCR4/CXCL12 est nécessaire à la différenciation de nombreuses cellules immunitaires dont les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les NK et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Mercier, Ragu, & Scadden, 2011) . Il permet la rétention des progéniteurs ainsi que des cellules matures dans la moelle osseuse. Le blocage de CXCR4 par des antagonistes induit une mobilisation excessive et anormale des neutrophiles dans le sang (Broxmeyer et al., 2005) . En conditions basales, l'expression du récepteur CXCR4 sur les neutrophiles diminue tout au long de leur maturation, permettant leur sortie dans le sang et dans les tissus périphériques. La maturation et la libération des lymphocytes B sont également contrôlées par l'axe CXCR4/CXCL12. Le KO conditionnel de CXCR4 sur les B induit ainsi une sortie prématurée des B de la moelle osseuse vers le sang (Nie et al., 2004) . Au fur et à mesure de la différenciation des progéniteurs B en cellules B matures, l'expression de CXCR4 est diminuée. Finalement, la sortie des B est régulée par l'expression de S1PR (Allende et al., 2010) .

## 2) Organes lymphoïdes secondaires

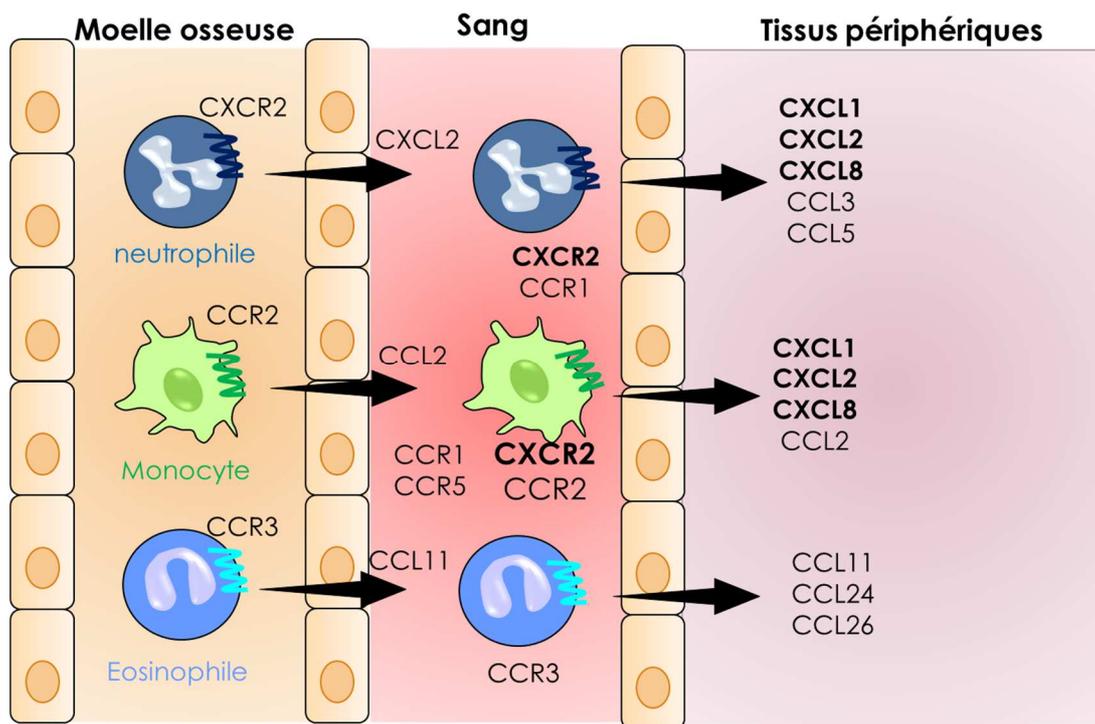
Les organes lymphoïdes secondaires sont composés des ganglions lymphatiques, des plaques de Peyer et de la rate. L'entrée des cellules dans les ganglions lymphatiques nécessite une multitude de signaux générés par les chimiokines, les intégrines ou encore les sélectines. Les cellules T naïves entrent dans les ganglions lymphatiques par les veinules à endothélium épais (HEV high endothelial veinules). Brièvement, les cellules roulent au niveau de l'endothélium grâce à l'expression de sélectines, puis s'accrochent fermement par l'interaction des intégrines avant de traverser par extravasation à travers les cellules endothéliales (Ley et al., 2007) . La première étape de roulement est médiée par l'expression de la sélectine CD62L par les lymphocytes naïfs et par l'expression d'adressine PNA<sub>d</sub> (peripheral LN adressin) par les cellules endothéliales (Miyasaka & Tanaka, 2004; von Andrian & Mempel, 2003) . Au niveau des plaques de Peyer, l'interaction entre la cellule et l'endothélium se fait par l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et son ligand MadCam-1 (Griffith et al. 2014). Ces interactions induisent et facilitent la reconnaissance des récepteurs par les chimiokines associées. Les couples chimiokine/récepteur régulant l'activation des intégrines et l'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer sont CCL19 et 21/CCR7 et CXCL12/CXCR4 pour les lymphocytes B et T et seulement CXCL13/CXCR5 pour les B. En effet, CCL21 peut être détectée en grande quantité dans les HEV des ganglions lymphatiques et dans les plaques de Peyer, et dans les zones T de la rate (Gunn et al., 1998; Stein et al., 2000) . En revanche CCL19 est produite par les cellules perivasculaires et amenée par voie transcellulaire au niveau du lumen des HEV (Baekkevold et al., 2001) . CXCR4 contribue dans une moindre mesure que CCR7 à l'entrée des cellules lymphocytaires dans les ganglions lymphatiques. CXCL12 est retrouvée au niveau du lumen des HEV mais tout comme CCL19, son expression semble être localisée aux cellules perivasculaires (Okada et al., 2002) . Par ailleurs, son action semble être redondante avec CCR7 puisque l'entrée des cellules CXCR4<sup>-/-</sup> ne semble être altérée qu'en l'absence de CCR7 (Okada et al., 2002) . Après leur entrée dans les ganglions lymphatiques, les chimiokines et leurs récepteurs sont également indispensables pour la reconnaissance entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigènes. CCR7 apparaît là-aussi essentiel dans ce processus, puisque la mobilité et la vitesse des cellules CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-/-</sup> semblent être altérées après leur entrée dans les ganglions lymphatiques (Worbs, Mempel, Bölter, von Andrian, & Förster, 2007) . Le couple CXCR5/CXCL13 permet le positionnement des lymphocytes B dans les ganglions après leur entrée. A l'inverse, CCR7 et CXCR4 sont requis uniquement pour l'entrée des B et non pour leur positionnement (Coelho et al., 2013) . Les cellules dendritiques sécrètent également des chimiokines comme CCL19 au niveau des zones T des ganglions, ce qui permet l'attraction

des cellules T naïves CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que les B. Via l'expression de CCR7 sur les cellules naïves, les cellules dendritiques peuvent alors établir une interaction qui précède l'établissement de la synapse immunologique (Friedman, Jacobelli, & Krummel, 2006) . Le récepteur de la sphingosine-1-phosphate permet ici aussi la sortie des lymphocytes hors des ganglions lymphatiques. De la même manière que dans les ganglions, les récepteurs de chimiokines CCR7 et CXCR5 et leurs chimiokines associées CCL19, 21 et CXCL13 sont nécessaires pour l'entrée des lymphocytes T et B respectivement dans la rate (Griffith et al. 2014).

### 3) Périphérie

En conditions basales, les chimiokines et leurs récepteurs contrôlent le positionnement et l'homéostasie cellulaire. Ainsi, après la sortie de la moelle osseuse, les neutrophiles circulent dans le sang où ils attendent un stimulus inflammatoire qui active alors leur migration dans les tissus périphériques. Les neutrophiles expriment majoritairement CXCR2 et CXCR1 (Griffith et al. 2014). En fin de vie, l'expression de CXCR4 augmente ce qui induit le retour des neutrophiles dans la moelle osseuse où ils rentrent en apoptose (Martin et al., 2003) . En conditions homéostatiques, les éosinophiles sont majoritairement retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal qui représente le plus gros réservoir d'éosinophiles dans l'organisme (Mishra, Hogan, Lee, Foster, & Rothenberg, 1999) . Les éosinophiles expriment CCR3 qui se lie à la famille des éotaxines dont CCL11, CCL24 et CCL26. Les lymphocytes naïfs circulent constamment entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires. Leur migration dépend largement de l'expression des intégrines et des chimiokines. Durant un épisode inflammatoire, l'expression de CCR7 et de S1PR sur les lymphocytes T activés est diminuée ainsi que la production de CCL21 (Pham, Okada, Matloubian, Lo, & Cyster, 2008) . Les lymphocytes T activés, sortant des ganglions lymphatiques sont alors guidés par l'intermédiaire de l'expression de récepteurs de chimiokines vers les tissus périphériques. Les cellules T effectrices CD8<sup>+</sup> régulent négativement leur expression de CD62L et CCR7 et expriment CXCR3 CCR5, CCR6, CXCR1 ou encore CX3CR1 (Nolz, Starbeck-Miller, & Harty, 2011) . Les lymphocytes TH1 expriment eux CXCR3, CCR5 et CXCR6 ; les TH2 expriment CCR4, CCR8, CX3CR1 et CRTH2 et les TH17 expriment CCR6 et CCR4 (Lim, Lee, Hillsamer, & Kim, 2008) . Les cellules T régulatrices expriment le récepteur CCR4. Ainsi, la délétion de CCR4 sur les T régulateurs empêche leur accumulation au niveau des poumons et de la peau et induit une inflammation cutanée spontanée (Sather et al., 2007) . Les cellules T régulatrices mémoires perdent l'expression des récepteurs de type naïfs CCR7 et de type intestinaux tel que CCR9 et  $\alpha\beta 7$  au profit des récepteurs inflammatoires de type cutané et pulmonaires comme CCR2, CCR4, CCR5, CCR6 et CCR8 (Grindebacke et al., 2009) . Ce changement

d'expression suggère que les lymphocytes T régulateurs circulants rencontrent et reconnaissent des antigènes au niveau de l'intestin puis sont soit retenus sur site ou activés par des cellules présentatrices d'antigènes et migrent vers d'autres sites d'inflammation tel que la peau ou les poumons par l'intermédiaire des récepteurs de chimiokines associés (Grindebacke et al., 2009) . Par ailleurs, le site d'activation est primordial dans la migration des lymphocytes T. Effet, au niveau de la peau, les lymphocytes T activés dans les ganglions lymphatiques cutanés par les cellules de Langherans vont exprimer préférentiellement le « cutaneous lymphocyte antigen » (CLA) ainsi que les récepteurs de chimiokine CCR4 CCR8 et CCR10, permettant leur migration vers la peau par l'intermédiaire des chimiokines CCL17 et 22, CCL1 et CCL27 respectivement (Homey, Steinhoff, Ruzicka, & Leung, 2006) . Si le mécanisme au niveau des poumons est moins bien documenté, on connaît en revanche le processus au niveau des ganglions mésentériques.



**Figure 18: Le contrôle du trafic cellulaire par les chimiokines entre la moelle épinière, le sang et les tissus périphériques en période d'inflammation. D'après GRIFFITH, Annual reviews of immunology, 2014**

Généralités : les chimiokines et leurs récepteurs

Chimiokine	Autres noms connus	Récepteur	Cellules/fonction
<b>CXCL1</b>	<b>KC</b>	<b>CXCR2</b>	<b>neutrophiles</b>
CXCL2	MIP2 $\alpha$	CXCR2	neutrophiles
CXCL3	MIP2 $\beta$	CXCR2	neutrophiles
CXCL4		?	
CXCL5		CXCR2	neutrophiles
CXCL6		CXCR1 CXCR2	neutrophiles
CXCL7		CXCR2	neutrophiles
<b>CXCL8</b>	<b>IL-8</b>	<b>CXCR1, CXCR2</b>	<b>neutrophiles</b>
CXCL9		CXCR3	TH1, CD8, NK
CXCL10		CXCR3	TH1, CD8, NK
CXCL11		CXCR3	TH1, CD8, NK
<b>CXCL12</b>	<b>SDF-1</b>	<b>CXCR4</b>	<b>Homéostasie moelle osseuse</b>
<b>CXCL13</b>	<b>BLC</b>	<b>CXCR5</b>	<b>Lymphocyte B et Tfh</b>
CXCL14		?	
CXCL15		?	
CXCL16		CXCR6	
CXCL17		?	
<b>CCL1</b>		<b>CCR8</b>	<b>TH2, Treg</b>
<b>CCL2</b>	<b>MCP-1</b>	<b>CCR2</b>	<b>monocyte</b>
CCL3	MIP1 $\alpha$	CCR1, CCR5	Macrophages, NK et interaction T/DC
CCL4	MIP1 $\beta$	CCR5	Macrophages, NK et interaction T/DC
<b>CCL5</b>	<b>RANTES</b>	<b>CCR1, CCR3, CCR5</b>	<b>Macrophages, NK et interaction T/DC</b>
CCL6		?	
CCL7	MCP-3	CCR2 CCR3	monocyte
CCL8	MCP-2	CCR1 CCR2, CCR3, CCR5(humain), CCR8 (souris)	TH2, homing cutané (souris)
CCL9/10		?	
<b>CCL11</b>	<b>Eotaxine 1</b>	<b>CCR3</b>	<b>Éosinophile basophiles</b>
CCL12	MCP-5 (souris)	CCR2	monocyte

Généralités : les chimiokines et leurs récepteurs

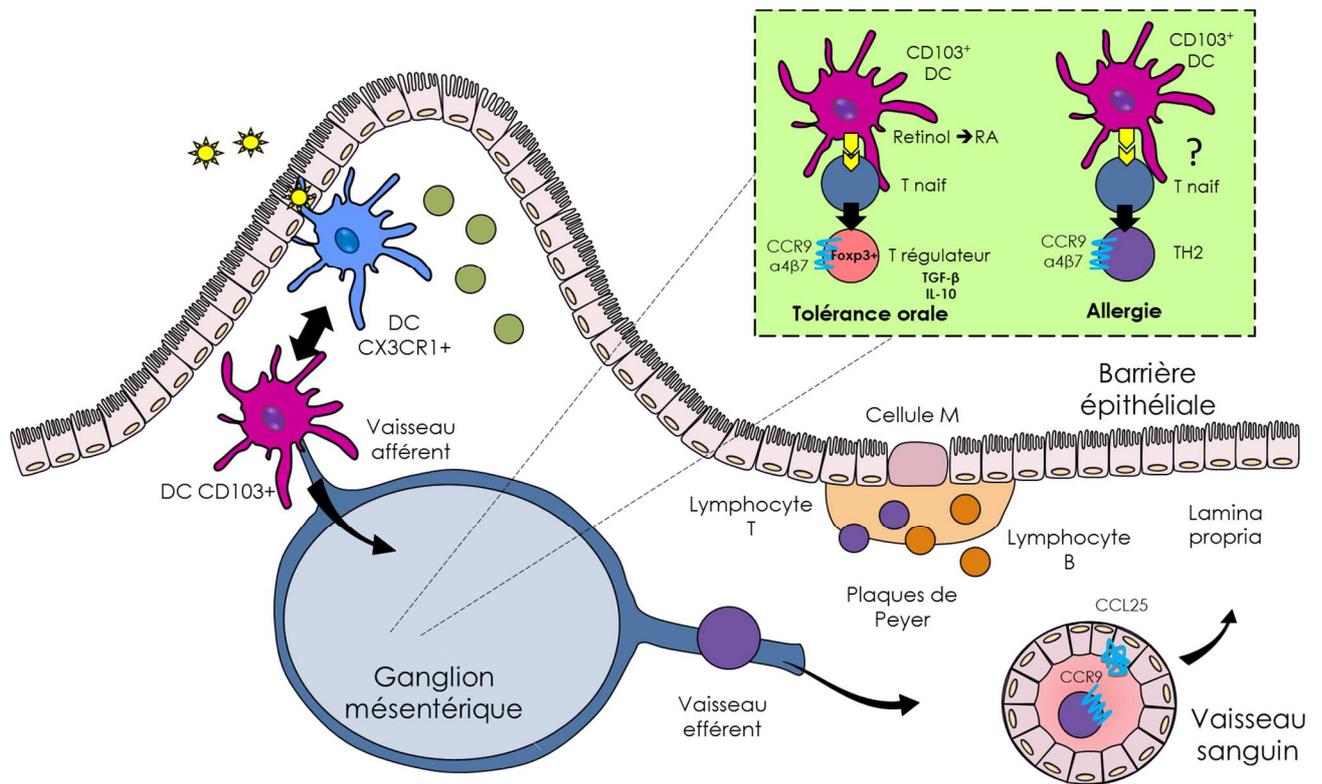
Chimiokine	Autres noms connus	récepteur	Fonction principale
CCL13	MCP-4	CCR2 CCR3 CCR5	TH2
CCL14		CCR1	
CCL15		CCR1, CCR3	
CCL16		CCR1, CCR2, CCR5	
CCL17	TARC	CCR4	TH2, Treg, homing pulmonaire et cutané
CCL18		CCR8	TH2 homing cutané
CCL19		CCR7	Homing ganglions méésentériques (T et DC)
CCL20	LARC	CCR6	TH17, B, et homing intestinal des DC
CCL21	SLC	CCR7	Homing ganglions méésentériques (T et DC)
CCL22	MDC	CCR4	TH2, Treg, homing pulmonaire et cutané
CCL23		?	
CCL24	Eotaxine 2	CCR3	Éosinophile basophiles
CCL25	TECK	CCR9	Thymocyte, homing intestinal T
CCL26	Eotaxine 3	CCR3	Éosinophile basophiles
CCL27	CTAK	CCR10	Homing cutané T
CCL28	MEC	CCR10	Homing cutané T
XCL1		XCR1	Cross présentation CD8+/DC
XCL2		XCR2	Cross présentation CD8+/DC
CX3CL1	fractalkine	CX3CR1	NK, monocyte et T (poumon)

*Tableau 3: Chimiokines et leurs récepteurs*

#### 4) Exemple de l'activation des T par les cellules CD103<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques

La muqueuse intestinale abrite de nombreuses cellules immunitaires dont les cellules dendritiques, qui sont positionnées stratégiquement sous l'épithélium afin de capturer les antigènes. Les cellules dendritiques sont localisées principalement au niveau de la lamina propria, des plaques de Peyer, des ganglions mésentériques et des follicules lymphoïdes isolés (Rescigno & Di Sabatino, 2009) . La majorité des cellules dendritiques exprime les marqueurs de surface CD11c et le CMH de classe II. Une partie de ces cellules, localisées au niveau de la lamina, exprime aussi le marqueur CD103 et possède des propriétés particulières (Ruane & Lavelle, 2011) . Le principal ligand de CD103 est l'E-cadhérine une molécule d'adhérence située au niveau des cellules épithéliales. Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> ont l'unique capacité de capturer l'antigène au niveau de l'épithélium intestinal et de migrer vers les ganglions mésentériques afin d'activer l'expression des molécules de domiciliation intestinale CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  sur les lymphocytes T grâce à la transformation du rétinol (vitamine A) en acide rétinoïque par l'enzyme rétinol déshydrogénase (RALDH2) (Johansson-Lindbom & Agace, 2007) . En effet, il a tout d'abord été montré que l'acide rétinoïque et le rétinol était retrouvés en grande quantité au niveau de l'intestin grêle (Lampen, Meyer, Arnhold, & Nau, 2000) . Par ailleurs, il a été montré que les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> exprimaient l'enzyme RALDH2 (Edele et al., 2008; Ilijev et al., 2009) . En parallèle, l'équipe de Maria Rescigno a montré que les cellules dendritiques CD11c<sup>+</sup> sont capables de traverser la couche de cellules épithéliales et de capturer les antigènes pour les transporter dans la lamina propria (Maria Rescigno & Di Sabatino, 2009) . Ainsi, il a été démontré que les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> étaient responsable de l'induction des molécules CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  sur les cellules T, par la conversion du rétinol et acide rétinoïque (Iwata et al., 2004; Mora et al., 2003) . A l'inverse des cellules CD103<sup>-</sup>, les cellules CD103<sup>+</sup> expriment beaucoup plus de RALDH2 et sont capables de migrer vers les ganglions mésentériques pour induire la domiciliation cellulaire des T naïfs (Annacker et al., 2005; Johansson-Lindbom et al., 2005) . Par ailleurs il a été montré que ce mécanisme participe à la tolérance orale. En effet, à l'inverse des T régulateurs naturels (nTreg), qui se différencient dans le thymus, les T régulateurs induits (iTreg) sont issus de la différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> après stimulation antigénique. Les cellules CD103<sup>+</sup> sont ainsi capables d'induire la conversion des cellules T naïves en T régulateurs Foxp3<sup>+</sup>, grâce au TGF- $\beta$  et à l'acide rétinoïque (Coombes et al., 2007; Jaensson et al., 2008; Siddiqui & Powrie, 2008) . Plus récemment il a été montré que l'IL-10 participe aussi à l'induction de l'expression des récepteurs de domiciliation cellulaire des T régulateurs par les cellules CD103<sup>+</sup> (Bakdash, Vogelpoel, van Capel, Kapsenberg, & de Jong, 2015) . Les cellules dendritiques CD103<sup>+</sup> sont

une catégorie qui se différencie des cellules dendritiques CX3CR1<sup>+</sup> par leur capacité à migrer. En effet, les cellules CX3CR1<sup>+</sup> ont la propriété de récupérer les antigènes directement au niveau du lumen grâce à l'allongement de leurs dendrites à travers les cellules épithéliales (Niess et al., 2005) . Contrairement aux CD103<sup>+</sup>, ces cellules ne sont pas migratoires ; il est en effet probable que les cellules CX3CR1<sup>+</sup> capturent l'antigène et le passent ensuite aux CD103<sup>+</sup> qui vont ensuite migrer jusqu'aux ganglions mésentériques (Schulz et al., 2009) . Les cellules CX3CR1<sup>+</sup> sont en fait reconnues plus comme des macrophages que comme des cellules dendritiques.



**Figure 19: Stimulation des lymphocytes T naïfs par les cellules dendritiques CD103+ dans la tolérance orale et dans l'allergie**

### POINTS CLES

- Il existe 4 familles de chimiokines : CCL, CXCL, XCL et CX3CL
- Les chimiokines et leurs récepteurs sont responsables du recrutement et du positionnement des cellules immunitaires à travers un phénomène appelé diapédèse qui est composé de trois étapes : le roulement, l'arrêt et la transmigration
- Il existe des chimiokines homéostatiques (CCR7/CCL21 et 19, CXCR4/CXCL12 et CCR9/CCL25) et des chimiokines inflammatoires
- Au niveau intestinal, les cellules dendritiques CD103+ sont responsables de la stimulation des T naïfs et de l'expression des récepteurs de domiciliation intestinale

## III. Implication des récepteurs de chimiokines dans l'allergie

### 1) Un récepteur intestinal : CCR9

Découvert en 1999 en tant que ligand unique de TECK (Thymus-expressed chemokine) ou CCL25 selon la nomenclature officielle, CCR9 est un récepteur de chimiokine à sept domaines transmembranaires exprimé majoritairement dans les thymocytes (Norment, Bogatzki, Gantner, & Bevan, 2000; Zaballos, Gutiérrez, Varona, Ardavín, & Márquez, 1999) . En effet, il a été montré que CCR9 induisait la migration des cellules lymphocytaires immatures doubles positives CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> et matures CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au sein du thymus (Youn, Kim, Smith, & Broxmeyer, 1999) . La délétion de CCR9 sur des souris empêche la migration *in vitro* des thymocytes vers CCL25 en transwell et ainsi inhibe le développement normal des cellules T au sein du thymus (Wurbel et al., 2001) . De ce fait, CCR9 a tout d'abord été catégorisé en récepteur de chimiokine homéostatique, c'est-à-dire régulant la migration des cellules immunitaires, notamment les lymphocytes et les thymocytes en conditions basales. Dans la foulée, il a été démontré que CCR9 était aussi exprimé par les lymphocytes intestinaux exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et non pas par les lymphocytes cutanés CLA<sup>+</sup> (Zabel et al., 1999) .

La sécrétion de TECK par les cellules épithéliales intestinales a permis de montrer que le couple CCR9/TECK permettait la migration des lymphocytes CD4 et CD8 vers l'intestin (M. A. Wurbel et al., 2001) et que les souris déficientes pour CCL25 présentaient une migration altérée des lymphocytes CD8 spécifiques d'un antigène dans la lamina propria (M.-A. A. Wurbel, Malissen, Guy-Grand, Malissen, & Campbell, 2007). Par ailleurs une étude a montré que la domiciliation des lymphocytes T par l'expression de CCR9 était préférentiellement dirigée vers l'intestin grêle et non pas le colon (Papadakis et al., 2000). En conséquence le couple CCR9/CCL25 est l'unique couple permettant la migration des cellules immunitaires vers l'intestin. Très rapidement, certaines études se sont alors penchées sur le rôle potentiel de CCR9 et TECK dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Chez la souris, il a été démontré que le couple CCL25/CCR9 régulait l'inflammation dans un modèle de colite ulcéreuse induit par le DSS (Dextran sodium sulfate) (M.-A. Wurbel, McIntire, Dwyer, & Fiebiger, 2011). Dans un modèle de colite induite à l'oxazolone, le couple CCL25/CCR9 favorise l'induction des cellules iNKT (Zhu et al. 2014). Chez l'homme il a été démontré que les lymphocytes CCR9<sup>+</sup> étaient présents en plus grande quantité dans le sang des patients cœliaques ou atteints de la maladie de Crohn ; par ailleurs l'expression de TECK est augmentée dans les cellules épithéliales intestinales des cryptes (K. A. Papadakis et al., 2000). Dans les ganglions mésentériques de patients atteints de la maladie de Crohn, il a été montré que les lymphocytes T CCR9<sup>+</sup> étaient pro-inflammatoires et exprimaient plus d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  après stimulation anti-CD3 que les cellules de patients sains (Saruta et al., 2007). Dans des biopsies de patients atteints de la maladie cœliaque, une étude montre une réduction des lymphocytes CD3<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> (Olaussen et al. 2007).

Ces résultats ont ouvert la voie au développement d'antagonistes de CCR9 et aux lancements d'essais cliniques sur des patients souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin. Ainsi un antagoniste de CCR9 appelé Vercirnon sous son nom commercial (ChemoCentryx), a été testé dans plusieurs essais cliniques sur des patients atteints de maladie inflammatoires de l'intestin (Eksteen & Adams, 2010; Walters et al., 2010). Le premier essai clinique (PROTECT-1) réalisé sur des patients souffrant de maladie de Crohn utilisant l'antagoniste de CCR9 nommé alors CCX282-B a montré des résultats encourageants. Suivant cette étude, la phase III de l'essai clinique (SHIELD) a été réalisée en collaboration avec GlaxoSmithKline (l'antagoniste a ainsi été renommé GSK1605786) toujours sur des patients souffrant de maladie de Crohn, modérée à sévère. L'étude, randomisée, à double insu et contrôlée avec placebo a évalué l'efficacité du Vercirnon donné à hauteur de 500mg par jour par voie orale pendant 12 semaines. Cependant, les résultats n'ont montré aucunes différences significatives entre le groupe traité et le groupe placebo. L'essai clinique a donc été stoppé en phase III en 2013 en raison de l'inefficacité de l'antagoniste (Feagan et al., 2015; Kalindjian et al., 2016;

Wendt & Keshav, 2015) . Plusieurs explications ont été avancées pour essayer de comprendre les résultats des deux essais cliniques. Tout d'abord, la population sélectionnée pour le deuxième essai (SHIELD) était plus sévèrement malade que pour le premier essai (PROTECT-1) (Kalindjian et al., 2016) . Par ailleurs, il est mentionné que l'anti-CCR9 présente un faible profil pharmacocinétique même si son absorption semble normale. En effet, les concentrations plasmatiques en antagoniste mesurées sont en adéquation avec celles calculées permettant un blocage suffisant de CCR9 (Feagan et al., 2015) . En revanche il est probable que la durée déterminée de 12 semaines ne soit pas suffisante pour observer un effet significatif sur les patients. Enfin, une des hypothèses avancées pour expliquer le manque d'efficacité de l'antagoniste, est que CCR9 jouerait un rôle limité dans la réponse inflammatoire au cours de la maladie de Crohn (Feagan et al., 2015) . D'autres études sont en cours afin de développer de nouveaux antagonistes de CCR9 (Kalindjian et al., 2016) . Une autre approche serait de cibler non pas le récepteur mais son ligand, CCL25, par de petites molécules appelées neutraligands. En effet, une stratégie alternative à l'utilisation d'antagoniste est l'utilisation de molécule bloquant les ligands. Une étude a ainsi montré que la chalcone 4 bloque la liaison entre CXCL12 et CXCR4 (Daubeuf et al., 2013) . Le couple CXCR4/CXCL12 est fortement impliqué dans le développement tissulaire à travers la migration des cellules embryonnaires et hématopoïétiques. Cependant, on sait également qu'il joue un rôle dans l'inflammation, particulièrement dans la migration transendothéliale des lymphocytes et leur recrutement au sein des tissus enflammés tel que les poumons dans l'asthme (Gonzalo et al., 2000; Lukacs, Berlin, Schols, Skerlj, & Bridger, 2002) . Il a ainsi été montré que l'utilisation de la chalcone 4 bloque l'effet de CXCL12 sur CXCR4 sans affecter l'activité basale de ce récepteur et permet une réduction de l'inflammation dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine (Gasparik et al., 2012) .

## [2\) Les récepteurs de chimiokines dans l'allergie](#)

### Revue : Chemokine receptors in allergic diseases

**Laure Castan**, Antoine Magnan, Gregory Bouchaud, Allergy, 2016



## REVIEW ARTICLE

## Chemokine receptors in allergic diseases

L. Castan<sup>1,2,3,4</sup>, A. Magnan<sup>2,3,5</sup> & G. Bouchaud<sup>1</sup><sup>1</sup>INRA, UR1268 BIA; <sup>2</sup>INSERM, UMR1087, Institut du thorax; <sup>3</sup>CNRS, UMR6291; <sup>4</sup>Université de Nantes; <sup>5</sup>CHU de Nantes, Service de Pneumologie, Institut du thorax, Nantes, FranceTo cite this article: Castan L, Magnan A, Bouchaud G. Chemokine receptors in allergic diseases. *Allergy* 2017; 72: 682–690.

## Keywords

asthma; atopic dermatitis; chemokine; chemokine receptor; food allergy.

## Correspondence

Gregory Bouchaud, INRA, UR1268 BIA, rue de la geraudière, BP 71627, F-44316 Nantes, France.  
 Tel.: +33 2 40 67 50 35  
 Fax: +33 2 40 67 50 25  
 E-mail: [gregory.bouchaud@nantes.inra.fr](mailto:gregory.bouchaud@nantes.inra.fr)

Accepted for publication 11 November 2016

DOI:10.1111/all.13089

Edited by: Thomas Bieber

## Abstract

Under homeostatic conditions, as well as in various diseases, leukocyte migration is a crucial issue for the immune system that is mainly organized through the activation of bone marrow-derived cells in various tissues. Immune cell trafficking is orchestrated by a family of small proteins called chemokines. Leukocytes express cell-surface receptors that bind to chemokines and trigger transendothelial migration. Most allergic diseases, such as asthma, rhinitis, food allergies, and atopic dermatitis, are generally classified by the tissue rather than the type of inflammation, making the chemokine/chemokine receptor system a key point of the immune response. Moreover, because small antagonists can easily block such receptors, various molecules have been developed to suppress the recruitment of immune cells during allergic reactions, representing potential new drugs for allergies. We review the chemokines and chemokine receptors that are important in asthma, food allergies, and atopic dermatitis and their respectively developed antagonists.

In homeostasis, as well as under inflammatory conditions, immune cells travel throughout the entire organism in the blood and lymphatic vessels. Homing of immune cells to inflamed tissues and organs is a crucial step for defense against pathogens and infections. Under inflammatory conditions, immune cells migrate to the site of inflammation owing to a common process orchestrated by small molecules of 15 kDa called chemokines. Chemokines are subdivided into the following four groups according to the arrangement of the amino terminal cysteine residues: CC, CXC, C, and CXC3C (Fig. 1). Approximately forty chemokines can be linked to nineteen chemokine receptors, which are coupled to G proteins expressed by a large variety of immune cells. Each of these receptors can be linked to several molecules of the same group. Chemokines are mostly expressed by endothelial and epithelial cells. Thus, when immune cells expressing a chemokine receptor travel through the blood and lymphatic vessels, they are attracted by their matching ligands. Adhesion molecules such as integrins are also involved in the process to stabilize circulating cells against the vessel wall (1). Four major steps govern this process called chemotaxis: rolling, activation, arrest, and transendothelial migration. When chemokines are secreted into the outer-cell medium, targeted cells will position themselves toward the gradient. The first step of this migration is the rolling of the cells on the endothelial cell layer. This step depends on the interaction

between integrins and selectins, such as E-selectin, P-selectin, or L-selectin (CD62L), expressed only by naïve cells. Once the leukocyte is fixed on the endothelium, the chemokine receptor binds to its ligand to immobilize the cell. This interaction induces conformational changes that lead to increased affinity to integrins, reinforcing adhesion to the endothelium. Finally, the cell crosses the endothelium through cell junctions (2).

Once a chemokine has bound to its receptor, a signaling cascade triggers cytosolic calcium elevation: The activation of the G protein induces the activation of phospholipase C, which cleaves the phosphatidyl-inositol diphosphate into two parts, the diacylglycerol and the inositol triphosphate, which activate the protein kinase C for the first and trigger calcium elevation for the second. These chain reactions lead to signaling cascades, such as those mediated by MAPK, ERK, and JAK, which trigger the expression of various molecules responsible for cell migration (3).

Most of the chemokines and chemokine receptors are not essential for life, as shown by targeted gene deletions in mice. CXCL12 is the only exception because, in the fetal state, CXCL12-knockout mice do not survive because of multiple organ failure. Indeed, CXCL12 is responsible for the migration of haematopoietic progenitor cells in the bone marrow (4). Immune cells can express various chemokine receptors at the same time, and the pattern of expression can be classified

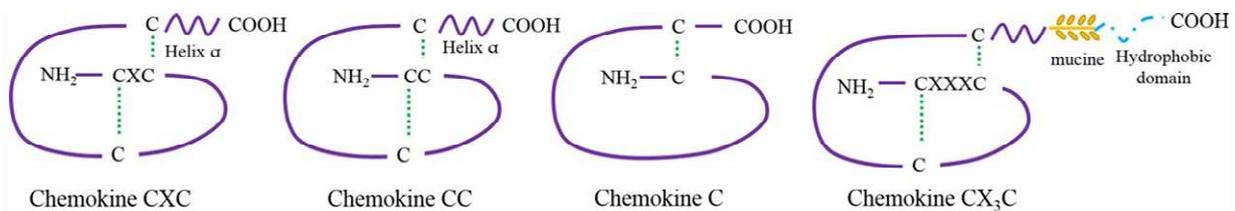


Figure 1 Structure of the four classes of chemokines.

by homeostatic and inflammatory receptors (1). Homeostatic receptors, such as CCR7, CCR9, CCR10, and CXCR4, are chemokine receptors expressed under basal conditions, but some of them can also be overexpressed in inflammatory states. The homeostatic receptors are mainly expressed during organogenesis or for development of tissues, such as secondary lymphoid organs, including the lymph nodes (LN). CCR7, mainly expressed by naïve T cells, allows these cells to enter into secondary lymphoid organs owing to its interaction with CCL21 and CCL19. The pair CCL25/CCR9 is involved in thymus development: Immature T cells are attracted by the expression of CCL25 by thymic dendritic cells (5). Inflammatory chemokine receptors are expressed in inflamed tissues by resident immune cells and cells stimulated by the cytokine environment (6). Indeed, the presence of pro-inflammatory cytokines or pathogens induces the expression of chemokine receptors on cells. However, the expression of tissue-specific chemokine receptors is imprinted by dendritic cells in secondary lymphoid organs, which activate lymphocytes. Thus, the specific homing is due to the activation site (7). For example, lymphocytes in the mesenteric LN are imprinted by CD103<sup>+</sup> dendritic cells during antigenic sensitization to express CCR9 and a4b7, which lead to their migration to the intestine. In the skin, Langerhans cells activate T cells to express CCR10, CCR4, CCR8, and the CLA (8). While these mechanisms are well known for the skin and the intestine, the migration of immune cells within the lungs remains unclear.

Chemokines and chemokine receptors are involved in several mechanisms of the immune system. Their first and main role is chemotaxis. The cell migration occurs when chemokines are expressed in the extracellular medium. Chemokine expression is generally due to epithelial and endothelial cells and correlated with the receptor expression by immune cells. For example, in asthma, the increased expression of CCR4 by T cells from broncho-alveolar lavage has been correlated with the increased expression of CCL22 measured by enzyme-linked immunosorbent assay (9). Moreover, the increase in CCL25 within the intestine in chronic inflammatory diseases was correlated with the increase in CCR9-expressing T cells in mesenteric LN (10). Finally, in atopic dermatitis, the increased expression of CCL18 by skin epithelial cells has been correlated with increases in CLA<sup>+</sup> T cells and CCR8<sup>+</sup> T cells (11). As a consequence, it has been shown that it is the increased expression of chemokines that precedes the homing of the cells. The secretion of CCL17 by bronchial epithelial cells and dendritic cells in asthmatic

subjects preceded the homing of Th2 cells (12). In another study using a model of acute asthma, the authors showed that a higher concentration of CCL22 found in the lungs, expressed by monocytes and macrophages, preceded the migration of Th2 cells (13). In the same manner, during the first stage of airway inflammation, the secretion of CCL11 led to eosinophil infiltration (14). Besides this role, the chemokine/chemokine receptor system is also involved in cell retention, survival, or cell proliferation. Indeed, chemokines also regulate the time spent by lymphocytes inside the LN. Within the LN, T cells follow the CCL19 and CCL21 gradient to encounter DCs. This migration is due to a CCR7-mediated retention signal which ends with the expression of the sphingosine-1-phosphate (S1P) gradient and the exit of the T cell out of the LN (15). In terms of retention, the CXCR4/CXCL12 couple is very important for the differentiation of hematopoietic stem cells into various immune cells. Indeed, the blockade of the CXCR4/CXCL12 axis induces the release of neutrophils from the bone marrow, indicating a strong role of the chemokine receptor in their retention (16). CXCR4 is also required for the B-cell retention within the bone marrow (17). In terms of survival, CX3CR1 was described to provide a prosurvival signal to monocytes (18) and is also involved in the survival of Th2 cells in allergic asthma (19).

In allergic diseases, it has been shown that multiple chemokine receptors are overexpressed depending on the affected tissue (Table 1). In this review, we explain the types of chemokine receptors that are involved in three major allergic diseases: asthma, food allergies, and atopic dermatitis. Chemokine receptors are expressed by all the immune cells, but considering that T cells are critical upstream mediators of the allergic inflammation and are essential for the adaptive response, we choose to focus our interest mainly on T-cell homing (Fig. 2). Moreover, we detail the respective antagonists that have been developed.

#### Chemokine receptors in asthma

Asthma is characterized by airway hyper-responsiveness and immune cell infiltration of the bronchi, composed of neutrophils, eosinophils, mast cells, and lymphocytes, particularly the Th2 subtype (20), leading to airway narrowing and respiratory symptoms. It has been shown that the accumulation of Th2 cells results from the recruitment of T cells from the mediastinal LN to the lungs and not from a proliferation of cells at the site (21). This recruitment depends on the

Table 1 Chemokine receptors and their roles in allergic diseases

Chemokine receptor	Chemokine	Cell type	Allergic diseases
CCR1	CCL5, CCL3	Monocytes, eosinophils, basophils T lymphocytes	Asthma
CCR3	CCL11	Eosinophils, Th2, basophiles, mast cells	Asthma
CCR4	CCL17, CCL25	Th2, Tregs, CD8, monocytes	Asthma, AD
CCR8	CCL1, CCL8	T lymphocytes, thymocytes, monocytes, splenocytes	AD, Asthma
CCR6	CCL20	T and B lymphocytes, dendritic cells	Asthma
CCR9	CCL25	T lymphocytes, thymocytes	Food allergy
CCR10	CCL27	T lymphocytes, melanocytes, Langerhans cells	AD
CX3CR1	CX3CL1	T, B, and gamma delta lymphocytes, NK, monocytes	Asthma, AD, food allergy
CXCR4	CXCL12	T and B lymphocytes, eosinophils, monocytes	Asthma

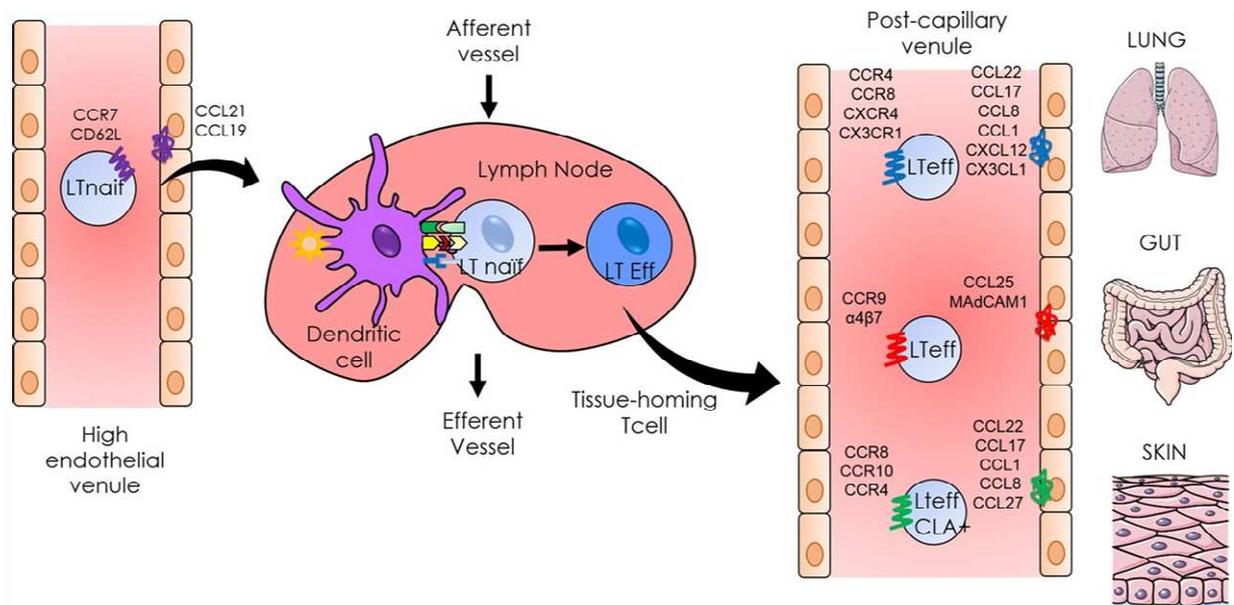


Figure 2 Tissue-specific homing of the immune cells owing to chemokine receptors.

chemokine expression by the inflamed tissue. Nevertheless, the exact mechanism directing this accumulation remains unclear. Thus, the overexpression of various chemokine receptors is a good parameter to explain the major infiltration of T cells, particularly Th2 cells, observed during asthma exacerbation (22). As its name suggests it, CCR1 was the first chemokine receptor discovered. Mostly expressed by macrophages, eosinophils, and basophils, its ligands CCL3 and CCL5 could be found in the broncho-alveolar lavage of patients with asthma (23). However, CCR3, a receptor typically expressed by eosinophils, plays a greater role in the pathology of asthma. CCR3 is one of the most relevant chemokine receptors in asthma because it triggers the migration of eosinophils owing to expression of the eotaxin family, mostly CCL11, CCL24, and CCL26 (24). In a murine model of acute asthma, it has been shown that the suppression of CCL11 decreased eosinophil recruitment and thus airway hyper-responsiveness (25). As well as in mice, CCR3 is equally important among human beings. Indeed, patients

with asthma displayed higher levels of CCL11 in plasma than healthy volunteers (26). Finally, CCR3 deletion in mice significantly decreased the homing of eosinophils to the lungs (27) and airway hyper-responsiveness in a model of airway inflammation induced by ovalbumin (28). Nevertheless, in another model of murine asthma to ovalbumin, the deletion of CCL11 did not completely inhibit the eosinophil recruitment (29). Another type of receptor involved in asthma is CCR4. Expressed mostly by Th2 cells, CCR4 plays a major role in the recruitment of T cells both in mice and in human beings (30). This receptor can bind two chemokines, CCL22 and CCL17, which have been found in higher concentrations in the broncho-alveolar lavage of patients with asthma (12, 31). The use of antibodies against CCR4 inhibited the normal migration of T cells to the lungs (32). Some studies have shown a decrease in allergic markers, such as Th2 cytokines, in a model of asthma, but some others have not reported any differences between knockout and wild-type mice (33–35). Indeed, CCR4-knockout mice seemed to be partially

protected from symptoms in a model of allergy to *Aspergillus fumigatus* (36). CCR8 is mostly expressed by T cells and particularly Th2 cells, and its expression, as well as that of its ligand CCL1, was increased in the broncho-alveolar lavage of patients with asthma (37). In a model of asthma in CCR8-knockout mice, Th2 recruitment and mucus production were impaired (38), as well as the eosinophil infiltrate (39). If some studies made on mouse models correlate with the observations on human beings, there are contradictory results. Indeed, some studies observed no correlations between the absence of CCR8 and decreased respiratory symptoms (40, 41). CCR6 is expressed by different cell subsets, including T and B cells and dendritic cells (42). Among T cells, CCR6 is mostly expressed by Th17 cells, which were described as involved in asthma through the secretion of IL-17 in a mouse model (43). Ligation of CCR6 to CCL20 resulted in the migration of Th17 cells to various tissues, including the lungs and skin (42). Similarly, the expression of CCR6 on Th cells in PBMCs was enhanced in patients with asthma, compared to control subjects (44). CXCR4, which binds to CXCL12, induced the migration of T cells and eosinophils (45). Accordingly, high levels of CXCL12 were observed in the broncho-alveolar lavage of patients with asthma (46). The signaling pathway of CXCL12 ends in the activation of MMP9 (matrix metalloproteinase), a protein known to be involved in asthma remodeling (47). Finally, some recent studies have examined the role of CX3CR1 and its ligand CX3CL1 in asthma. The receptor CX3CR1 is expressed by various types of cells, including lymphocyte CD4, CD8, and Tcd, and its expression was increased in the broncho-alveolar lavage of patients with asthma (48). Moreover, tobacco consumption is associated with an increase in CX3CL1 expression by the endothelium which attracts CX3CR1<sup>+</sup> cells and increases their transendothelial migration (49). Finally, the expression of CX3CR1 by Th2 cells stimulated their survival and their retention within the airways (19).

Given the complexity and the redundancy of this system, human studies are needed to confirm or inform mouse models and understand the role of chemokine receptors. The access to biological fluid such as blood and BALF from patients suffering from asthma has significantly increased our knowledge on chemokine and their receptor in human beings. But although these samples are reasonably accessible, tissue studies require a more invasive procedure. Using mice facilitates the access to entire organs whose responses can be very different than fluid cells such as blood or BAL cells. Nevertheless, mouse models do not reflect the real disease, and particularly for asthma where the bronchi are not the same, the immune response can be different. But surprisingly, knockout mouse models have yielded encouraging results. All these contradictory results suggest that the increase in a given chemokine and/or its receptor may not reflect the pathology but be a more protective or a compensatory effect (50).

#### Chemokine receptors in atopic dermatitis

Atopic dermatitis is the most common skin disease in the world among children. The prevalence is 60% among

children younger than 1 year, and it increases to 85% among children younger than 5 years (51). Although this prevalence decreases with age, some studies have shown a significant increase in the disease in the past few decades. This increase has been correlated with the increase in all atopic diseases, such as asthma, especially among people living in urban areas. The main characteristics of the disease are a dysfunction of the skin barrier and alteration of the immune system. The most widespread symptoms are a thickening of the skin and cell infiltration composed of mast cells, eosinophils, and lymphocytes, generally the Th2 subtype (52). Thus, chemokines and chemokine receptors play crucial roles in this pathology by recruiting immune cells to the skin. Many receptors have been studied, such as CCR4, CCR10, CCR8, and CX3CR1. In human beings, 90% of skin-resident lymphocytes express CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen), which links to adhesion molecules such as E-selectin that are expressed during flares of skin inflammation (53). Moreover, CCR4 and CCR10 seem to be associated with these CLA<sup>+</sup> lymphocytes (54). The first chemokine receptor described in atopic dermatitis was CCR10, which binds to CCL27. Both molecules were highly expressed in skin biopsies of patients suffering from atopic dermatitis (55). CCL27 is exclusively expressed by keratinocytes under homeostatic conditions, and its expression can be stimulated by pro-inflammatory cytokines. Its neutralization induces a decrease in the skin inflammation in a mouse model of atopic dermatitis (56). Moreover, its expression was controlled by the secretion of inflammatory cytokines, such as IL-1b and TNF- $\alpha$ , within inflamed tissues (57). Finally, the inhibition of CCL27 decreased inflammation and T-cell recruitment toward the skin (58). Another receptor, CCR4, also expressed by CLA<sup>+</sup> lymphocytes, binds to CCL22 and CCL17, which are mainly expressed by keratinocytes, endothelial cells, and dendritic cells. Their expression is particularly greater in the skin and in the serum of atopic patients, as well as in NC/nga mice (55, 59). CCL17 and CCL22 initiate the recruitment of Th2 lymphocytes, making CCR4 a potential target for therapeutic strategies. Indeed, proliferation of Th2 cells could be found in atopic dermatitis, in correlation with the increase in CCR4 expression (60). More recently, the receptor CCR8 and its main ligand CCL1 were found to be involved in a mouse model of contact hypersensitivity. CCR8 is expressed by helper T cells, thymocytes, macrophages, and dendritic cells (61). CCL18, a recently discovered ligand of CCR8, induced the migration of IL-5-secreting lymphocytes, leading to eosinophil infiltration (61). Finally, it was shown that CCR8 is able to retain dendritic cells within the skin, which prevents them to migrate toward secondary lymphoid organs. In a model of contact hypersensitivity in CCR8<sup>-/-</sup> mice, antigen-presenting cells could migrate toward LN from the skin after sensitization (62). Finally, CX3CR1 was also studied in cutaneous inflammation. CX3CR1-expressing T lymphocytes (Th1 and Th2) seemed to be involved in the induction of atopic dermatitis in mice (52). CX3CR1<sup>-/-</sup> mice displayed a decrease in cutaneous inflammation and a decrease in inflammatory cells, such as mast cells, eosinophils, and lymphocytes. Similarly, among patients, CX3CL1 was overexpressed

in endothelial cells and in serum, compared to healthy volunteers (63). If some receptors have been found to be involved in skin inflammation and atopic dermatitis, to date, none of them is actually used in therapeutics or tested in any clinical trials. The redundancy of the system can explain this issue: for example, the fact that the anti-CCR4 targets both Th2 cells and Treg cells may explain the difficulty to develop suitable antagonists (64). But the complexity of the diseases, which are often very different from the animal models, is also an issue. Indeed, the models of contact hypersensitivity do not reflect totally the atopic dermatitis in human beings. All these parameters must be taken into account to transform chemokine receptor inhibition into new therapeutic treatment.

#### Chemokine receptors in food allergy

IgE-mediated food allergies induce various symptoms and can affect the skin, the intestine, and the lungs. They are triggered by food allergens, which are usually harmless for healthy people. The prevalence is very difficult to estimate because of the different tests used (skin prick tests, self-awareness, IgE concentration, etc.), but there are approximately 4–8% of food-allergic people among children and 1–3% among adults (65). Within the lamina propria, the antigen-presenting cells are dendritic cells, particularly cells expressing CD103 (66). After antigen capture, they migrate to the mesenteric LN owing to the expression of CCR7 to activate naïve T cells. In the same manner, naïve T cells enter the LN through high endothelial venules and express CD62L and CCR7, which bind to their respective ligands on endothelial cells (GlyCAM-1, CCL21, and CCL19) (67). In the LN, CD103+ cells induce the homing molecules CCR9 and a4b7 on T cells, which allow them to migrate to the intestine. Regulatory T cells are also imprinted by dendritic cells in the mesenteric LN to maintain oral tolerance in the intestine. Thus, oral tolerance to food allergens can be impaired in mice lacking the gene for a4b7, MadCam1, or CCR9 (68, 69). However, these results are still subject to debate (67). Despite contradictory results, everyone agrees that food allergy is a breach in oral tolerance. The mechanisms are not clear, but the expression of the homing molecules is a crucial step in cell recruitment to the intestine. Moreover, the allergic response is characterized by Th2 proliferation, and Th2-associated cytokines and chemokines can be found in the serum of allergic patients. In a model of food allergy in mice, the receptor CCR8 and the ligands of CCR4, CCL17, and CCL22 were overexpressed in the intestine (70). Once again, the receptor CX3CR1 is also involved in food allergies. In CX3CR1<sup>-/-</sup> mice, oral tolerance is impaired because of inhibition of the migration of regulatory T cells. The secretion of IL-10 was also decreased in this model (68). It was shown that Tregs leave the mesenteric LN, multiply among themselves, and migrate toward the lamina propria owing to CX3CR1-expressing myeloid cells, which also secrete IL-10 (67, 71). The receptor CCR6 is also involved in oral tolerance because IL-10-secreting Treg cells express CCR6 on their membrane. Mice lacking this gene displayed

impaired migration of Treg cells toward the intestine (72). Finally, it was shown that CX3CR1<sup>+</sup> regulatory B cells played a role in the establishment of oral tolerance. Indeed, a decreased level of CX3CR1<sup>+</sup> regulatory B cells could be found in the blood of allergic patients (73). Moreover, adoptive transfer of CD5<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> regulatory B cells induced a decrease in the allergic reaction in a mouse model (74). Relatively little is known about chemokine receptors in food allergy. If some molecules are undoubtedly involved in the process, none of them seem to predominate among the others. Within the gut disease-like inflammatory bowel disease, CCR9 was found to be particularly involved, and the clinical trial launched with its antagonist is well advanced (75, 76).

Despite the large number of chemokine receptors found to be involved in various diseases, none of these receptors seem more important than the others. Indeed, if some studies have clearly shown that the deletion of one gene in particular decreased symptoms of the pathology, many of them have found contradictory results. The type of model used, the type of allergen, or the genetic background of the mice could explain these conclusions. These issues are recurrent in the field of chemokine receptors, and they demonstrate their primary role in homeostasis. In general, studies made on knockout mice reflect the studies made with antagonists and show sometimes more convincing results. Indeed, the deletion of CCL2 induces a great protection from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), while CCR2 can link also with CCL7 and CCL8, and none of their deletion showed any effect on EAE (77). Regarding CCR4, it has been shown that Tregs also expressed this receptor because 80% of them are CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> (78). Thus, CCR4-knockout mice spontaneously develop skin inflammation due to the impaired migration of Tregs toward the epithelium (79). In asthma, the expression of CCR4 by Tregs is essential to regulate airway inflammation. Indeed, the adoptive transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> T cells in asthmatic mice decreased lung inflammation, while the transfer of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CCR4KO cells did not (80). The solution could be the extensive use of conditional knockout mice to analyze a particular cell subtype. Thus, results from knockout mouse studies must be taken with caution. In some models, knockout mice show no differences with the wild-type phenotype until they are submitted to an inflammatory stimulus (50). Moreover, chemokine receptor may have a different role according to their different ligand. For example, the chemokine CCL5 induces the recycling to the cell membrane only after the binding to CCR5 and not with its other receptors (CCR1 and CCR3) (81). The degree of internalization and/or recycling to the cell membrane of the receptor may change the response depending on the associated chemokine. Finally, chemokines can also bind to glycosaminoglycans which are carbohydrate structures that are expressed on the cell surface or in the extracellular matrix (82). They have an important role in chemokine retention and could regulate their concentration. Indeed, CCL5 has a greater affinity for GAG than CCL2 or CCL3 which can change receptor binding (83). Finally, the differences encountered between the mouse and the human

studies can be explained by the genetic differences. Indeed, the two species do not possess the same number of chemokines and chemokine receptors. If all mammals have roughly 50 chemokines and 20 receptors, human beings have 27 CCL chemokines, 17 CXCL, two XCL, and one CX3CL, whereas mice have respectively 22, 15, 1, and 1 (82). Moreover, in human beings, chemokines genes are mapped on the chromosomes 4q12-21 and 17q11.2, while mouse chemokines are mapped on the chromosomes 5 and 11 (84). Chemokines are known to be one of the most rapidly changing protein families (82). And some chemokines that exist in human beings cannot be found in mice, such as CCL13 and CCL14. The opposite is also true because the chemokine CXCL15 does not exist in human beings (85). There is a great difference in gene cluster between mice and human beings as is shown with the MCP: Monocyte Chemoattractant Protein group, a good example of structural difference. Indeed, there is no human counterpart of the MCP family (84, 85). Mice represent great models and great opportunities to understand immune mechanisms, but we must be always careful while extrapolating data from mouse studies to human diseases.

#### Chemokine receptor antagonists in therapeutic strategies against allergies

Chemokines and their receptors orchestrate the spatial distribution of immune cells toward inflammation sites under basal conditions as well as in various pathologies. The understanding of these receptors allowed for the emergence of new therapeutic strategies, such as the development of specific antagonists. Today, some antagonists are still being tested in clinical trials for different diseases, including allergies (Table 2). Nevertheless, despite a great number of clinical trials of chemokine receptor antagonists, very few of them have yielded real treatments. Several pharmaceutical industries developed antagonists which target the most important chemokine receptors involved in allergies, such as CCR3 and CCR4. For example, the molecules GW824575 and GSK2239633 targeting CCR3 and CCR4, respectively, developed by GSK, failed to prove their efficacy in asthma, and the clinical trials were stopped in phase I (86). Until today, only two drugs targeting chemokine receptors have been marketed: maraviroc, an anti-CCR5 developed by Pfizer and used in HIV therapy, and plerixafor, an anti-CXCR4

developed by Anormed and used in oncology (87, 88). However, some drugs have been encouraging, and clinical trials are still ongoing. The anti-CCR4 called mogamulizumab, developed by Amgen and Kyowa-Hakko, is currently being tested to treat lymphoma and allergic diseases (89, 90). The anti-CCL11 (bertilimumab), developed by Immune Pharmaceuticals, is currently in a phase II clinical trial to treat various diseases, such as asthma, Crohn's disease, and macular degeneration (91). The anti-CCR3 agent ASM8, developed by Pharmaxis, was tested to treat asthma, and an anti-CCR9 called vercimon, developed by Chemocentryx, is currently in phase III trials to treat Crohn's disease and celiac disease (75, 76, 92). Chemokine receptors belong to the super family of G-protein-coupled receptors (GPCRs), and they represent good candidates for drug development. Indeed, the GPCR family is the most successful target for drug discovery because 30% of all medicines exert their effects via these receptors (93). Many receptors have been targeted, such as the  $\beta_2$ -adrenoceptor for the treatment of asthma, the angiotensin receptor for the treatment of arterial hypertension, and the opioid receptor for the treatment of pain. The reasons for failure are many and are not always known. The principal explanations are the high redundancy of the chemokine system, disease heterogeneity and insufficient blockade of the receptor, poor predictive data from animal models, and our limited understanding of the system (86). Indeed, because of the very complex system and its redundancy, it is very complicated to target one cell type at a time. Chemokine receptors are not specific to one cell type, and several share the same function; therefore, the inhibition of one receptor only is not sufficient to prevent cell migration. For example, an antagonist against CCR4 targets effector T cells, as well as regulatory T cells, which can worsen the condition rather than improving it (94). The anti-CCR4 antagonist mogamulizumab has been implicated in severe cases of skin inflammation during clinical trials because of the depletion of Tregs (64). Moreover, it was discovered that the ligands of CCR4, CCL17, and CCL22 did not respond in the same manner and induced different signaling pathways (95). To overcome the problem of redundancy, drugs have been developed to target two chemokine receptors at the same time. The use of an antagonist blocking CCR5 and CXCR3 for the treatment of organ transplant rejection was successful in a mouse model of heart transplantation (96). Moreover, dual

Table 2 Chemokine receptor drugs in allergic diseases

Chemokine receptor targeted	Drug name	Company	Disease	Clinical phase	Publication
CCR4	KW-0761 (mogamulizumab)	Amgen/Kyowa	Lymphoma and allergic disease	Phase I	(92, 93)
CCR9	CCX282 (vercimon)	Chemocentryx	Crohn's disease, celiac disease	Phase III	(78, 79)
CCR3	ASM8	Pharmaxis	Asthma	Phase II	(95)
CCL11	Bertilimumab	Immune Pharmaceuticals	Asthma, macular degeneration, Crohn's disease	Phase II	(94)
CXCR4	Plerixafor	Anormed	Cancer	Marketed	(91)
CCR5	Maraviroc	Pfizer	HIV	Marketed	(90)

inhibition of CCR3 and the H1 histamine receptor has been used for the treatment of asthma and atopic dermatitis *in vitro* and in a mouse model of ovalbumin-induced asthma (97). Finally, data from animal models have misled the development of new drugs, and many antagonists proved their efficacy in rodents but failed to induce the same effects in human beings. The limited development of real treatments from chemokine receptor antagonist has mainly been due to the complexity of the chemokine/chemokine receptor system. However, the targeted diseases are also very complex. Allergic diseases are multifactorial, and many cells contribute to inflammation according to the various endotypes and phenotypes involved. This last parameter is very important and must be considered for the elaboration of new treatments.

### Conclusion

Our knowledge of chemokines and chemokine receptor family has developed significantly over the past decades. It has allowed us to enhance our understanding of the mechanisms of allergic reactions. Now the greatest challenge is in converting this knowledge into new therapies. Small molecules can now be used as antagonists of chemokine receptors to block immune cell migration. As part of the GPCR family, the chemokine receptors represent quite interesting targets for the

development of new drugs. Nevertheless, the high complexity of these diseases and the high redundancy of the chemokine/chemokine receptor system can explain the multiple failures. Antagonists administered orally do not target a specific tissue but exert their effects systemically. Moreover, because of redundancy, the blockade of one chemokine receptor is not sufficient. To overcome this problem, it could be interesting to target specific cells with cocktails of antagonists administered as ointments on the skin or by aerosols for the lungs.

### Acknowledgments

This work was supported by the 'Société Française d'Allergologie', 'Fondation pour la recherche Médicale', 'La fondation du souffle', 'Institut de Recherche en Santé Respiratoire', and LC was supported by the 'Ministère de la Recherche' and the University of Nantes. GB was supported by The People Programme (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under REA grant agreement no. 624910.

### Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### References

1. Pease JE. Asthma, allergy and chemokines. *Curr Drug Targets* 2006;7:3–12.
2. Ward SG, Marelli-Berg FM. Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* 2009;418:13–27.
3. Cumock AP, Logan MK, Ward SG. Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology* 2002;105:125–136.
4. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595–599.
5. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* 2012;36:705–712.
6. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:123–128.
7. Agace WW. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006;6:682–692.
8. Islam SA, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 2012;18:705–715.
9. Pilette C, Francis JN, Till SJ, Durham SR. CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *Eur Respir J* 2004;23:876–884.
10. Papadakis KA, Prehn J, Nelson V, Cheng L, Binder SW, Ponath PD et al. The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J Immunol* 2000;165:5069–5076.
11. Islam SA, Ling MF, Leung J, Shreffler WG, Luster AD. Identification of human CCR8 as a CCL18 receptor. *J Exp Med* 2013;210:1889–1898.
12. Vijayanand P, Durkin K, Hartmann G, Morjaria J, Seumois G, Staples KJ et al. Chemokine receptor 4 plays a key role in T cell recruitment into the airways of asthmatic patients. *J Immunol* 2010;184:4568–4574.
13. Lloyd CM, Delaney T, Nguyen T, Tian J, Martinez-A C, Coyle AJ et al. CC chemokine receptor (CCR)3/eotaxin is followed by CCR4/monocyte-derived chemokine in mediating pulmonary T helper lymphocyte type 2 recruitment after serial antigen challenge *in vivo*. *J Exp Med* 2000;191:265–274.
14. Gonzalo JA, Lloyd CM, Wen D, Albar JP, Wells TN, Proudfoot A et al. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med* 1998;188:157–167.
15. Debes GF, Arnold CN, Young AJ, Krautwald S, Lipp M, Hay JB et al. CC chemokine receptor 7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nat Immunol* 2005;15:731–744.
16. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 2010;120:2423–2431.
17. Qing M, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999;10:463–471.
18. Landsman L, Liat BO, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E et al. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 2009;113:963–972.
19. Mionnet C, Buatois V, Kanda A, Milcent V, Fleury S, Lair D et al. CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med* 2010;16:1305–1312.
20. Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* 2013;4:263.
21. Harris NL, Watt V, Ronchese F, Le Gros G. Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *J Exp Med* 2002;195:317–326.
22. Mamessier E, Nieves A, Lorec AM, Dupuy P, Pinot D, Pinet C et al. T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy* 2008;63:1202–1210.
23. Alam R, York J, Boyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J et al. Increased MCP-1,

- RANTES, and MIP-1 $\alpha$  in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1398–1404.
24. Velazquez JR, Teran LM. Chemokines and their receptors in the allergic airway inflammatory process. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011;41:76–88.
  25. Pope SM, Zimmermann N, Stringer KF, Karow ML, Rothenberg ME. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia. *J Immunol* 2005;175:5341–5350.
  26. Lilly CM, Woodruff PG, Camargo CA Jr, Nakamura H, Drazen JM, Nadel ES et al. Elevated plasma eotaxin levels in patients with acute asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:786–790.
  27. Humbles AA, Lu B, Friend DS, Okinaga S, Lora J, Al-Garawi A et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:1479–1484.
  28. Weillie M, Bryce PJ, Humbles AA, Laouini D, Yalcindag A, Alenius H et al. CCR3 is essential for skin eosinophilia and airway hyperresponsiveness in a murine model of allergic skin inflammation. *J Clin Invest* 2002;109:621–628.
  29. Rothenberg BME, MacLean JA, Pearlman E, Luster AD, Leder P. Partially reduces antigen-induced tissue eosinophilia. *J Exp Med* 1997;185:785–790.
  30. Gonzalo JA, Pan Y, Lloyd CM, Jia GQ, Yu G, Dussault B et al. Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J Immunol* 1999;163:403–411.
  31. Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C et al. The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2001;107:1357–1364.
  32. Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y et al. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol* 2001;166:103–111.
  33. Conroy DM, Jopling LA, Lloyd CM, Hodge MR, Andrew DP, Williams TJ et al. CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *J Leukoc Biol* 2003;74:558–563.
  34. Mikhak Z, Fukui M, Farsidjani A, Medoff BD, Tager AM, Luster AD. Contribution of CCR4 and CCR8 to antigen-specific T(H)2 cell trafficking in allergic pulmonary inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:67–73.
  35. Chvatchko Y, Hoogewerf AJ, Meyer A, Alouani S, Juillard P, Buser R et al. A key role for CC chemokine receptor 4 in lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J Exp Med* 2000;191:1755–1764.
  36. Schuh JM, Power CA, Proudfoot AE, Kunkel SL, Lukacs NW, Hogaboam CM. Airway hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4 / mice. *FASEB J* 2002;16:1313–1315.
  37. Mutalithas K, Guillen C, Raport C, Kolbeck R, Soler D, Brightling CE et al. Expression of CCR8 is increased in asthma. *Clin Exp Allergy* 2010;40:1175–1185.
  38. Gonzalo J-A, Qiu Y, Lora JM, Al-Garawi A, Villeval J-L, Boyce JA et al. Coordinated involvement of mast cells and T cells in allergic mucosal inflammation: critical role of the CC chemokine ligand 1:CCR8 axis. *J Immunol* 2007;179:1740–1750.
  39. Chensue SW, Lukacs NW, Yang TY, Shang X, Frait KA, Kunkel SL et al. Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. *J Exp Med* 2001;193:573–584.
  40. Chung CD, Kuo F, Kumer J, Motani AS, Lawrence CE, Henderson WR et al. CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *J Immunol* 2003;170:581–587.
  41. Goya I, Villares R, Zaballos A, Gutierrez J, Kremer L, Gonzalo J-A et al. Absence of CCR8 does not impair the response to ovalbumin-induced allergic airway disease. *J Immunol* 2003;170:2138–2146.
  42. Francis JN, Sabroe I, Lloyd CM, Durham SR, Till SJ. Elevated CCR6 + CD4 + T lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. *Clin Exp Immunol* 2008;152:440–447.
  43. Chesne J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant M-A, Loy J et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2015;135:1643–1645.
  44. Wong CK, Lun SWM, Ko FWS, Wong PTY, Hu SQ, Chan IHS et al. Activation of peripheral Th17 lymphocytes in patients with asthma. *Immunol Invest* 2009;38:652–664.
  45. Nagase H, Miyamasu M, Yamaguchi M, Fujisawa T, Ohta K, Yamamoto K et al. Expression of CXCR4 in eosinophils: functional analyses and cytokine-mediated regulation. *J Immunol* 2000;164:5935–5943.
  46. Chen H, Xu X, Teng J, Cheng S, Bunjho H, Cao Y et al. CXCR4 inhibitor attenuates allergen-induced lung inflammation by down-regulating MMP-9 and ERK1/2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:6700–6707.
  47. Cataldo DD, Tournoy KG, Vermaelen K, Munaut C, Foidart J-M, Louis R et al. Matrix metalloproteinase-9 deficiency impairs cellular infiltration and bronchial hyperresponsiveness during allergen-induced airway inflammation. *Am J Pathol* 2002;161:491–498.
  48. Zhang J, Patel JM. Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases. *Int J Clin Exp Med* 2010;3:233–244.
  49. McComb JG, Ranganathan M, Liu XH, Pilewski JM, Ray P, Watkins SC et al. CX3CL1 up-regulation is associated with recruitment of CX3CR1 + mononuclear phagocytes and T lymphocytes in the lungs during cigarette smoke-induced emphysema. *Am J Pathol* 2008;173:949–961.
  50. Proudfoot AEI. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2002;2:106–115.
  51. Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:S118–S127.
  52. Staumont-Salle D, Fleury S, Lazzari A, Molendi-Coste O, Hornez N, Lavogiez C et al. CX<sub>3</sub>CL1 (fractalkine) and its receptor CX<sub>3</sub>CR1 regulate atopic dermatitis by controlling effector T cell retention in inflamed skin. *J Exp Med* 2014;211:1185–1196.
  53. Clark RA, Chong B, Mirchandani N, Brinster NK, Yamanaka K-I, Dowgiert RK et al. The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. *J Immunol* 2006;176:4431–4439.
  54. Morales J, Homey B, Vicari AP, Hudak S, Oldham E, Hedrick J et al. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14470–14475.
  55. Vestergaard C, Deleuran M, Gesser B, Grønhøj Larsen C. Expression of the T-helper 2-specific chemokine receptor CCR4 on CCR10-positive lymphocytes in atopic dermatitis skin but not in psoriasis skin. *Br J Dermatol* 2003;149:457–463.
  56. Homey B, Alenius H, Møller A, Soto H, Bowman EP, Yuan W et al. CCL27 – CCR10 interactions regulate T cell – mediated skin inflammation. *Nat Med* 2002;8:157–165.
  57. Xiong N, Fu Y, Hu S, Xia M, Yang J. CCR10 and its ligands in regulation of epithelial immunity and diseases. *Protein Cell* 2012;3:571–580.
  58. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DYM. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118:178–189.
  59. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 2000;12:336–341.

60. Campbell JJ, Haraldsen G, Pan J, Rottman J, Qin S, Ponath P et al. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 1999;400:776–780.
61. Islam SA, Chang DS, Colvin RA, Byrne MH, McCully ML, Moser B et al. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5 + T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2011;12:167–177.
62. Yabe R, Shimizu K, Shimizu S, Azechi S, Choi BI, Sudo K et al. CCR8 regulates contact hypersensitivity by restricting cutaneous dendritic cell migration to the draining lymph nodes. *Int Immunol* 2015;27:169–181.
63. Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Takehara K, Sato S. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:940–948.
64. Ishida T, Ito A, Sato F, Kusumoto S, Iida S, Inagaki H et al. Stevens-Johnson syndrome associated with mogamulizumab treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci* 2013;104:647–650. Bischoff SC. Food allergies. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2008;10:34–43. Johansson-Lindbom B, Agace WW. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev* 2007;215:226–242.
65. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 2012;5:232–239.
66. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3 + regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* 2011;34:237–246.
67. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Blaner WS, Sparwasser T et al. Required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology* 2012;141:2109–2118.
68. Knight AK, Bele A, Zhang S, Mayer L, Sampson HA, Berin MC et al. CD4 T cells activated in the mesenteric lymph node mediate gastrointestinal food allergy in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;293:1234–1243.
69. Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254–258.
70. Pabst O. Trafficking of regulatory T cells in the intestinal immune system. *Int Immunol* 2013;25:139–143.
71. Wu Z. CX3CR1(+) B cells show immune suppressor properties. *J Biol Chem* 2014;289:22630–22635.
72. Liu ZQ, Wu Y, Song JP, Liu X, Liu Z, Zheng PY et al. Tolerogenic CX3CR1 + B cells suppress food allergy-induced intestinal inflammation in mice. *Allergy* 2013;68:1241–1248.
73. Walters MJ, Wang Y, Lai N, Baumgart T, Zhao BN, Dairaghi DJ et al. Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;335:61–69.
74. Keshav S, Vanasek T, Niv Y, Petryka R, Howaldt S, Bafutto M et al. A randomized controlled trial of the efficacy and safety of CCX282-B, an orally-administered blocker of chemokine receptor CCR9, for patients with Crohn's disease. *PLoS One* 2013;8:e60094.
75. Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR2). *J Exp Med* 2000;192:1075–1080.
76. Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2001;194:847–853.
77. Lehtimäki S, Tillander S, Puustinen A, Matikainen S, Nyman T, Fyhrquist N et al. Absence of CCR4 exacerbates skin inflammation in an oxazolone-induced contact hypersensitivity model. *J Invest Dermatol* 2010;130:2743–2751.
78. Faustino L, Mucida D, Keller AC, Demengeot J, Bortoluci K, Sardinha LR et al. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:13–15.
79. Mack M, Luckow B, Nelson P, Cihak J, Simmons G, Clapham P et al. AOP-RANTES prevents CCR5 recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* 1998;187:1215–1224.
80. Schulz O, Hammerschmidt SI, Moschovakis GL, Förster R. Chemokines and chemokine receptors in lymphoid tissue dynamics. *Annu Rev Immunol* 2016;34:041015–055649.
81. Kuschen GSV, Coulin F, Power CA, Proudfoot AEI, Hubbard RE, Hoogewerf AJ et al. Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 1999;38:12959–12968.
82. Nomiya H, Mera A, Ohneda O, Miura R, Suda T, Yoshie O. Organization of the chemokine genes in the human and mouse major clusters of CC and CXC chemokines: diversification between the two species. *Genes Immun* 2001;2:110–113.
83. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006;7:243.
84. Solari R, Pease JE, Begg M. Chemokine receptors as therapeutic targets: why aren't there more drugs? *Eur J Pharmacol* 2015;746:363–367.
85. MacArthur RD, Novak RM. Maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. *Reviews of anti-infective agents. Reviews of anti-infective agents* 2008;47:236–241.
86. Brave M, Farrell A, Ching Lin S, Ocheltree T, Pope Miksinski S, Lee S-L et al. FDA review summary: mozobil in combination with granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic stem cells to the peripheral blood for collection and subsequent autologous transplantation. *Oncology* 2010;78:282–288.
87. Solari R, Pease JE. Targeting chemokine receptors in disease – a case study of CCR4. *Eur J Pharmacol* 2015;763:169–177.
88. Subramaniam JM, Whiteside G, McKeage K, Croxtall JC. Mogamulizumab. *Drugs* 2012;72:1293–1298.
89. Maussang D, Mujic-Delic A, Descamps FJ, Stortelers C, Vanlandschoot P, Stigter-van Walsum M et al. Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. *J Biol Chem* 2013;288:29562–29572.
90. Imaoka H, Campbell H, Babirad I, Watson RM, Mistry M, Sehmi R et al. TPI ASM8 reduces eosinophil progenitors in sputum after allergen challenge. *Clin Exp Allergy* 2011;41:1740–1746.
91. Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science* 2000;287:1960.
92. Pease JE. Targeting chemokine receptors in allergic disease. *Biochem J* 2011;434:11–24.
93. Mariani M, Lang R, Binda E, Panina-Bordignon P, D'Ambrosio D. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells. *Eur J Immunol* 2004;34:231–240.
94. Schnickel GT, Bastani S, Hsieh GR, Shefizadeh A, Bhatia R, Fishbein MC et al. Combined CXCR3/CCR5 blockade attenuates acute and chronic rejection. *J Immunol* 2008;180:4714–4721.
95. Suzuki K, Morokata T, Morihira K, Sato I, Takizawa S, Kaneko M et al. A dual antagonist for chemokine CCR3 receptor and histamine H1 receptor. *Eur J Pharmacol* 2007;563:224–232.

# Partie II : Résultats et discussion

## I. Objectifs de la thèse

La marche atopique touche aujourd'hui près de 30% des enfants sensibilisés à un ou plusieurs allergènes alimentaire ou souffrant de dermatite atopique. Cette évolution, visible assez tardivement dans l'enfance (après 5 ans et jusqu'à l'adolescence) est totalement imprévisible. Si on sait prévoir le risque de développement de la maladie en fonction de l'histoire familiale de l'allergie ou encore la présence de multiple sensibilisations alimentaires ou d'une coexistence de l'allergie alimentaire et de l'eczéma atopique, il est en revanche impossible de prédire si l'enfant va effectivement développer de l'asthme plus tard. La recherche de marqueurs prédictifs et la compréhension des mécanismes immunologiques de la marche atopique sont donc des points cruciaux afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'objectif de ma thèse a donc été, en utilisant un modèle murin de marche atopique, d'en comprendre les mécanismes immunologiques. En 2013, Ruane a démontré que les cellules dendritiques pulmonaires pouvaient stimuler l'expression des molécules de domiciliation intestinale ( $\alpha 4\beta 7$  et CCR9) par les lymphocytes T permettant leur migration vers l'intestin et leur action contre une infection bactérienne (D. T. Ruane & Lavelle, 2011). Ces résultats suggèrent donc qu'une réaction inflammatoire sur un site muqueux donné peut engendrer une réponse au niveau d'un autre organe. Les récepteurs de chimiokines et leur ligand jouent un rôle clef dans la migration des cellules inflammatoires lors de l'allergie, ainsi nous avons émis l'hypothèse que certains récepteurs pourraient être impliqués dans l'évolution de l'inflammation au cours de la marche atopique. Pour cela, nous avons établi un modèle murin de marche atopique composé d'un modèle d'allergie alimentaire aux gliadines de blé suivi d'un modèle d'asthme aigu aux acariens. Afin de ne pas introduire de biais, nous avons décidé de remplacer l'ovalbumine par les gliadines de blé en tant qu'allergène alimentaire car l'OVA est très couramment utilisé en tant qu'allergène respiratoire dans des modèles murin d'asthme. La partie résultat de ce manuscrit sera divisé en trois parties, l'une portant sur le rôle de CCR9 dans la marche atopique, une sur le rôle de CCR9 dans l'allergie alimentaire seule et la dernière sur l'analyse de l'inflammation intestinale dans un modèle d'allergie alimentaire par sensibilisation cutanée.

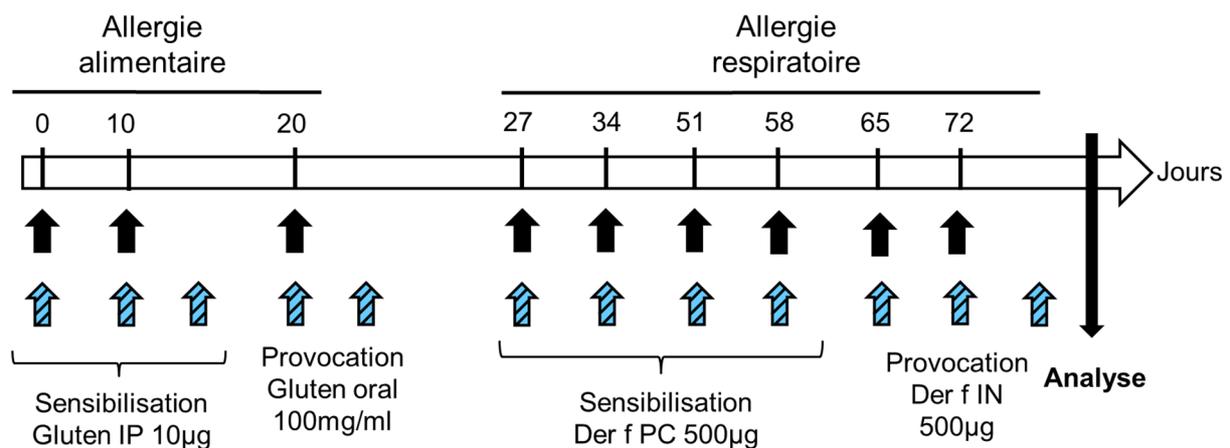
## II. Matériels et méthodes

### 1) Modèle animal

#### 1.1) Mise en place du modèle expérimental

##### 1.1.a) Modèle de marche atopique

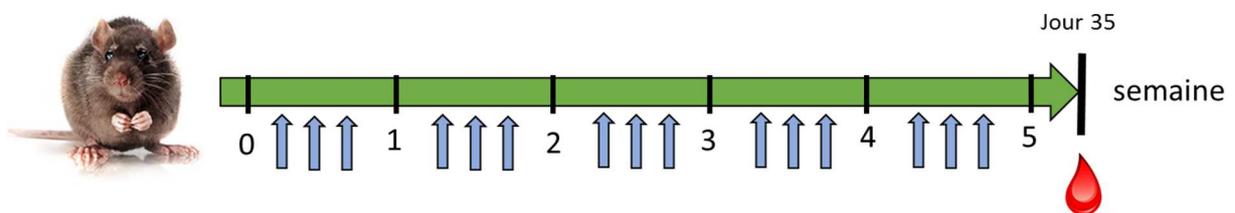
Le modèle murin est composé d'un modèle d'allergie alimentaire aux gliadines de blé suivi d'un modèle d'asthme aux acariens. L'étape de sensibilisation alimentaire est composée de 2 administrations de gliadine de blé (10µg) avec 100µl d'hydroxyde d'aluminium par voie intra-péritonéale à 10 jours d'intervalle. Cette étape est suivie d'une phase de déclenchement de l'allergie alimentaire par voie intra-gastrique avec 20mg de gliadine de blé. L'allergie respiratoire est ensuite induite par sensibilisation percutanée avec un extrait total d'acariens *Dermatophagoides farinae* (Der f, 500µg). Le déclenchement de la réponse est induit par 2 provocations intra-nasales avec 250µg de Der f, 7 et 14 jours après la dernière sensibilisation. Chez les souris C57BL6 qui ne sont pas pro-TH2, la réponse allergique est plus difficile à mettre en place, ainsi le modèle est rallongé par une sensibilisation alimentaire en IP et un challenge intra-gastrique supplémentaire puis un challenge respiratoire supplémentaire à la fin. Ce modèle nous a permis de faire plusieurs groupes ; le groupe d'allergie respiratoire (RA), le groupe allergie alimentaire + allergie respiratoire (FA+RA) et le groupe contrôle (CTL).



**Figure 20: Modèle de marche atopique.** Le modèle a été réalisé sur deux souches de souris différentes. Flèches pleine : Balb/c, flèches hachurées : C57BL/6 J

### 1.1.b) Modèle d'allergie par sensibilisation cutanée

Des rats Brown Norway élevés sous un régime sans gluten ont été sensibilisés par application cutanée de l'allergène sur l'abdomen, dont la peau a été préalablement légèrement altérée. Nous avons testé trois formes de gluten : du gluten natif non modifié, du gluten hydrolysé par voie acide (gluten désamidé) et du gluten hydrolysé par voie enzymatique. Les rats sont sensibilisés trois fois par semaines pendant cinq semaines et sont sacrifiés au jour 35. La veille de leur sacrifice, la réponse allergique est évaluée par injection de l'allergène de sensibilisation dans l'oreille. Le gonflement de l'oreille est mesuré à l'aide d'un micromètre digital.



**Figure 21: Modèle d'allergie par sensibilisation cutanée**

## 1.2) Analyses fonctionnelles respiratoires

### 1.2.a) Pléthysmographie

La pléthysmographie est une technique de mesure de la fonction respiratoire réalisée sur souris vigiles placées dans une chambre de pléthysmographie. De la métacholine à dose croissante (0, 5, 10, 20 et 40mg/ml) est alors nébulisée régulièrement dans les chambres et le pléthysmographe analyse les variations de pression liées aux mouvements respiratoires à l'aide de capteurs. L'augmentation du volume à l'inspiration est estimée à partir de la surpression provoquée dans la chambre. L'inverse se produit à l'expiration. La valeur mesurée est la Penh (enhanced pause) qui correspond à l'allongement du temps de la pause expiratoire. La Penh n'est pas une mesure des résistances pulmonaires mais sa variation évolue en parallèle de celles-ci. La Penh n'est pas assez précise ; elle est en effet mesurée sur la base d'un signal de pression qui peut être influencé par des facteurs extérieur comme l'humidité ou la température ou des facteurs intrinsèques à l'animal comme le stress. Il est donc indispensable de valider sa mesure par d'autres techniques plus précises comme le FlexiVent.

### 1.2.b) FlexiVent

Le flexiVent est l'appareil permettant de mesurer différents paramètres de la fonction respiratoire à l'aide de la technique des oscillations forcées. La souris est anesthésiée (xylazine/kétamine) puis trachéotomisée afin de placer une sonde trachéale reliée à l'appareil. La souris est ensuite curarisée afin d'empêcher toute respiration volontaire. En effet, c'est l'appareil qui ventile la souris de manière automatique tout le long de la procédure. La souris reçoit des doses croissantes de métacholine permettant de mesurer la résistance, la compliance et l'élastance pulmonaire. La résistance pulmonaire est la résistance due à l'écoulement de l'air dans les voies aériennes plus la résistance due au tissu pulmonaire ; elle illustre le niveau de constriction des poumons. La compliance pulmonaire est la capacité du poumon à modifier son volume en réponse à une variation de pression. Elle traduit donc la facilité avec laquelle le poumon peut être distendu. L'inverse de la compliance est l'élastance. L'élastance illustre l'élasticité du poumon. Elle reflète la résistance à l'augmentation du volume du poumon. Lorsque de l'air est insufflé dans un poumon, son volume augmente mais l'élastance diminue. Cette technique se différencie de la plethysmographie car elle permet d'analyser le rôle du poumon périphérique (bronchioles terminales) dans l'hyperréactivité bronchique, là où le plethysmographe ne prend en compte que les voies aériennes proximales.

## 2) Cytométrie en flux

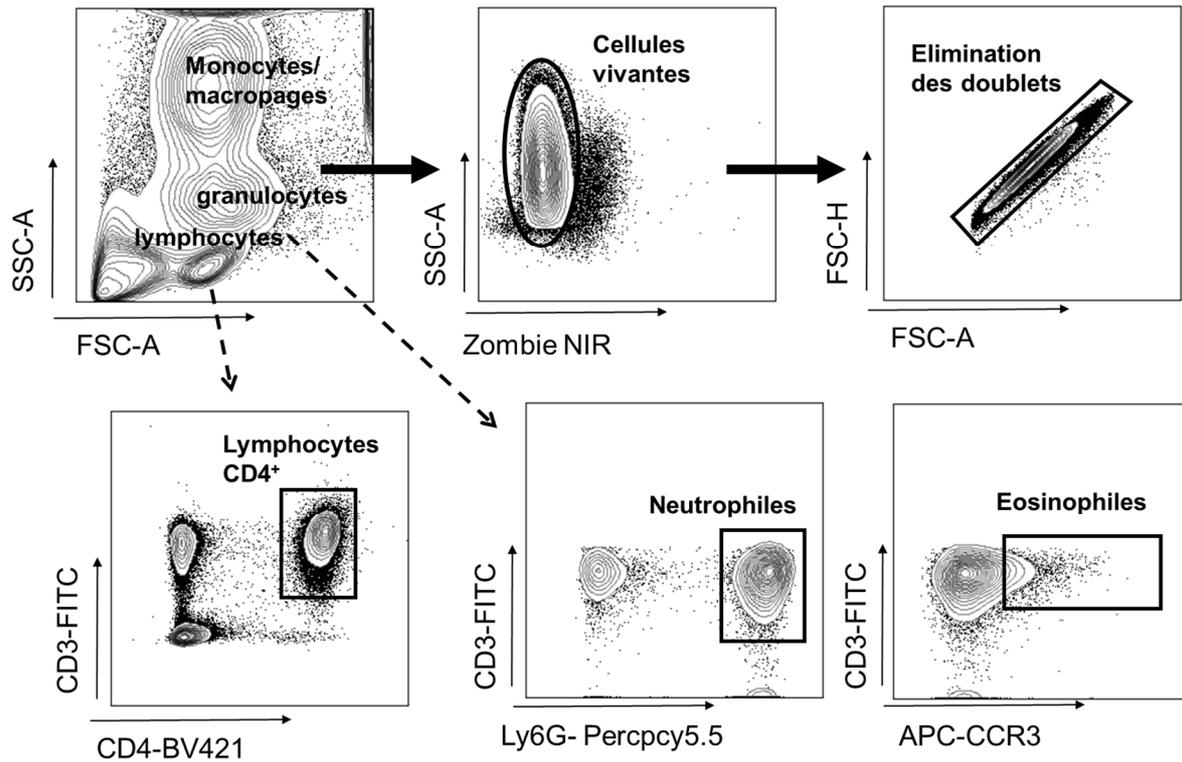
### *2.1) Récupération des échantillons*

Après anesthésie par du doléthal, la souris est sacrifiée par ponction intracardiaque et le sang est récupéré pour des analyses sur le sérum. Les lavages broncho alvéolaire sont récupérés par l'ajout de 1 ml de PBS dans un cathéter placé par voie intra-trachéale. Après centrifugation à 1500rpm pendant 5min, le surnageant est mis de côté et les cellules sont resuspendues dans 200µl de PBS SVF 5% EDTA 1% pour être marquées. Les différents organes (poumons, rate, ganglions mésentériques et médiastinaux) sont prélevés, broyés à l'aide d'un grinder, puis la suspension cellulaire obtenue est filtrée à l'aide d'un tamis cellulaire de 40µm. Un tampon de lyse des globules rouges est alors ajouté aux suspensions cellulaire provenant des poumons et de la rate pendant 7min. Après lavage, les cellules sont centrifugées à 1500rpm pendant 5 min puis resuspendues dans du PBS SVF 5% EDTA 1% afin d'être marquées. Afin de récupérer les lymphocytes intra-épithéliaux et les lymphocytes de la lamina propria, l'intestin grêle est prélevé puis coupé en morceaux et placé dans une solution de lavage contenant du PBS, du SVF 2% et de l'HEPES 15mM. Ces fragments subissent alors une série de 5 lavages consécutifs avec un changement de la solution entre chaque lavage. Après le dernier lavage, les morceaux d'intestin sont placés dans un tampon de digestion pendant

30min, contenant du PBS, du SVF10%, de l'EDTA 5mM, de l'HEPES 15mM et de la penicilline/streptomycine à 1%. Le surnageant est récupéré puis filtré (lymphocytes intra-épithéliaux) et les intestins sont incubés dans une solution de digestion contenant du RPMI, du SVF10%, de l'HEPES 15mM, de la penicilline/streptomycine à 1% et enrichi en collagénase I (500µg/ml) et en DNase (100µg/ml) pendant 45min à 37°C sous agitation afin de récupérer les lymphocytes de la lamina propria. Après filtrage et centrifugation, les cellules sont resuspendues dans du PBS SVF 5% EDTA 1% afin d'être marquées.

## *2.2) Marquage et méthodes d'analyse*

Le marquage extra-cellulaire, effectué en présence de CD16/32 afin d'éviter tout marquage non spécifique, se fait avec les anticorps suivant pendant 20min à 4°C dans le noir: CD3-FITC (lymphocytes), Ly6G-Perccpy5.5 (neutrophiles), CCR3-APC (éosinophiles), CCR9-PE, et CD4-BV421, et APC-cy7-ZOMBIE NIR pour la viabilité. Pour le marquage intra-cellulaire, 2 millions de cellules sont placées dans les puits d'une plaque de culture de 96 puits en présence d'un milieu complet (RPMI 1640, glutamine 1%, SVF 10% et penicilline/streptomycine 1%) enrichi d'une solution de stimulation polyclonale : phorbol-myristate-acétate (50ng/ml), ionomycine (1µg/ml), GolgiPlug et Golgistop au 1/1000 (BD, biosciences) et incubées 5h à 37°C. A la fin de la stimulation, les cellules sont centrifugées puis lavées afin d'être marquées. Après le marquage extra-cellulaire avec les anticorps suivant : CD3-PEcy7, CD4-BV421, CCR9-PE, CD25-BV510 et APCcy7-ZOMBIE NIR les cellules sont fixées et perméabilisées à l'aide du FIX/PERM kit (BD biosciences) pendant 20min à 4°C puis le marquage intracellulaire est effectué dans une solution perméabilisante PERM Wash (BD Biosciences) à l'aide des anticorps suivant : Foxp3-Alexafluor488 et IL-17-APC pendant 40min à 4°C. Après lavage avec du PERM Wash, les cellules sont analysées sur un Fortessa X20, BD biosciences. L'analyse des données est réalisée sur le logiciel FlowJo (Treestar). Après l'élimination des cellules mortes et des doublets, l'analyse se fait comme ci-dessous (Figure 22).



### 3) Histologie

Les poumons sont prélevés puis fixés en formaldéhyde 4%. Les coupes histologiques réalisées par la plateforme d'anatomopathologie de la faculté de Médecine sont colorées à l'hématoxyline-éosine et au periodic-acid Schiff (PAS).

#### 3.1) *Score histologique*

Le score histologique est établi sur deux paramètres essentiels : l'altération des bronches sur 4 points et l'inflammation sur 8 points. Afin d'apprécier l'état des bronches, chaque paramètre présent est évalué par 1 point : l'hyperplasie des cellules épithéliales, les cellules à mucus placées de manière circonférentielle, la dystrophie (clarification) des cellules et enfin le remodelage du chorion bronchique. L'inflammation est quantifiée par rapport au contrôle avec une augmentation peri-vasculaire et bronchique du nombre de cellules de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point, l'augmentation du nombre de lymphocytes de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point, l'augmentation du nombre de granulocytes de 50% par rapport au contrôle évaluée sur 1 point et enfin la présence d'un nodule lymphocytaire est évaluée sur 4 points.

### 3.2) Mesure du pourcentage de cellule à mucus

Grace à la coloration en PAS (periodic acid schiff), la présence de mucus dans les cellules épithéliales devient visible. Le pourcentage de cellules produisant du mucus est alors calculé par coupe bronchique comme ci-dessous :

$$\% \text{ de cellules à mucus} = \frac{\text{nombre de cellules PAS positive par coupe bronchique}}{\text{nombre de cellules totales par coupe bronchique}} * 100$$

### 4) qPCR

L'ARN est extrait des cellules ou des tissus lysés à l'aide du kit DNA, RNA and protein purification (Machery-Nagel), puis la concentration en ARN est déterminée par un Nanodrop. Ensuite, les ARN sont rétro-transcrits en ADNc lors d'une RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) par l'enzyme reverse transcriptase et en utilisant les amorces et les nucléotides d'un kit commercial (Invitrogen). La PCR quantitative en temps réel est effectuée sur un appareil Biorad (CFX96) en utilisant des amorces commerciales (EurogenTech) à l'aide de la réaction du SYBER green (MESA GREEN qPCR, Invitrogen). Les gènes HPRT (souris) et GAPDH (humain) sont utilisés en tant que gènes de ménage afin de normaliser la quantité d'ARN. L'expression relative d'un gène pour chaque échantillon est calculée par la méthode des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 5) Transfert adoptif

Les souris C57BL6 (LY5.2) sauvages ou déficientes pour le gène de CCR9 sont soumises au protocole d'allergie alimentaire aux gliadines de blé ou non (souris contrôle) et sont sacrifiées une heure après le deuxième challenge alimentaire (C2 blé ou PBS). La rate et les ganglions mésentériques sont alors récupérés puis broyés et un tri par enrichissement négatif CD4<sup>+</sup> est réalisé sur la totalité des cellules récupérées (easySep Mouse CD4<sup>+</sup> Tcell isolation kit STEMCELL). Après comptage des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> triés, 3 millions de cellules sont injectées par voie intra-veineuse dans des souris naïves congéniques CD57BL6 LY5.1. Le lendemain de l'injection, les souris sont alors soumises au protocole d'asthme aux acariens. Le lendemain du dernier challenge intra-nasal, les souris sont sacrifiées et l'inflammation est alors analysée dans les lavages broncho-alvéolaire, les poumons, la rate et les ganglions mésentériques. Une fois la suspension cellulaire obtenue, les cellules sont marquées avec les anticorps suivant : CD3-FITC, CD4-Pecy7, Ly6G-Perpcy5.5 (neutrophiles), CCR3-APC (éosinophiles), APC-H7-ZOMBIE NIR (viabilité) et CD45.2-BV421 (LY5.1).

## 6) Dosage des IgE

Les IgE sont dosées par un ELISA sandwich et révélées par immunofluorescence à l'aide de la réaction de l'alkaline phosphatase. Brièvement, les protéines, gliadines et Der f 1 sont coâtées sur des plaques à 96 puits 2H à température ambiante à 5µg/ml et 2.5µg/ml respectivement dans du tampon carbonate. Après lavage au PBS-Tween 0.1%, la plaque est saturée à l'aide de PBS-Tween 0.1%-gélatine 0.5% pendant 1h, puis les sérums sont mis à incuber sur la nuit à 37°C et dilués dans le PBS-Tween 0.1%-gélatine 0.5% au 1/40<sup>ème</sup> pour Der f 1 et 1/20<sup>ème</sup> pour la gliadine. L'anticorps secondaire Mouse anti-IgE-Alcaline phosphatase (Southern Biotech) est ajoutée au 1/250<sup>ème</sup> dans le PBS-Tween 0.1%-gélatine 0.5% et la plaque est incubée 2H à 37°C. Enfin, le substrat MUP (Methylumbelliferyl phosphate) est dilué dans le TRIS (trishydroxyméthylaminométhane) au 1/5<sup>ème</sup> et est ajouté 90 minutes à température ambiante dans le noir.

## 7) Dosage des IgG1

Le dosage des IgG1 est fait par un ELISA indirect. Une plaque 96 puits (MAXISORP, NUNC) est coâtée avec 100µl par puits de chaque allergène dilué dans du tampon carbonate (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) et est incubée toute la nuit à 4°C. Elle est ensuite lavée 5 fois avec du PBS-Tween 0.1%. Les sérums dilués en série au demi à partir d'une dilution au 1/8<sup>ème</sup> sont ajoutés à hauteur de 50µl par puits et incubés 1h à température ambiante avec agitation. Après lavage, l'anticorps secondaire (HRP-anti rat IgG1, Southern Biotech) est ajouté à hauteur de 50µl par puits et dilué au 1/20 000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween 0.1%, et incubé 1h à température ambiante. Enfin, 100µl par puits de TMB (tetramethylbenzidine) sont ajouté 12 min à température ambiante ; la réaction est stoppée par l'ajout d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'absorbance est mesurée à 450nm. La quantité d'anticorps présente dans le sérum est déterminée par titrage en dilution limite. Si l'anticorps n'atteint pas une DO limite de 0.1 au bout de la dernière dilution en série (1/1024<sup>ème</sup>), il est alors dilué à nouveau au cours d'un nouvel ELISA. Les résultats sont ainsi exprimés en titre d'anticorps. Le titre d'un sérum correspond à l'inverse de la dernière dilution positive amenant à une DO de 0.1 (cut-off).

sérums	PBS-Tween	CTL +	CTL -	1	2	3	4	5	6	7	8	PBS-Tween	Titre correspondant (2 <sup>x</sup> )
dilutions				1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8		3
				1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16		4
				1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32	1/32		5
				1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64	1/64		6
				1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128	1/128		7
				1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256	1/256		8
				1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512	1/512		9
				1/1024	1/1024	1/1024	1/1024	1/1024	1/1024	1/1024	1/1024		10

**Figure 23: Plaque 96 puits type pour un dosage IgG1**

### 8) ELISA inhibition

Une plaque 96 puits (Maxisorp, NUNC) est coatée la veille avec l'allergène dans du tampon carbonate et incubée toute la nuit à 4°C. Les sérums sont dilués afin d'atteindre une DO de 1 grâce aux mesures de DO enregistrées lors du dosage des IgG1. Ils sont ensuite pré-incubés avec les différents allergènes dilués en série au dixième, 1h à température ambiante. Les allergènes fonctionnent donc comme des inhibiteurs. Ensuite, le mix sérum/inhibiteur est ajouté en triplicat sur la plaque coatée à hauteur de 50µl par puits. La suite du dosage est la même que pour le dosage des IgG1. Pour chaque sérum, la concentration en inhibiteur inhibant 50% de la liaison entre l'allergène coaté et le sérum est calculé (IC<sub>50</sub>).

### 9) ELISA avidité

Une plaque 96 puits (Maxisorp, NUNC) est coatée la veille avec l'allergène dans du tampon carbonate et incubée toute la nuit à 4°C. Les sérums sont dilués afin d'atteindre une DO de environ 1 grâce aux mesures de DO enregistrées lors du dosage des IgG1. Après lavage au PBS-Tween 0.1%, les sérums sont ajoutés à hauteur de 50µl par puits dans du PBS-Tween 0.1% en quadruplicat 1h à température ambiante. L'inhibiteur chimique, du thiocyanate de potassium (KSCN) est ajouté 30 min à différente concentration (4M, 2M, 1M, 0.5M). La suite du dosage est la même que pour le dosage des IgG1. Lors de l'ajout du TMB, la réaction est stoppée lorsque l'absorbance atteint visuellement 1.

### 10) Multiplex

Le dosage des cytokines dans les surnageant des lavages broncho-alvéolaire est réalisé à l'aide d'un kit de multiplex (LEGENDplex, Biolegend) en suivant les instructions du kit. Brièvement, des billes magnétiques sont ajoutées sur une plaque 96 puits prévue à cet effet

## Résultats et discussion

ainsi que chaque échantillon et la gamme étalon. La plaque est ensuite incubée 2h à température ambiante. Après lavage, un anticorps de détection est ajouté et la plaque est incubée 1h à température ambiante. Enfin, de la streptavidine couplée à la phycoérythrine (PE) est ajoutée et la plaque est incubée 30min à température ambiante. Après suspension du contenu des puits dans des tubes de cytométrie, chaque échantillon est passé au cytomètre LSRII (BD, biosciences) afin d'être analysé.

### III. Résultats

#### 1) CCR9 est indispensable dans l'aggravation de l'inflammation pulmonaire après allergie alimentaire

Une étude de notre groupe a démontré que l'allergie alimentaire à l'ovalbumine aggravait les symptômes de l'asthme aux acariens (HDM) caractérisés par une réponse TH2 plus prononcée, une production augmentée d'IgE spécifique de l'HDM et une Penh plus élevée (Bihouée et al., 2014) . Dans un modèle murin de marche atopique composé d'une sensibilisation aux gliadines de blé suivie de deux challenges respiratoires aux acariens, publié par notre groupe, la double allergie impacte uniquement les symptômes gastro-intestinaux. En effet, les souris exposées au protocole d'allergie alimentaire et aux challenges intra-nasaux présentent une perméabilité intestinale augmentée mais une hyper-réactivité bronchique normale (G. Bouchaud et al., 2016) . Une dernière étude récente a développé un modèle murin dans lequel les souris étaient sensibilisées par voie intra-gastrique à la cacahuète, puis sensibilisées à l'HDM par voie intra-péritonéale avant d'être challengées à la cacahuète en fin de protocole par IP. Les résultats montrent une augmentation de la réponse TH2 ainsi qu'une augmentation de la production d'IgE spécifiques de l'HDM mais ne parviennent pas à retrouver une exacerbation de l'inflammation puisqu'il n'y a pas d'augmentation de l'infiltrat pulmonaire (Utsch, Logiantara, Ree, & Rijt, 2017) . Ainsi, si la plupart de ces modèles parviennent à induire une aggravation parfois partielle de l'asthme après induction de l'allergie alimentaire, aucun ne se focalise sur les mécanismes immunitaires impliqués. Par ailleurs, il a été démontré que CCR9, le seul récepteur de domiciliation intestinale connu, jouerait un rôle dans certaines maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie cœliaque ou encore la maladie de Crohn et les colites ulcéraives (Olaussen et al., 2007; M.-A. Wurbel et al., 2011; S. Zhu et al., 2014) . Cependant, il existe très peu de données sur CCR9 dans l'allergie alimentaire et dans l'allergie en général. Nous nous sommes ainsi tout particulièrement intéressés à son rôle dans l'évolution de l'inflammation lors de la marche atopique. Exprimé par les thymocytes en condition basale, il est exprimé par les populations lymphocytaires T lors d'un épisode inflammatoire. Nous avons ainsi analysé son expression par différentes populations au sein de différent organes.

# Food allergen-sensitized CCR9<sup>+</sup> lymphocytes enhance airways allergic inflammation in mice

Laure Castan<sup>1,2</sup>, Marie-Aude Cheminant<sup>2</sup>, Luc Colas<sup>2,4</sup>, Sophie Brouard<sup>3,4</sup>, Antoine

Magnan<sup>2,4</sup>, Grégory Bouchaud<sup>1</sup>

*Article en reviewing sous Allergy (2017)*

<sup>1</sup>INRA, UR1268, BIA, Nantes, France

<sup>2</sup>Institut du thorax, INSERM CNRS, UNIV Nantes, Nantes, France

<sup>3</sup>ITUN, INSERM UMR1064, Nantes, France

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Service de pneumologie, Nantes, France

## **Abstract** (200 Words)

**Background:** The mechanisms of the atopic march, characterized by a natural progression from food and cutaneous allergies to rhinitis and asthma, are still unknown. However, as several organs can be involved, chemokines and their receptors might be implicated in this process and may be instrumental factors.

**Objectives:** We hypothesized that the T-cell gut-homing receptor CCR9 could be implicated in the evolution of allergic diseases.

**Methods:** We characterized the immune response and the role of CCR9 in a murine model combining food allergy to wheat gliadin and a model of acute airways inflammation in response to house dust mite.

**Results:** Compared with solely asthmatic-like mice, we demonstrated that the aggravation of pulmonary symptoms in consecutive food and respiratory allergies, characterized by an increase in pulmonary resistance and a higher Th17/ Treg ratio, was abrogated in CCR9 knock-out mice. Moreover, transfer of food-allergic CD4<sup>+</sup> T cells from wild-type but not from CCR9<sup>-/-</sup> aggravated airways inflammation demonstrating that CCR9 is involved in food allergy-enhanced allergic airway inflammation to unrelated allergens.

Conclusion: Taken together, our results demonstrated a crucial role of the T-cell homing receptor CCR9 in this model and validated its potential for use in the development of therapeutic strategies for allergic diseases.

**Running title:** CCR9<sup>+</sup> lymphocytes in atopic march

**Key words:** allergy; atopic march; CCR9; homing; mouse model.

**Abbreviations:**

AHR: airway hyperresponsiveness

AD: atopic dermatitis

BAL: bronchoalveolar lavage fluid

CCL: chemokine ligand

CCR: chemokine receptor

Der f: *Dermatophagoides farinae*

DMSO: dimethyl sulfoxide

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

IBD: inflammatory bowel disease

IgE: immunoglobulin E

IM: intramuscular

IN: intranasal

IP: intraperitoneal

HDM: house dust mites

HRP: horseradish peroxidase

MCh: metacholine

PAS: Periodic-acid Schiff

PENH: enhanced pause

PC: percutaneous

PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate

FRA: Food and respiratory allergy

RA: Respiratory allergy

## Introduction

The incidence of atopic disorders, including food allergies and allergic asthma, has increased tremendously in the last four decades. It is now well known that food allergy and/or atopic dermatitis (AD) during childhood increases the risk of developing asthma later in life (1–3). The immunological mechanisms underlying atopy remain unclear. Several epidemiological reports suggest an association between food allergies and an increased risk of severity of asthma (4–6). As a major food allergen, gluten induces atopic dermatitis (7,8), and the history of wheat allergy in atopy and asthma is under investigation (9,10). In this context, studies in mice have only evaluated the impact of food allergy on the development of respiratory allergy to new allergens, and few studies have attempted to mimic the influence of food allergy on allergic asthma (11–14). Moreover, although many studies have succeeded in inducing increased pulmonary symptoms of asthma after the induction of food allergy (11,14), none have attempted to elucidate the underlying mechanisms. Cell trafficking is a key step in allergy (15,16), and migration to the small intestine is largely regulated by chemokine (CC motif) receptor 9 (CCR9) (17,18). Recent research suggests that chemokine signaling directly modulates cellular and immune functions, and CCR9, in particular, is required for the development of normal gut immune function, including the development of gut-associated lymphoid tissues (19). Mice lacking CCR9 exhibit impaired development of small intestine crypts, a reduced number of IELs and decreased function of regulatory T cells (Treg)(20). However, the role of gut-homing molecules in food allergy, and especially CCR9, is largely unknown. Therefore, the aim of this work was to develop a murine model of consecutive food and respiratory allergy, to analyze the possible interplay between non-cross-reactive food and respiratory allergies. To this end, mice were subjected to a wheat gliadin food allergy protocol and exposed to house dust mites (HDM) to induce subsequent airways allergic inflammation. This order was chosen because food allergy often precedes the development of asthma in humans. The impact of previous food allergy on asthma characteristics was investigated at the molecular, cellular and anatomical levels. We demonstrated that food allergy later aggravated airway inflammation by modifying the immune

reaction toward a more pronounced Th17 endotype. Additionally, CCR9-deficient mice (KO) did not display aggravation of asthma-like reaction observed after food allergy. Finally, adoptive transfer of food allergen-sensitized CCR9 lymphocytes enhanced allergic lung inflammation and asthma characteristics, demonstrating an unexpected role of CCR9 in the modulation of asthma.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Animal model***

BALB/c, C57BL/6 and Ly5.1 C57BL/6 mice were obtained from Charles River (France), and CCR9<sup>-/-</sup> C57 BL/6 mice were kindly provided by Dr. Malissen (CIML, Marseille, France). The mice were housed in a ventilated cage system. The protocol was approved by the Ethics committee on Animal Experimentation of the Pays de Loire (Accreditation number: 3456). Gliadins were obtained as previously described (21), and the mice were maintained on a special diet (SAFE, Augy, France) to avoid the development of tolerance. Wild-type 6 week-old BALB/c mice were sensitized for either food allergy (13) or respiratory allergy (14), or for both. Analysis were performed 24 hours after the last HDM challenge.

### ***Immunoglobulin assay***

Blood was collected via cardiac puncture 24 hours after the last HDM challenge and then centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The assay for the quantification of specific Der f IgE was performed in serum samples via indirect ELISA, as previously described (14).

### ***AHR measurement***

Airway hyperresponsiveness (AHR) was measured using the forced oscillation technique with a FlexiVent (SCIREQ) in response to nebulization of metacholin from 0 to 20 mg/ml, dose sufficient to induce a strong increase in pulmonary resistances in allergen exposed mice but not in control (14). FlexiWare software was used for data analysis. Enhanced pause (PENH) was measured through whole body plethysmography (EMKA technologies) in response to nebulization of methacholine from 0 to 40 mg/ml, as previously described (22).

### ***Histology***

Lungs were fixed in 4% paraformaldehyde for at least 48 hours, then embedded in paraffin, cut and stained with either periodic-acid Schiff or hematoxylin eosin for inflammatory scoring as previously described (14). The histological score was calculated blindly on the basis of two parameters: bronchial morphology (4) and inflammation (8). The number of PAS positive and negative cells was counted to evaluate the mucus production in the airways.

### ***Flow cytometry***

Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed with 1 ml PBS administered intratracheally to mice through a flexible catheter. The collected fluid was centrifuged, and the total cell number was counted. The lungs and the gut mesenteric lymph nodes (mLn) were removed and crushed to obtain a single-cell suspension; the cells were suspended in PBS/5% FBS buffer. Cells were stained with the following surface markers: CD3-FITC, Ly6G-Perpcy5.5, CD4-BV421, and CD25-BV510 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), CCR3-APC (R&D system, Lille, France) and CCR9-PE (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) and in the presence of CD16/32 mAbs (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). Cells were stimulated for 5 h with 50 ng/ml of PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) and 1 µg/ml of ionomycin with brefeldine A (Golgi plug, BD Biosciences, 1:1000). Cells were fixed and permeabilized using the Cytotfix/Cytoperm Kit (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and stained with anti-IL-17-APC and anti-Foxp3-Alexa-fluor 488 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). The cells were analyzed on a Fortessa X20 cytometer (BD Biosciences). Data were acquired using DIVA software (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and analyzed with FlowJo (TreeStar) as previously described (22,23) and using gating strategy describes in **Figure S1**.

### ***LegendPLEX assay***

Cytokine levels were assessed via LegendPLEX bead-based immunoassays (Biolegend, London, United Kingdom) according to the manufacturer's instructions.

### ***Adoptive transfer***

Spleen and mesenteric lymph nodes were sampled in food-allergic mice one hour after the last challenge and were then crushed and suspended in PBS 5% FBS. CD4<sup>+</sup> T cells were sorted using the EasySep CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit (Stemcell, Grenoble, France) according to the manufacturer's instructions. Then, 3x10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were injected intravenously into 6-week-old Ly5.1 mice. On the next day, the mice began the acute asthma protocol, as described above.

### ***Human samples***

Eleven atopic patients with a clinical history of house dust mite sensitization and allergic rhinitis were included in the analysis. In parallel, nine non atopic healthy volunteers were included as controls. Blood was sampled on all subjects and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Ficoll gradient from peripheral blood as described<sup>30</sup>. Samples were collected from Prevall DP cohort under recruitment (NCT02908360). Each subject provided a written informed consent.

### ***PCR***

The total quantity of RNA extracted using Machery-Nagel DNA, RNA and protein purification kit (Duren, Germany) was determined by Spectrophotometer Nanodrop ND-1000 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA) and cDNA was synthesized from 500ng of RNA using MMLV reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR was performed as previously described (22) using the indicated primers: 5'-ATGTCAGGCAGTTTGCGAG-3' and 3'-TGCAGTACCAGTAGACAAGGAT-5' for CCR9 gene and 5'-GGGAAACTGTGGCGTGAT-3' and 3'-TTCAGCTCAGGGATGACCTT-5' for GAPDH as the housekeeping gene.

## **RESULTS**

### ***Previous food allergy aggravates HDM-induced asthma***

**(Figure 1A).** Thanks to our model, we compared the respiratory allergy (RA) and food and respiratory allergy (FRA) groups to determine the potential synergy between the two allergies. We assessed Der f1-specific IgE in serum as well as the pulmonary function and the histological parameters. Specific IgE were increased in the RA mice compared with the controls (CTL) ( $0.53 \text{ mA.U} \pm 0.02$  versus  $2.3 \text{ mA.U} \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ). Compared with RA mice, the increase was more pronounced in FRA mice, as they displayed higher production of Der f 1 specific IgE ( $2.3 \text{ mA.U} \pm 0.8$  versus  $5.56 \text{ mA.U} \pm 1.7$ ,  $p < 0.05$ ) **(Figure 1B)**. At the physiological level, the enhanced pause (PenH), measured via plethysmography, was significantly increased in the mice subjected to the HDM-induced airway inflammation protocol (RA and FRA groups) compared with the CTL mice, with the RA and FRA mice showing comparable values **(Figure 1C)**. Using Flexivent®, as a more sensitive method for measuring airway responsiveness, we showed a more pronounced increase of airway resistance in HDM mice compared with control mice (from  $0.53$  to  $2.7 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{sec/ml}$  for control and  $0.73$  to  $11.16 \text{ cmH}_2\text{O} \cdot \text{sec/ml}$  for RA mice,  $p < 0.001$ ). Moreover, we demonstrated that FRA mice displayed significantly greater AHR than RA mice, based on pulmonary resistance and elastance measurements **(Figure 1 D and E)**. Tissue inflammation was evaluated through histological examination of hematoxylin-eosin-staining lung sections **(Figure 1F)**. Compared with CTL, a significant increase of the histological score was observed in FRA and RA mice and there was a more pronounced inflammation in FRA than in RA mice, reflecting the aggravation of lung inflammation **(Figure 1G)**. To assess the percentage of mucus-producing epithelial cells, Periodic acid-Schiff staining was performed in lung sections. Compared with RA mice, there was a significantly increased number of mucus-producing epithelial cells in the bronchioles of FRA mice, with both groups exhibiting an increase compared with CTL **(Figure 1H)**. Taken together, these results show that previous food allergy aggravates HDM-induced AHR and the pathologic characteristics of asthma by priming the immune system to increase its response to HDM respiratory challenge.

***Previous food allergy redirects HDM-induced asthma toward a Th17 response***

Having demonstrated the influence of double exposure to allergens on the canonical parameters of asthma-like reaction in mice, we next aimed to explore immune cell changes based on the total cell, lymphocyte, neutrophil and eosinophil counts in the BAL fluid (**figure 2A**) and lungs (**Figure 2B**) via flow cytometry. Compared with RA, the numbers of BAL and lung inflammatory cells in FRA mice were increased 2- to 3-fold. Notably, the number of lymphocytes was increased by around 55% in BAL and 75% in lung in FRA mice compared with RA mice. In contrast, the number of eosinophils remained unaffected by previous food allergy in FRA mice compared with RA mice (**Figure 2A and B**). To further detail the mechanisms linking the two types of allergies, we analyzed cytokine secretion in broncho-alveolar lavages from immune cells via ELISA (**Figure 2C-F**). According to the increase in neutrophilic inflammation observed in FRA mice, the level of IL-17 was increased in FRA mice compared with RA mice (**Figure 2C**). In contrast, the levels of IL-4 and IL-5 were comparable between FRA and RA mice (**Figure 2E and F**). Finally, the level of IL-13, a cytokine involved in both Th2 inflammation and AHR, was elevated in FRA compared with RA mice (**Figure 2D**). Regarding the Treg response, the level of IL-10 and TGF- $\beta$  were found to be decreased in FRA mice compared with RA mice (**Figure 2G**). These data demonstrate that FRA mice display mixed Th2/Th17 inflammation with an immune response oriented toward a Th17 phenotype in a more pronounced manner than RA mice, which results in more neutrophilic allergic airway inflammation. Moreover, we suggest that the Th17/Treg balance is altered in asthmatic-like mice with previous food allergy.

### ***Previous food allergy influences lung and gut-homing T cells***

Accurate and efficient tissue-specific trafficking between blood, lymphoid organs and peripheral tissues is a fundamental prerequisite for T cells to participate in the immune response. To determine whether the gut-homing chemokine receptor CCR9<sup>31</sup> is associated with particular T helper cell traffic and polarization during food and respiratory allergy, we assessed the nature of the T cell response in CCR9-expressing cells (**Figure 3**) using flow cytometry to determine frequency of CCR9<sup>+</sup> Treg, Teff and Th17 cells (**Figure S1**). After respiratory allergy, frequency of CCR9<sup>+</sup> Treg cells and CCR9<sup>+</sup> Th17 cells were found more

elevated in the lung compared with control mice. Surprisingly, frequency of CCR9<sup>+</sup> Treg cells was decreased and CCR9<sup>+</sup> Th17 was increased in FRA mice compared with RA mice, suggesting a possible role of CCR9 in the Treg/Th17 balance in food allergy exacerbation of airway inflammation (**Figure 3A and B**). To the opposite, frequency of CCR9<sup>+</sup> Treg cells remained unaffected in the mLN of control and RA mice but was decreased in FRA mice. Moreover, frequency of CCR9<sup>+</sup> Th17 cells was increased of FRA mice compared with RA mice (**Figure 3C and D**). Thus, the induction of allergic airway inflammation after food allergy increased the CCR9<sup>+</sup> Th17/Treg ratio suggesting a new role for CCR9 in asthma.

***CCR9 expressed by CD4<sup>+</sup> T cells is required for food allergy-aggravated asthma.***

To decipher the role of the gut-homing molecule CCR9 in the influence of food allergy on asthma, we analyzed CCR9<sup>-/-</sup> mice in our model (**Figure 4**). As our model was developed in BALB/c genetic background and CCR9<sup>-/-</sup> was on a C57BL/6 background, we first confirmed our results in C57BL/6 mice (**Figure S2**). Interestingly, CCR9<sup>-/-</sup> mice showed a decrease in lung resistance after a dual consecutive allergic protocol (FRA CCR9<sup>-/-</sup>), suggesting a crucial role for CCR9 in the aggravation of airway inflammation after food allergy (**Figure 4A**). In addition, FRA CCR9<sup>-/-</sup> mice exhibited a lower number of total cells in BAL especially T lymphocytes compared with FRA WT mice (**Figure 4B**). Finally, staining of lung sections revealed decreases in epithelial cell hyperplasia and mucus production and extensive perivascular and peri-bronchial cell infiltration in FRA CCR9<sup>-/-</sup> mice compared with FRA WT mice (**Figure 4C**). Then, as FRA mice display higher Th17 and lower Treg response, we aimed to determine the role of CCR9 in this balance. To do so, we measured Th17 and Treg response in the lung and the mLN of dual WT and CCR9<sup>-/-</sup> allergic mice (**Figure 4D and E**). First we confirmed that naïve C57BL/6 CCR9<sup>-/-</sup> mice do not show differences in the Th17/Treg responses compared with naïve C57BL/6 WT (**Figure S3A-C**). Unexpectedly, FRA CCR9<sup>-/-</sup> mice did not show decrease in CD4<sup>+</sup> IL-17 producing Th17 cells compared with FRA WT mice neither in the lung or in mLN (**Figure 4D**), suggesting a minor role of CCR9 in the number of Th17 cells during allergies. To the opposite, we observed an increase in Tregs cell number in the lung and in the mLN of FRA CCR9<sup>-/-</sup> compared with FRA WT mice (**Figure 4E**), reinforcing

the crucial role of CCR9 in the food allergy-induced aggravation of airway inflammation in mice. Taken together, our results demonstrated a major role of CCR9 in regulating the Th17/Treg balance during allergy by acting mainly on Treg cells number within the organs. We next sought to confirm the role of CCR9 expressed by CD4<sup>+</sup> T cells using adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from food-allergic WT or CCR9<sup>-/-</sup> into congenic Ly5.1<sup>+</sup> mice before the induction of respiratory allergy (**Figure 5A**). Then, on the day after the last intranasal HDM challenge cell numbers in BAL fluid were assessed. Our results demonstrated a decrease of cell infiltrates in mice receiving food allergen-sensitized lymphocytes from CCR9<sup>-/-</sup> mice (**Figure 5B**), but no effect was observed in mice receiving WT or CCR9<sup>-/-</sup> cells from non-allergic mice (**Figure 5C**). Then, we measured decreases in IL-17 and IL-13 levels in the BAL of mice receiving food-allergic cells from CCR9<sup>-/-</sup> compared with mice receiving WT cells (**Figure 5D**). Finally, we found similar levels of the Th2 cytokines IL-4 and IL-5, whereas the level of IL-10 and TGF- $\beta$  were increased (**Figure 5D**). These results confirmed the pivotal role of the gut-homing receptor CCR9 expressed in CD4<sup>+</sup> T cells under the influence of previous food allergy on inflammation during subsequent asthma, especially on lung function and Th17 inflammation. Finally, to assess whether the increased expression of CCR9 by immune cells would be relevant for human atopy, CCR9 gene expression was assessed in PBMC from allergic rhinitis patients. CCR9 gene expression was markedly more elevated in PBMC of atopic patients compared with healthy volunteers (**Figure 5E**).

#### **Discussion:**

In the present study, we first confirmed that food allergy aggravates airway inflammation induced by HDM, as previously suggested by our group and others (11,13,14). The induction of airway inflammation after food allergy increases pulmonary resistance and histological scores. Moreover, the inflammatory cell count in BAL increases, showing potentiation of pulmonary inflammation by food allergy. Unexpectedly, we observed a significant increase of IL-17 secretion in BAL. These results are reminiscent of data obtained in severe asthmatic patients (24,25) and mouse models (26,27), in which the secretion of IL-17 in airways was shown as related to the high proportion of neutrophils. Moreover, we

observed an increase in IL-13 levels, indicating a persistence, of the Th2 phenotype, despite the lack of change in the levels of IL-4 and IL-5. Finally, those mice display a deficiency in the regulatory response, as suggested by the decrease of IL-10 and TGF- $\beta$  levels. Thus, these results suggest that food allergy aggravates asthma through a mixed Th2/Th17 phenotype inflammation and a modulation of the Th17/Treg balance. We were then interested in analyzing the role of CCR9 in the regulation of the inflammatory process during allergic airway inflammation after food allergy. Indeed CCR9 is the main gut-homing receptor and is implicated in gut diseases, such as Crohn's (28) or celiac disease (29), and is suggested to play a role in food allergies (30–33). Thus, we analyzed the role of CCR9 in our model. Interestingly, we observed an increase of IL-17-producing effector T cells, along with a decrease of Treg cells in FRA mice, among cells expressing CCR9. This decrease in CCR9 expressing Treg cells might be linked to a modification of the Teff/Treg balance toward the T effector response in food allergy which in turn impact the later response. Therefore, we were able to demonstrate that deficiency of CCR9 alleviates lunginflammation in mice. CCR9 is the main chemokine receptor involved in chemotaxis to the gut and is responsible for the migration of T cells toward the intestine (20,34,35). Its deletion in knockout mouse models or the use of CCR9-specific antagonists leads to a decrease in gut inflammation in mouse models of Crohn's disease or ulcerative colitis (36,37). Here, we show that CCR9 deficiency in a model of successive allergy reduces inflammation. A previous study by Lopez-Pacheco *et al.*, analyzing airway inflammation in CCR9<sup>-/-</sup> showed that CCR9 deficiency impairs lung inflammation through decreased recruitment of eosinophils(38). In our hand, CCR9 deficiency has no effect on allergic airway inflammation. These different results might be due to the use of different animal model. In fact, Lopez-Pacheco *et al.*, use a model consisting of an intra-peritoneal sensitization of ovalbumin with adjuvant which could induce a gut inflammation and a systemic response. Our model uses a percutaneous sensitization with a total extract of house dust mite without adjuvant to induce a local and mix inflammatory response. Therefore, both studies suggest that CCR9 and CCL25 expression may therefore be key drivers of the early stages of airway inflammation by regulating immune cell recruitment. To better understand the mechanism

underlying the food allergy-induced aggravation of asthma and the role of CCR9, we performed adoptive transfer of CD4<sup>+</sup> T cells from food-allergic mice into naïve mice, which were subsequently sensitized to HDM. This allowed us to demonstrate that food-sensitized CD4<sup>+</sup> T cells were required to enhance asthma characteristics, as we observed more severe inflammation in asthmatic mice receiving food-sensitized CD4<sup>+</sup> T cells compared with asthmatic mice receiving non-sensitized CD4<sup>+</sup> T cells. Interestingly, the aggravation of asthma induced by food allergen CD4<sup>+</sup> lymphocytes was abolished when mice received food allergen-sensitized lymphocytes from mice deficient in CCR9. Thus, these results confirm that CCR9 is a driver of the exacerbation of lung inflammation in food-allergic mice. This discrepancy may not be linked to a difference in cell survival after adoptive transfer as we found the donor cells in similar proportions in each condition (data not shown). One explanation could be a dysregulation of the cell migration involving CCR9 or the expression of another chemokine receptor such as CCR4 or CCR8 which target T cells to the lung and/or to the skin (39,40). Our mouse model allowed us to determine the implications of homing receptors in the inter-connection between food and respiratory allergies. The increase in CCR9<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells in the gut might be linked to an accumulation during food allergy-related inflammation and could subsequently produce IL-17 in the lungs, in turn inducing neutrophil influx and aggravation of asthma. Additionally, a minor increase of CD4<sup>+</sup> T regulatory cells was observed in the lungs of successive allergic mice compared to only respiratory allergic mice, which is relevant to the increase in inflammation. It has been shown *in vitro* that CCR9 can inhibit the development of regulatory T cells through its ligation to CCL25(41). This observation suggests that migration of CCR9<sup>+</sup> T cells into the lungs could inhibit the proliferation of Tregs, prevent their anti-inflammatory effect and, thus, exacerbate pulmonary inflammation. However the antigen specificity of such migrating CCR9<sup>+</sup> cells might be a crucial point to understand the mechanism by which those cells could interplay between organs in allergy. According to our previous results, there is an increase of CCR9<sup>+</sup> T cells and a decrease of CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the blood of patients suffering from allergic conjunctivitis(42), in line with the increase in CCR9 mRNA levels we have observed in atopic rhinitis patients compared with healthy

volunteers. Thus, CCR9 appears as a promising therapeutic target for both food and respiratory allergies.

**Funding:**

This work was supported by a grant from the Société Française d'Allergologie, from Stallergenes®, the foundation "Vaincre la mucoviscidose" and the region "Pays de la Loire"

**Disclosure of potential conflict of interest:**

L.C. was supported by the "Ministère de la recherche" and the University of Nantes. G.B. was supported by the People Programme (Marie-Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under REA grant agreement no. 624910. The other authors declare that they have no relevant conflict of interest.

**Acknowledgments:**

First, the authors would like to thank Martin Klein and Kelly Henrio for their support of the experiments. The authors would also like to thank the Cytocell platform for assistance with the flow cytometry analysis, and we would like to thank the Therassay platform for the use of respiratory equipment (Plethysmography and Flexivent systems). We are grateful to the members of the UTE IRS-UN animal facility for the support they provided to us with the mice. We would like to thank the breeding facility, CDTA in Orleans, for breeding the CCR9<sup>-/-</sup> mice and B. Malissen for providing us the CCR9<sup>-/-</sup> mice. We would also like to thank the MicroPicell platform and Myriam Robard for performing the histological analysis. Finally, we would like to thank Stallergenes for kindly providing the Derf f extracts and the Allergology platform of Nantes Hospital for patient characterization.

**Author contributions:**

L.Castan performed the experiments, analyzed the data and wrote the manuscript. G.B. participated in the analysis of the cell populations and wrote the manuscript. M.A.C. provided support for the experiments in mice. L.Colas recruited and characterized patients. S.B gave

scientific inputs and help in manuscript writing. A.M. designed and elaborated the study and supervised manuscript writing.

## References

1. Just J, Deslandes-Boutmy E, Amat F, Desseaux K, Nemni A, Bourrat E et al. Natural history of allergic sensitization in infants with early-onset atopic dermatitis: Results from ORCA Study. *Pediatr Allergy Immunol* 2014;**25**:668–673.
2. Amat F, Saint-Pierre P, Bourrat E, Nemni A, Couderc R, Boutmy-Deslandes E et al. Early-onset atopic dermatitis in children: Which are the phenotypes at risk of asthma? Results from the ORCA cohort. *PLoS One* 2015;**10**:1–14.
3. Asarnoj A, Östblom E, Kull I, Lilja G, Pershagen G, Hedlin G et al. Sensitization to inhalant allergens between 4 and 8 years of age is a dynamic process: Results from the BAMSE birth cohort. *Clin Exp Allergy* 2008;**38**:1507–1513.
4. Tariq SM, Matthews SM, Hakim E a, Arshad SH. Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;**11**:162–167.
5. Teague WG. Food allergen sensitization as a determinant of disturbed airway function in young infants: First step on the path to persistent asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2008;**122**:766–767.
6. Priftis KN, Mermiri D, Papadopoulou A, Papadopoulos M, Fretzayas A, Lagona E. Asthma symptoms and bronchial reactivity in school children sensitized to food allergens in infancy. *J Asthma* 2008;**45**:590–595.
7. Varjonen E, Petman L, Mäkinen-Kiljunen S. Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy* 2000;**55**:294–296.
8. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K. Antigliadin IgE - indicator of wheat allergy in atopic dermatitis. *Allergy* 2000;**55**:386–391.
9. Keet CA, Matsui EC, Dhillon G, Lenehan P, Paterakis M, Wood RA. The natural

- history of wheat allergy. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 2009;**102**:410–415.
10. Adachi YS, Itazawa T, Okabe Y, Higuchi O, Ito Y, Adachi Y. A case of mite-ingestion-associated exercise-induced anaphylaxis mimicking wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 2013;**162**:181–183.
  11. Brandt EB, Scribner TA, Saito Akei H, Rothenberg ME. Experimental gastrointestinal allergy enhances pulmonary responses to specific and unrelated allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:420–427.
  12. Blumchen K, Gerhold K, Schwede M, Niggemann B, Avagyan A, Dittrich AM et al. Effects of established allergen sensitization on immune and airway responses after secondary allergen sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:615–621.
  13. Bouchaud G, Gourbeyre P, Bihouée T, Aubert P, Lair D, Cheminant MA et al. Consecutive Food and Respiratory Allergies Amplify Systemic and Gut but Not Lung Outcomes in Mice. *J Agric Food Chem* 2015;**63**:6475–6483.
  14. Bihouée T, Bouchaud G, Chesné J, Lair D, Rolland-Debord C, Braza F et al. Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respir Res* 2014;**15**:142.
  15. Pease JE, Williams TJ. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2006;**118**:305–318.
  16. Castan L, Magnan A, Bouchaud G. Chemokine receptors in allergic diseases. *Allergy* 2017;**72**:682–690.
  17. Hosoe N, Miura S, Watanabe C, Tsuzuki Y, Hokari R, Oyama T et al. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;**286**:G458-66.
  18. Onai N, Kitabatake M, Zhang Y, Ishikawa H, Ishikawa S, Matsushima K. Pivotal role of CCL25 (TECK)-CCR9 in the formation of gut cryptopatches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes. *Int Immunol* 2002;**14**:687–694.
  19. Gorfou G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of  $\beta$ 7 Integrins in Intestinal Lymphocyte Homing and Retention. *Curr Mol Med* 2009;**9**:836–850.

20. Uehara S, Grinberg A, Farber JM, Love PE. A role for CCR9 in T lymphocyte development and migration. *J Immunol* 2002;**168**:2811–2819.
21. Bodinier M, Leroy M, Ah-Leung S, Blanc F, Tranquet O, Denery-Papini S et al. Sensitization and elicitation of an allergic reaction to wheat gliadins in mice. *J Agric Food Chem* 2009;**57**:1219–1225.
22. Chesné J, Braza F, Chadeuf G, Mahay G, Cheminant M-A, Loy J et al. Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**135**:1643
23. Bouchaud G, Braza F, Chesné J, Lair D, Chen K-W, Rolland-Debord C et al. Prevention of allergic asthma through Der p 2 peptide vaccination. *J Allergy Clin Immunol* 2015;**136**:8–11.
24. Moore WC, Hastie AT, Li X, Li H, Busse WW, Jarjour NN et al. NIH Public Access. 2015;**133**:1557–1563.
25. Al-Ramli W, Préfontaine D, Chouiali F, Martin JG, Olivenstein R, Lemièrre C et al. TH17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2009;**123**:1185–1187.
26. Wilson MR, O’Dea KP, Zhang D, Shearman AD, Van Rooijen N, Takata M. Role of lung-margined monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;**179**:914–922.
27. Chesné J, Braza F, Mahay G, Brouard S, Aronica M, Magnan A. IL-17 in Severe Asthma. Where Do We Stand? *Am J Respir Crit Care Med* 2014;**190**:1094–1101.
28. Eksteen B, Adams DH. GSK-1605786, a selective small-molecule antagonist of the CCR9 chemokine receptor for the treatment of Crohn’s disease. *IDrugs*. 2010;**13**:472–781.
29. Olausson RW, Karlsson MR, Lundin KEA, Jahnsen J, Brandtzaeg P, Farstad IN. Reduced Chemokine Receptor 9 on Intraepithelial Lymphocytes in Celiac Disease Suggests Persistent Epithelial Activation. *Gastroenterology* 2007;**132**:2371–2382.
30. Wurbel M-A, McIntire MG, Dwyer P, Fiebiger E. CCL25/CCR9 interactions regulate

- large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS One* 2011;**6**:16442.
31. Islam S a, Luster AD. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nat Med* 2012;**18**:705–715.
  32. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Blaner WS, Sparwasser T et al. Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. 2012;**141**:2109–2118.
  33. Walters MJ, Wang Y, Lai N, Baumgart T, Zhao BN, Dairaghi DJ et al. Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;**335**:61–69.
  34. Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M et al. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature* 2003;**424**:88–93.
  35. Zabel B a, Agace WW, Campbell JJ, Heath HM, Parent D, Roberts a I et al. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 1999;**190**:1241–1256.
  36. Papadakis K a, Prehn J, Moreno ST, Cheng L, Kouroumalis E a, Deem R et al. CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;**121**:246–254.
  37. Wurbel M -a. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta + gut intraepithelial lymphocytes. *Blood* 2001;**98**:2626–2632.
  38. Lopez-Pacheco C, Soldevila G, Du Pont G, Hernandez-Pando R, Garia-Zepeda EA. CCR9 Is a Key Regulator of Early Phases of Allergic Airway Inflammation. 2016;**2016**.
  39. Mutalithas K, Guillen C, Raport C, Kolbeck R, Soler D, Brightling CE et al. Expression of CCR8 is increased in asthma. *Clin Exp Allergy* 2010;**40**:1175–1185.
  40. Tian L, Li W, Wang J, Zhang Y, Zheng Y, Qi H et al. The CKLF1-C19 peptide

attenuates allergic lung inflammation by inhibiting CCR3- and CCR4-mediated chemotaxis in a mouse model of asthma. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2011;**66**:287–297.

41. Evans-Marin HL, Cao AT, Yao S, Chen F, He C, Liu H et al. Unexpected regulatory role of CCR9 in regulatory T cell development. *PLoS One* 2015;**10**:1–16.
42. Galicia-Carreón J, Santacruz C, Ayala-Balboa J, Robles-Contreras A, Perez-Tapia SM, Garfias Y et al. An Imbalance between Frequency of CD4 + CD25 + FOXP3 + Regulatory T Cells and CCR4 + and CCR9 + Circulating Helper T Cells Is Associated with Active Perennial Allergic Conjunctivitis. 2013;**2013**.

### Figure Legends:

#### **Figure 1: Previous food allergy aggravates HDM-induced asthma.**

After wheat gliadin sensitization, mice were challenged via oral gavage; one week later, they were sensitized to HDM and then challenged intra-nasally (A); on the day after the last challenge, blood was collected, and Derf-specific IgE was measured (B); pulmonary functions were assessed based on Penh (C), resistance (D) and elastance (E). Lung sections were subjected to either hematoxylin-eosin or Periodic acid-Schiff staining (F) to allow the calculation of the histological score (G) and the percentage of mucus-producing epithelial cells (H). The results are expressed as the percentage of PAS-positive cells per bronchiole (PAS-positive cells per bronchiole divided by the total number of epithelial cells in each bronchiole). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 8 mice per group); \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Scale bar = 250  $\mu$ m.

#### **Figure 2: Previous food allergy redirects inflammation in HDM-induced asthma toward a Th17 phenotype and modulates the Th17/Treg cytokine balance.**

Total, polynuclear eosinophil, polynuclear neutrophil and lymphocyte cell numbers in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (A) and in lung (B) were measured via cytometry. IL-17 (C), IL-13 (D), IL-5 (E), IL-4 (F), IL-10 (G) and TGF- $\beta$  (H) levels were assessed in supernatant of BAL fluid using LegendPlex. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 8 mice per group); \*p<0.05,

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Detection limit was 0.95 pg/ml for IL-17, 1.14 pg/ml for IL-13, 0.97 pg/ml for IL-5, 0.53 pg/ml for IL-4, 1.25 pg/ml for IL-10 and 2 pg/ml for TGF- $\beta$ .

**Figure 3: Previous food allergy induces an increase in effector Th17 cells and impairs regulatory T cell development in CCR9<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells.** Dot plot (left panel) and frequency (right panel) of CCR9 expression on CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (A) and effector Th17 cells (B) in the lung of CTL, RA and FRA mice measured by flow cytometry. Frequency of CCR9 expression on Treg and Th17 cells in the gut mesenteric lymph nodes of CTL, RA and FRA mice (C and D). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 8 mice per group); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**Figure 4: CCR9 deficiency abrogates the effects of previous food allergy on asthma.** Pulmonary resistance (A) was measured in WT (black square) and CCR9<sup>-/-</sup> (white square) mice with consecutive food and respiratory allergies using a FlexiVent. Total, eosinophil, neutrophil and lymphocyte cell numbers in BAL fluid (B) were measured via flow cytometry in FRA WT (black bars) and FRA CCR9<sup>-/-</sup> (white bars) mice. Hematoxylin-eosin staining of lung sections (C) from WT (left panel) and CCR9<sup>-/-</sup> (right panel) mice was performed to measure lung lesions. Th17 cells (D) and Treg cells (E) numbers were measured in the lungs and in the gut mesenteric lymph nodes of FRA WT (black square) and FRA CCR9<sup>-/-</sup> (white circle) mice by flow cytometry. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 7 mice per group); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Scale bar = 250  $\mu$ m.

**Figure 5: CCR9 expressed by CD4<sup>+</sup> T cells is indispensable for food allergy-aggravated asthma.** First,  $3 \cdot 10^6$  food allergen-sensitized CD4<sup>+</sup> lymphocytes from WT (black bars) or CCR9-deficient (white bars) mice were injected intravenously into naïve congenic Ly5.1 mice. The next day, Ly5.1-receiving mice were subjected to the respiratory protocol (A). Total, eosinophil, neutrophil and lymphocyte cell numbers in BAL fluid were measured in mice receiving WT or CCR9-deficient cells from food allergic mice (B) and naïve mice as control (C). IL-17, IL-13, IL-4, IL-5, IL-10 and TGF- $\beta$  levels in the BAL of mice receiving food allergens sensitized WT or CCR9<sup>-/-</sup> cells were measured using Legendplex (D). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 6 mice per group); \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . CCR9 mRNA expression

(F) measured by PCR in healthy volunteers (black circle) and in atopic rhinitis patients (white circle). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = 8) \*\*p<0.01. Allergic status of all the patients was determined by skin-prick testing for common aeroallergen and the main characteristics are described in **Table I**

**Table I: clinical parameters at inclusion for the atopic patients.**

**Figure S1: Gating strategy to measure frequency of CCR9 expressing cells among Treg cells and effector Th17 cells.**

**Figure S2: Previous food allergy aggravates HDM-induced asthma C57BL6 mice in a similar manner as in Balb/C mice.** After wheat gliadin sensitization, mice were challenged via oral gavage; one week later, they were sensitized to HDM and then challenged intranasally. On the day after the last challenge, blood was collected and total, polynuclear eosinophil, polynuclear neutrophil and lymphocyte cell numbers in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid (A) and in lung (B) were measured via cytometry. Derf-specific IgE (C) as measured by ELISA. Lung sections were subjected to either hematoxylin-eosin or Periodic acid-Schiff staining (D) to allow the calculation of the histological score (E) and the percentage of mucus-producing epithelial cells (F). The results are expressed as the percentage of PAS-positive cells per bronchiole (PAS-positive cells per bronchiole divided by the total number of epithelial cells in each bronchiole). Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 6 mice per group); \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Scale bar = 250  $\mu$ m.

**Figure S3: CCR9 deficiency do not impact naïve lung and gut Treg and Th17 response.** Th17 cells (A and B) and Treg cells (C and D) numbers were measured in the lungs (A and C) and in the gut mesenteric lymph nodes (B and D) of naïve WT (black bars) and CCR9<sup>-/-</sup> (white bars) mice by flow cytometry. Total, polynuclear eosinophil, polynuclear neutrophil and lymphocyte cell numbers in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid of naïve WT (black bars) and CCR9<sup>-/-</sup> (white bars) were measured via cytometry. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM (n = at least 6 mice per group).

Figure 1

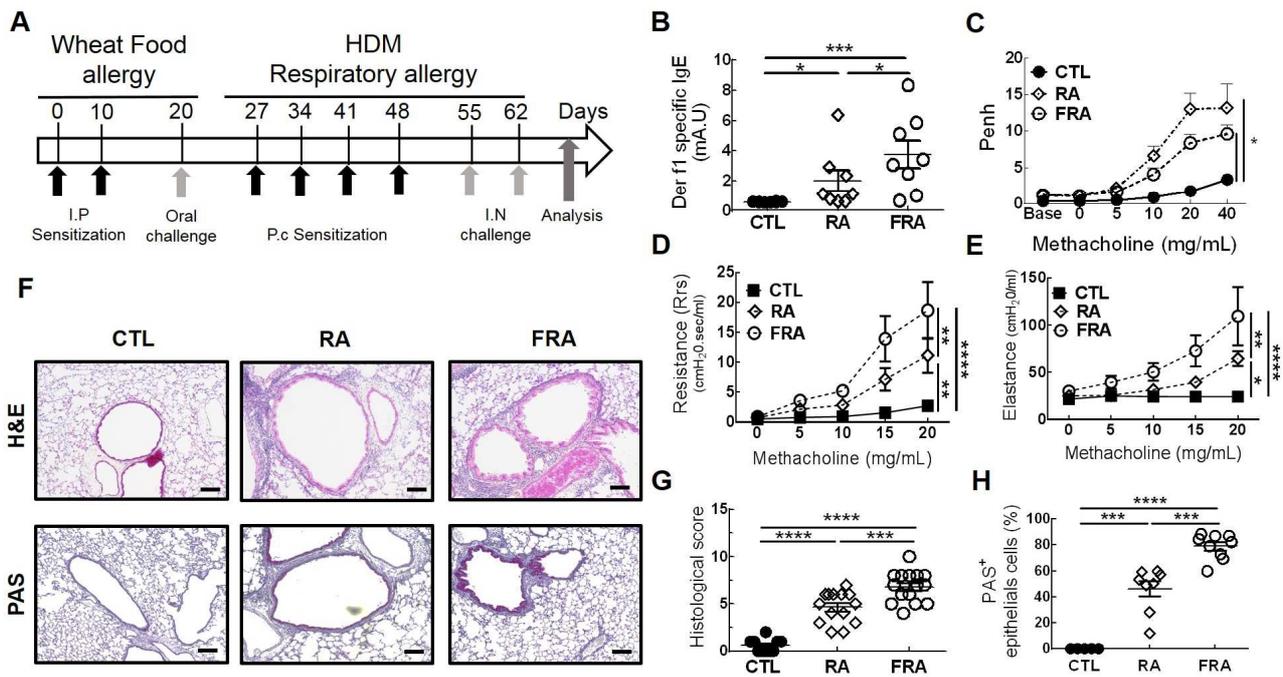


Figure 2

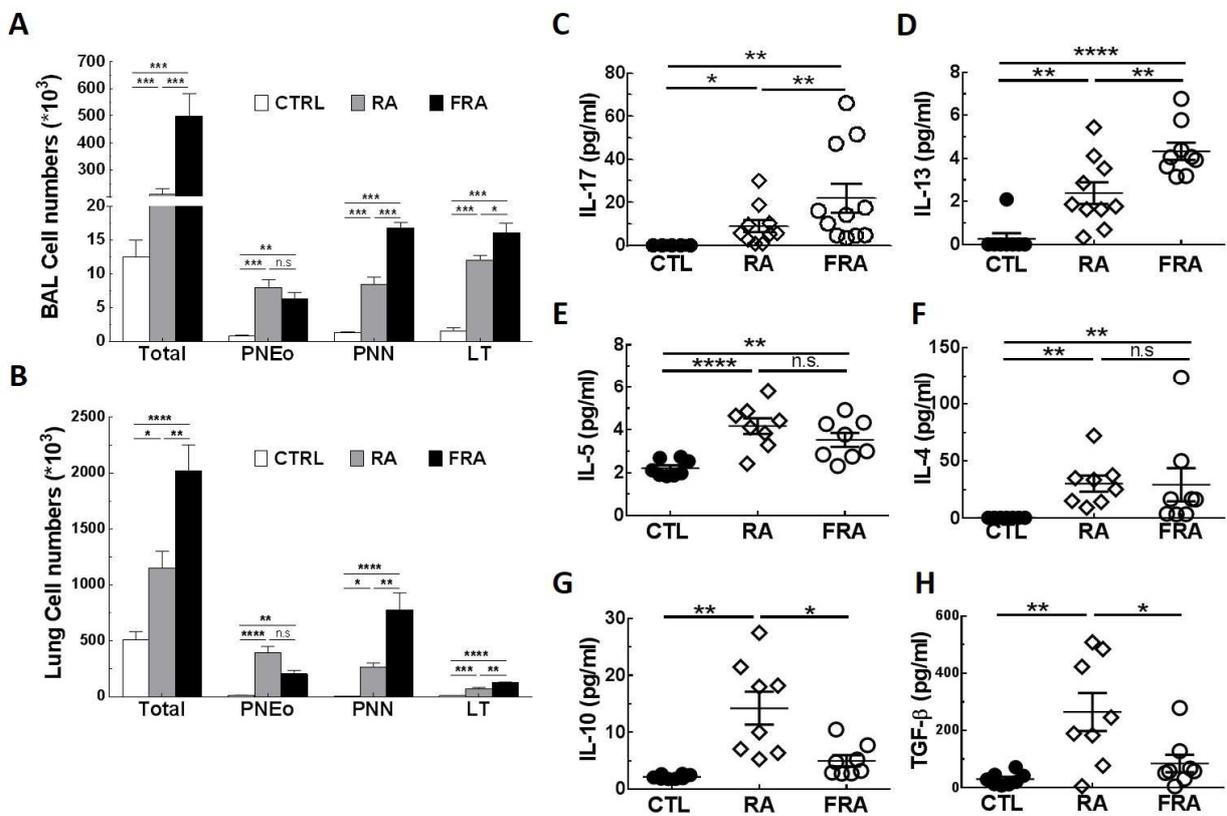


Figure 3

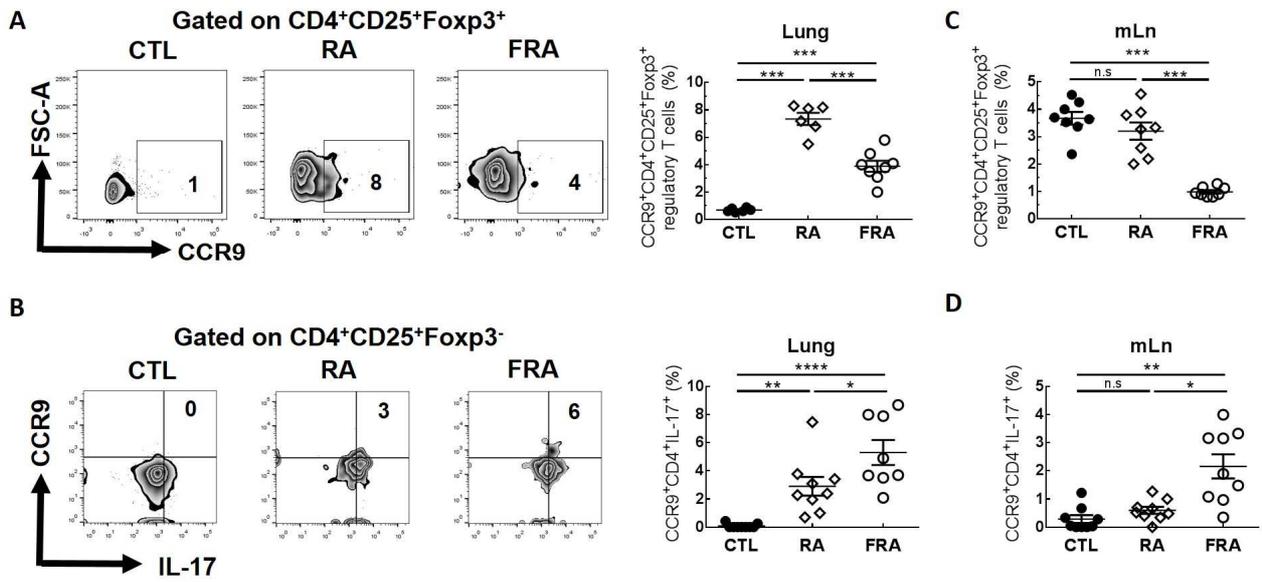


Figure 4

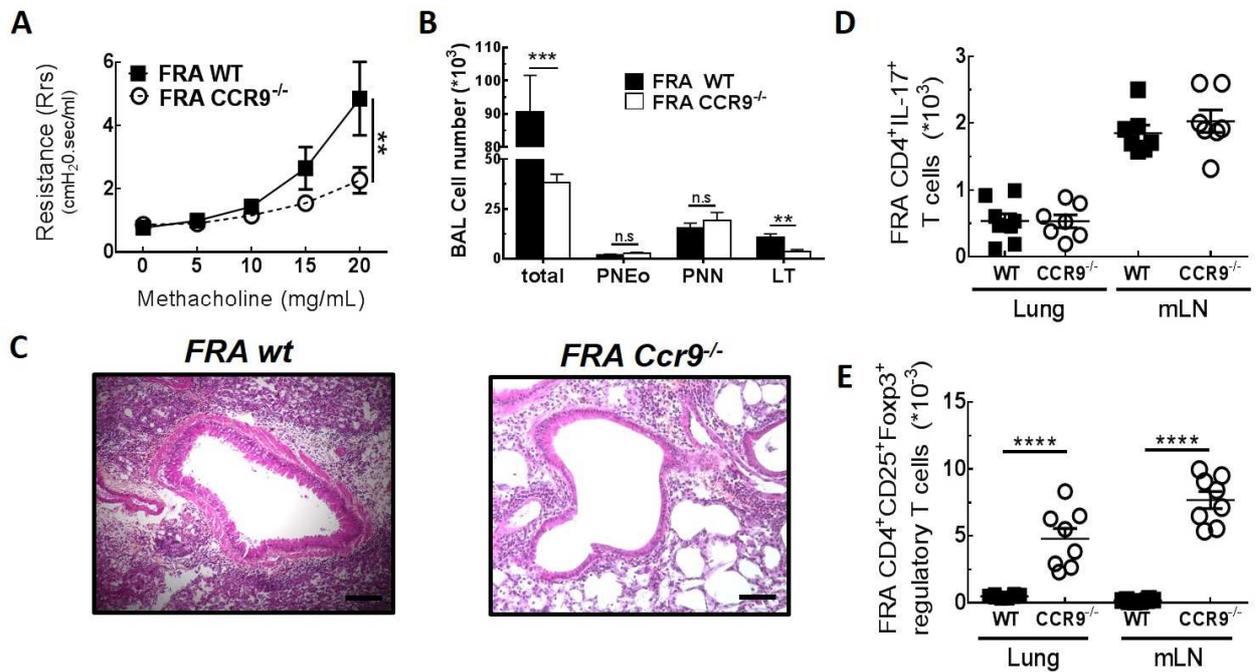


Figure 5

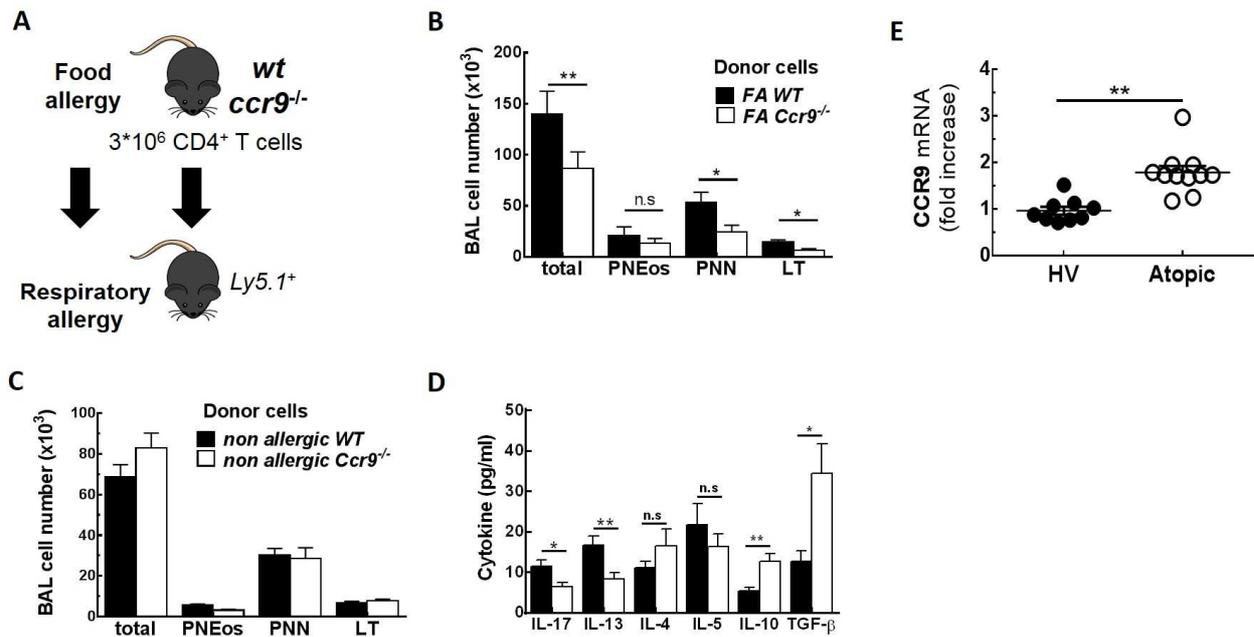


Table I

Characteristics	Atopic patients
age (mean +/- SD)	26 +/- 5,6
Female sex (%)	88
height cm (mean +/- SD)	163,7 +/- 3,96
weight kg (mean +/- SD)	63,4 +/- 13,68
ARCT* (mean +/- SD)	16,1 +/- 2,8
SCORAD** (mean +/- SD)	2,84 +/- 6,32
ACQ*** (mean +/- SD)	0,42 +/- 0,5
sensitization to Der f n (%)	11 (100)
sensitization to cat n (%)	2 (18)
sensitization to dog n (%)	1 (9)
sensitization to grasses n (%)	3 (27)
sensitization to birch n (%)	3(27)

\* ARCT: allergic rhinitis control test (/25)

\*\* SCORAD: score of atopic dermatitis

\*\*\* ACQ: asthma control questionnaire

Sensitization is evaluated by skin prick test.

Figure S1

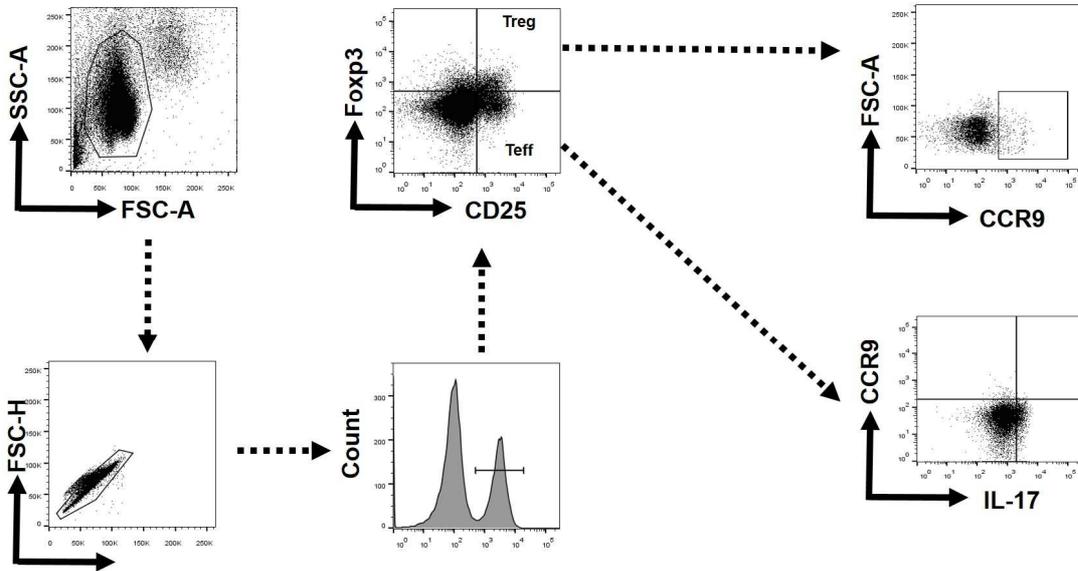


Figure S2

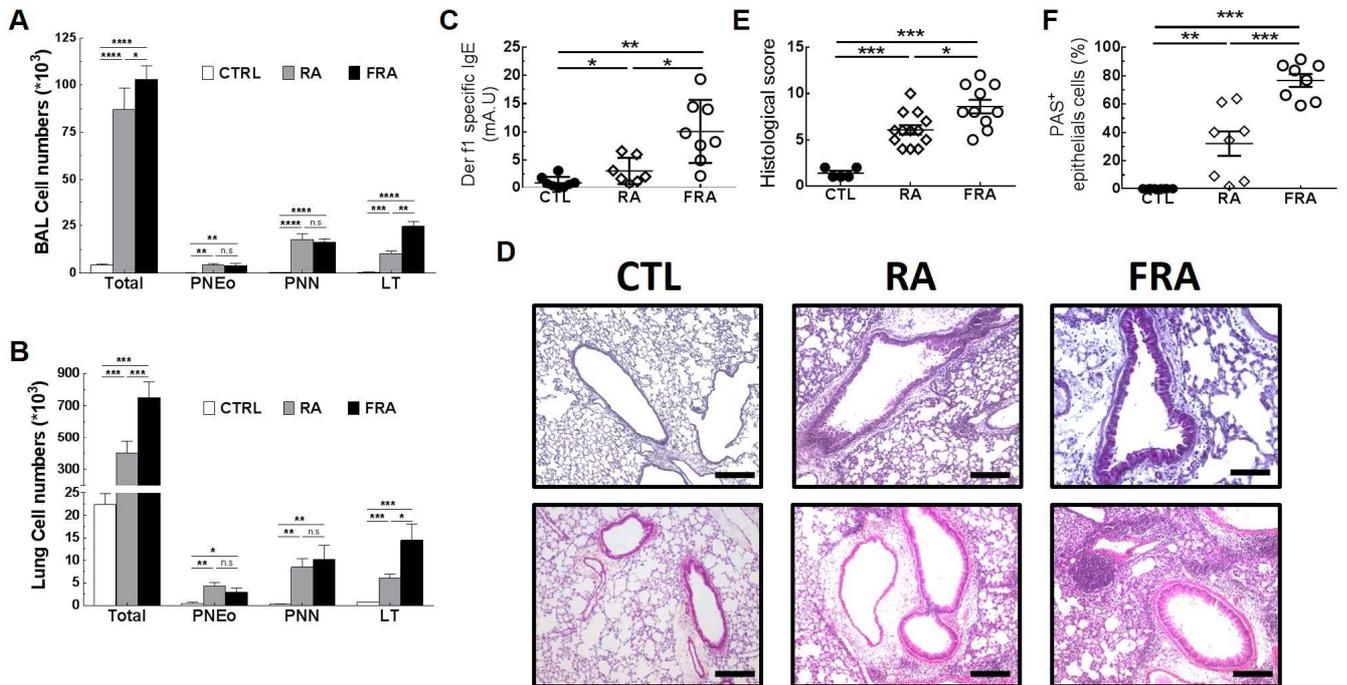
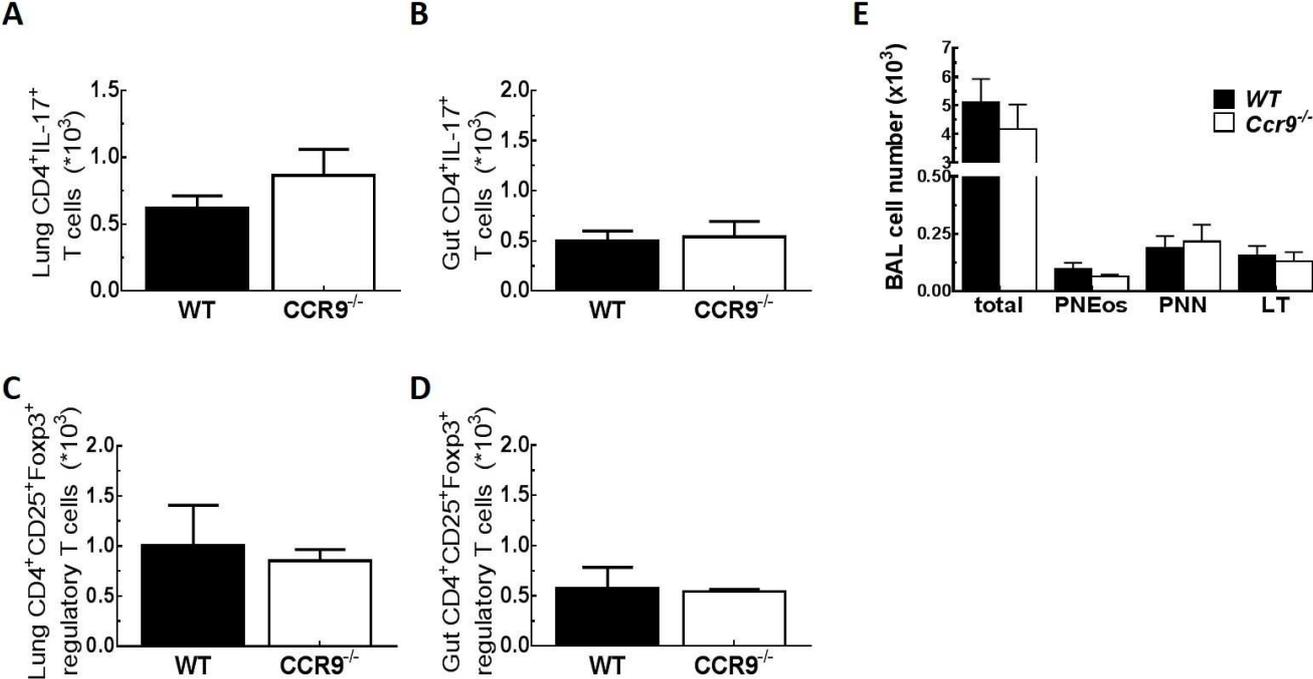


Figure S3

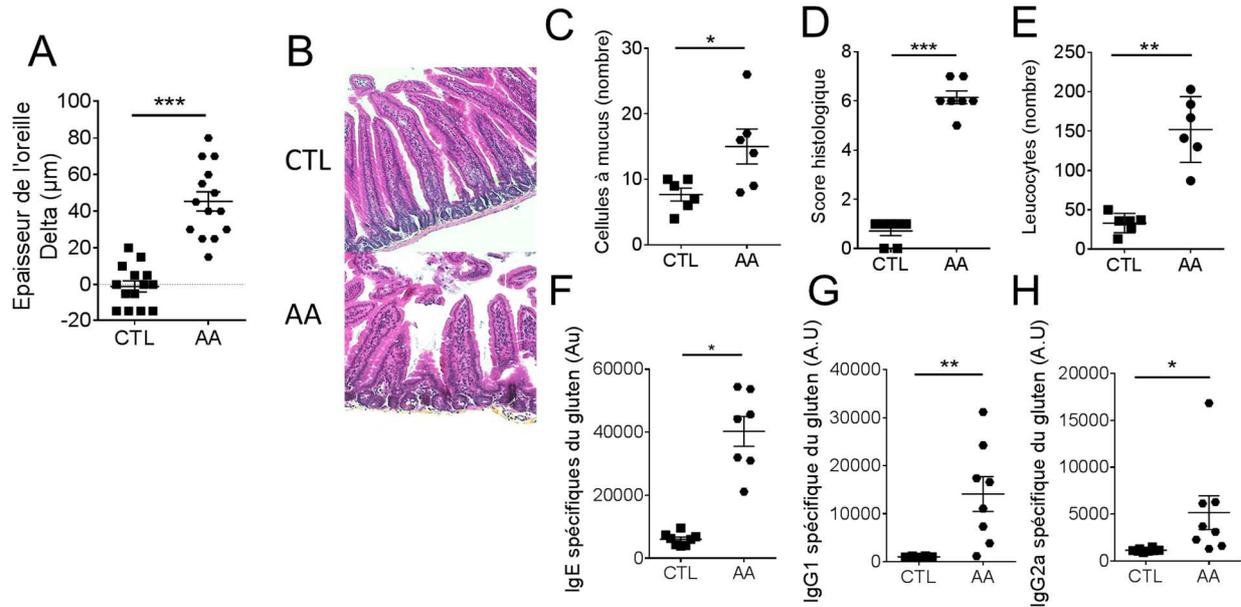


## 2) CCR9 dans l'allergie alimentaire seule

### *2.1) Caractérisation du modèle d'allergie alimentaire*

#### 2.1.a) Caractérisation physiopathologique post modèle de marche atopique

En même temps que les groupes de souris subissant le modèle de marche atopique (FA+RA) et ceux subissant uniquement la partie asthme du modèle de marche atopique (RA), nous avons également soumis un groupe de souris uniquement à la partie allergie alimentaire (AA) du modèle afin d'en caractériser les paramètres physiopathologiques. Ainsi dans la figure ci-dessous (Figure 24), les résultats correspondent à une analyse faite 6 semaines après le dernier challenge alimentaire, soit l'équivalent du lendemain du dernier challenge respiratoire pour les souris FA+RA, jour auquel ont été faites toutes nos analyses précédentes. Nous avons ainsi caractérisé la réponse allergique à travers plusieurs paramètres fondamentaux : la réponse inflammatoire après challenge illustrée par la mesure de l'augmentation de l'épaisseur de l'oreille (Figure 24A), l'analyse histologique de l'intestin (Figure 24B à E) ainsi que la mesure des immunoglobulines dans le sérum (Figure 24F à H). Tout d'abord nous observons que les souris ont bien été sensibilisées au gluten puisque le challenge par gavage oral induit bien une réponse inflammatoire. En effet, l'épaisseur de l'oreille du groupe AA (allergie alimentaire) est significativement supérieure à celle du groupe CTL : 45.35 $\mu$ m versus 1.07 $\mu$ m. Par ailleurs, nos résultats montrent que même 6 semaines après induction de l'allergie alimentaire, l'inflammation persiste toujours. En effet, on retrouve une augmentation du nombre de cellules à mucus et du nombre de leucocytes dans les villi et une augmentation du score histologique chez les souris AA par rapport aux souris CTL. Enfin, les souris ont bien été sensibilisées au gluten de blé car elles produisent une quantité significativement supérieure d'IgE spécifique du gluten par rapport au groupe CTL (40298 unités versus 6085 unités). Ces données suggèrent que l'inflammation induite par le modèle d'allergie alimentaire au gluten de blé est persistante ; si cela n'était pas le cas, l'augmentation de l'inflammation pulmonaire après induction de l'asthme chez les souris FA+RA ne pourrait pas être imputé sur le compte de l'allergie alimentaire.



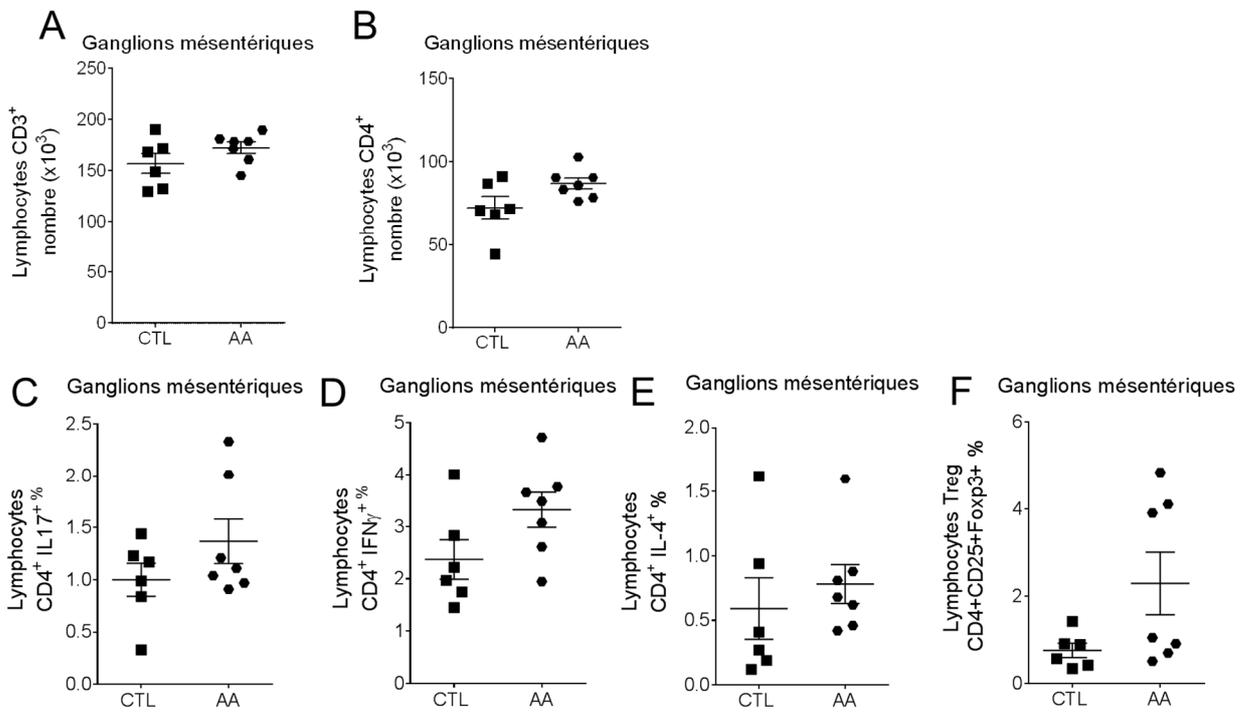
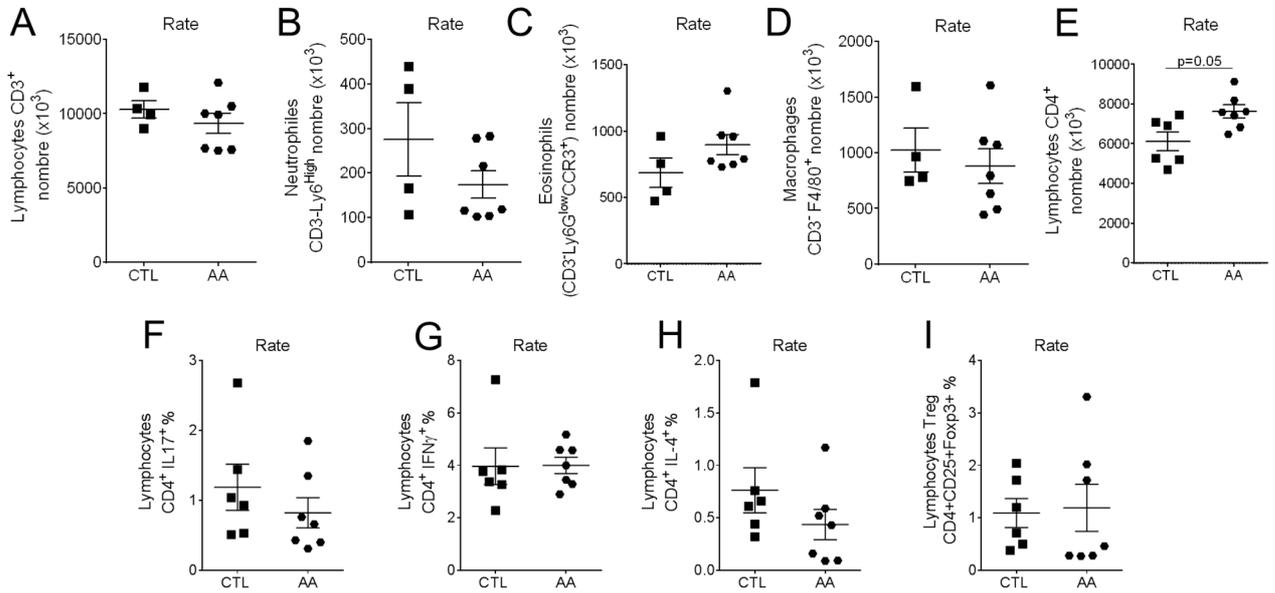
**Figure 24: Caractérisation physiopathologique de l'allergie alimentaire après modèle de marche atopique.** L'effet de l'allergie alimentaire a été évalué par la mesure de l'épaisseur de l'oreille après challenge (A), la réalisation de coupe histologique (B), le nombre de cellules à mucus (C), le calcul du score histologique (D), le nombre de leucocytes (E), la mesure des IgE (F) et IgG1 (G) et IgG2a (H) spécifique du gluten. N= 8 souris par groupe, \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

### 2.1.b) Inflammation systémique post modèle marche atopique

Au même moment que les analyses de la Figure 24, nous avons également regardé l'inflammation systémique (rate et ganglions mésentériques) des souris du groupe allergie alimentaire (AA), 6 semaines après le dernier challenge au gluten. Nous avons ainsi pu caractériser différentes populations de cellules immunitaires dont les lymphocytes, les neutrophiles, les éosinophiles et les macrophages dans la rate ainsi que les différentes sous-populations de lymphocytes dans la rate et les ganglions mésentériques par marquage intracellulaire. Les résultats sont présentés pour la rate (Figure 25) et pour les ganglions mésentériques (Figure 26). Nous n'observons pas de différence entre le groupe CTL et le groupe AA en terme d'inflammation que ce soit dans la rate ou dans les ganglions mésentériques. Nous observons cependant une augmentation significative du nombre total de lymphocytes CD4<sup>+</sup> dans la rate des souris du groupe AA par rapport au groupe CTL (7619.10<sup>3</sup> versus 6112.10<sup>3</sup>). Par ailleurs il semblerait que la fréquence des sous populations TCD4<sup>+</sup> IL17<sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> et IL-4<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques chez les souris allergiques soit supérieure à celle retrouvée chez les souris contrôles (non significatif). Ces résultats ne semblent pas cependant surprenants. En effet, cette analyse a été réalisée 6 semaines après le dernier challenge alimentaire soit 6 semaines après la réaction allergique. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le système immunitaire est retourné à un état basal et que l'inflammation systémique due à la réaction allergique a disparue. De plus ces analyses sont

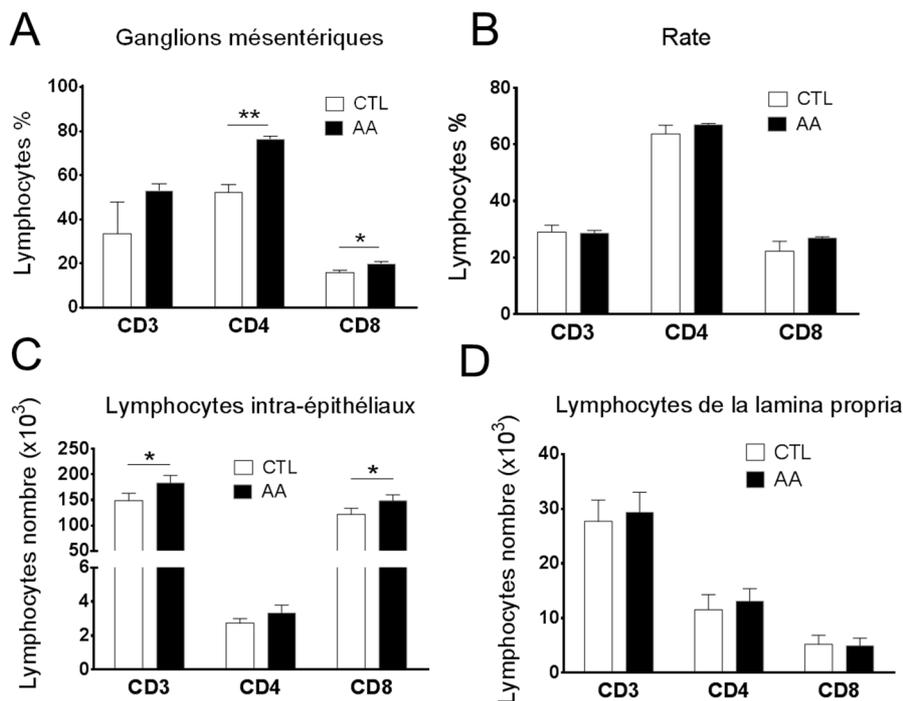
## Résultats et discussion

faites à un niveau systémique qui n'illustre pas parfaitement la réponse immunitaire lors de l'allergie : il serait pertinent de regarder la réponse au niveau local (lymphocytes intra-épithéliaux et lymphocyte de la lamina propria).



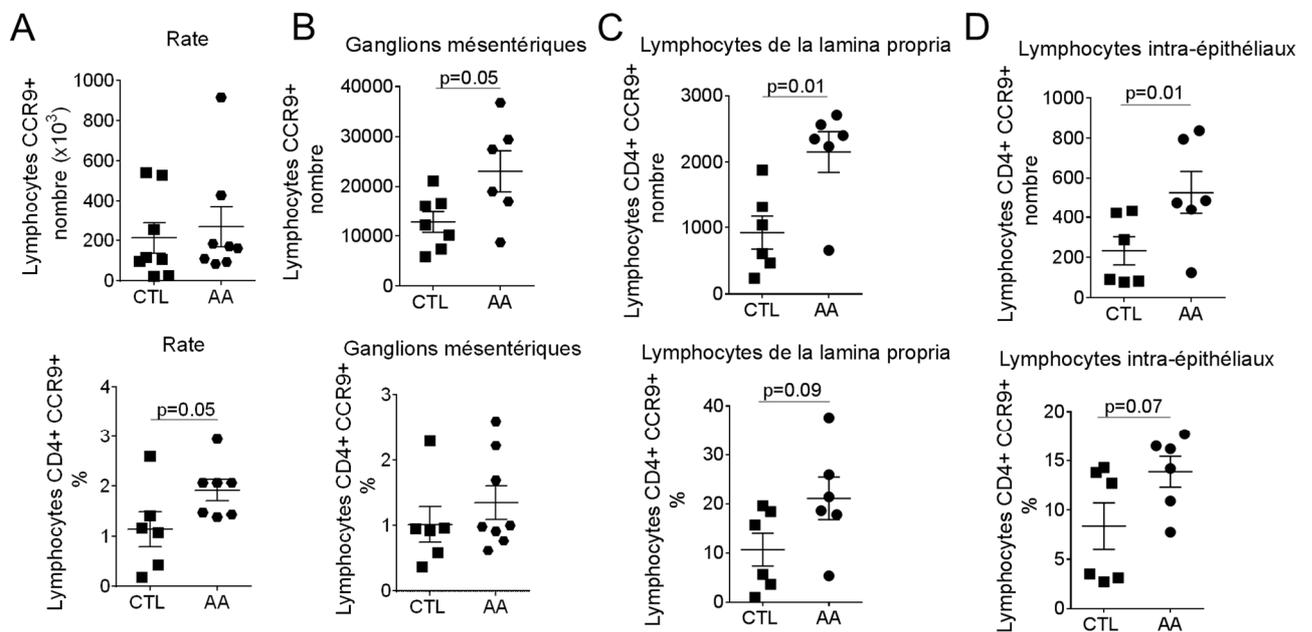
### 2.1.c) Analyse de l'inflammation post challenge alimentaire

Afin d'évaluer le rôle de CCR9 dans l'allergie alimentaire au gluten de blé nous avons analysé l'inflammation systémique et locale juste après le dernier challenge alimentaire dans un groupe de souris ne subissant que la partie allergie alimentaire du protocole de marche atopique. Nous avons ainsi calculé le nombre de cellules lymphocytaire CD3, CD4 et CD8 dans la rate, les ganglions mésentériques, les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) et les lymphocytes de la lamina propria (LP) (Figure 27). Au niveau physiopathologique, les résultats sont similaires à ceux présentés dans la figure 24 (résultats non montrés). Au niveau de l'inflammation nous n'observons aucune différence entre les groupes de souris allergique alimentaire (AA) et le groupe contrôle (CTL) dans la rate et les LP. En revanche nous observons une augmentation significative de la fréquence des lymphocytes CD4 et CD8 dans les ganglions mésentériques et une augmentation du nombre de CD3 et de CD8 dans les IEL chez le groupe AA par rapport au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que les souris soumises aux protocoles d'allergie alimentaire présentent bien une réponse inflammatoire après challenge alimentaire.



**Figure 27: Phénotypage CD3, CD4 et CD8 après challenge alimentaire.** La fréquence et le nombre de lymphocytes a été calculé dans les ganglions mésentériques (A), la rate (B), les lymphocytes intra-épithéliaux (C) et les lymphocytes de la lamina propria (D) par cytométrie en flux. Barre blanche : groupe AA ; barre noire : groupe CTL. N= 6 souris par groupe, \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

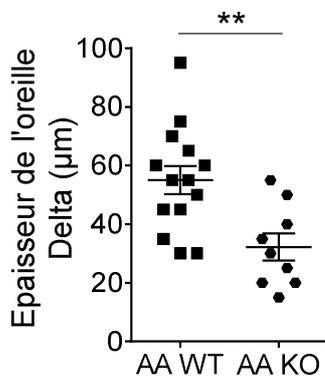
Dans l'objectif d'analyser le rôle de CCR9 dans l'allergie alimentaire, nous avons mesuré la fréquence des CD4<sup>+</sup> exprimant CCR9 ainsi que le nombre total de lymphocytes exprimant CCR9 dans la rate (A), les ganglions mésentériques (B), les LP (C) et les IEL (D) (Figure 28). Nous pouvons observer une augmentation globale de l'expression de CCR9 par les lymphocytes dans le groupe de souris soumis au protocole d'allergie alimentaire comparé au groupe contrôle dans tous les organes analysés. Plus exactement, on observe une augmentation significative de la fréquence des CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> dans la rate et une augmentation significative du nombre de lymphocytes exprimant CCR9 dans les ganglions mésentériques, les LP et les IEL. Ces résultats montrent que CCR9 aurait potentiellement un rôle dans l'induction de la réponse allergique au niveau local (IEL et LP). En effet, le compartiment intra-épithélial et la lamina propria représentent les sites effecteurs du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT). Les lymphocytes présents dans ces deux compartiments sont ainsi responsables de la réponse immunitaire induite par l'allergie alimentaire. Nous formulons l'hypothèse que l'augmentation du nombre de lymphocytes exprimant CCR9 lors de l'allergie alimentaire dans les ganglions mésentériques, les LP et les IEL est corrélée à une migration des lymphocytes T plus importante vers l'intestin, entraînant ainsi la réponse inflammatoire. Il serait alors pertinent de regarder l'inflammation systémique et locale des souris déficientes pour le gène de CCR9 après allergie alimentaire fin de savoir si cette inflammation est diminuée en l'absence de CCR9.



**Figure 28: Mesure du nombre total de lymphocytes CCR9<sup>+</sup> et de la fréquence de CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup>.** Le nombre total de lymphocytes exprimant CCR9 ainsi que la fréquence de CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> a été mesuré dans la rate (A) les ganglions mésentériques (B), les lymphocytes de la lamina propria (C) et les lymphocytes intra-épithéliaux (D) par cytométrie en flux. N= 6 min souris par groupe

## 2.2) Les souris WT et CCR9<sup>-/-</sup> ne présentent pas de différence d'inflammation systémique

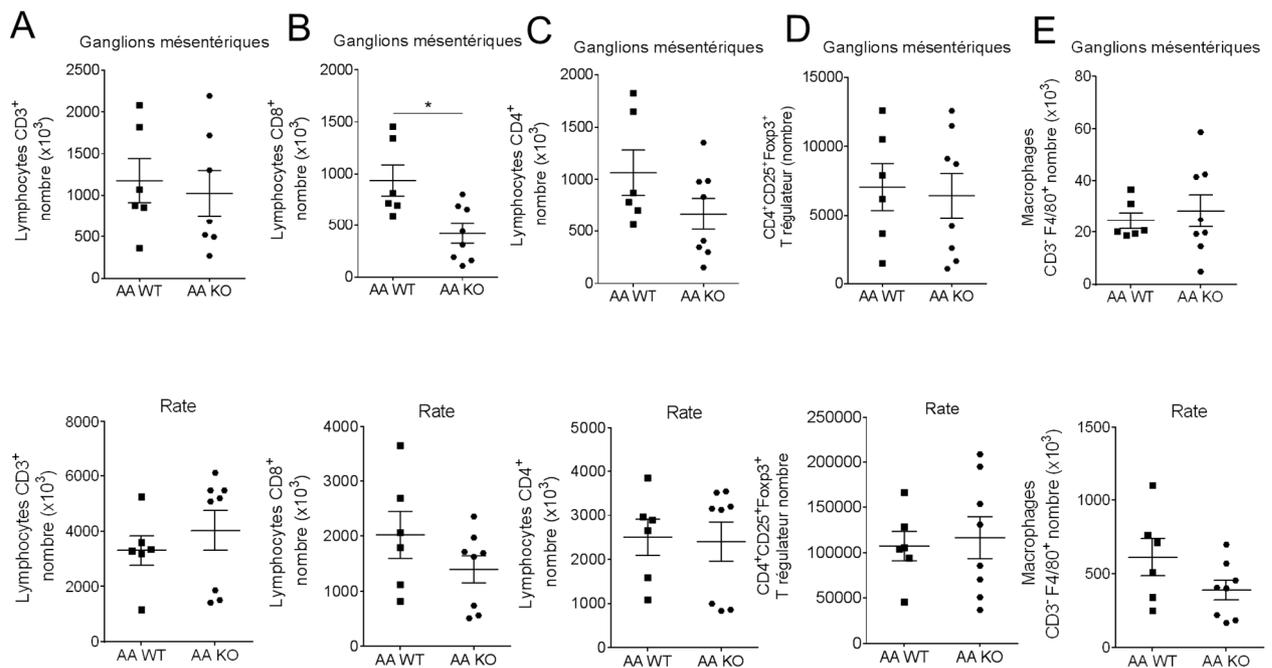
Dans l'objectif d'analyser la réponse inflammatoire systémique chez les souris déficientes pour le gène de CCR9, nous avons soumis des souris KO au modèle d'allergie alimentaire stricte. Les données des figures ci-dessous (Figure 29 & 30) représentent ainsi l'analyse de l'inflammation après challenge alimentaire. Nous avons tout d'abord évalué la réponse inflammatoire après gavage avec l'allergène par la mesure de l'épaisseur de l'oreille. Comme nous pouvons le voir dans la figure ci-dessous (Figure 29), les souris CCR9<sup>-/-</sup> présentent une épaisseur de l'oreille significativement diminuée par rapport aux souris sauvages (55µm versus 32.2µm). Il semblerait ainsi que les souris déficientes pour CCR9 présentent une réponse allergique diminuée par rapport aux souris sauvages.



**Figure 29: Mesure de l'épaisseur de l'oreille après challenge par gavage oral de gluten. N= 8 souris min par groupe \*\*p<0.01**

Nous avons également évalué l'inflammation par la mesure du nombre des populations lymphocytaires T CD3 (A), CD8 (B), CD4 (C), et Régulatrices (D) et le nombre de macrophages (E) dans la rate et les ganglions mésentériques des souris sauvages et KO soumises au protocole d'allergie alimentaire (Figure 30). Les résultats montrent qu'il y a peu voire aucune différence concernant l'inflammation systémique entre les souris KO et les souris sauvages. La seule différence notable est une diminution significative du nombre de lymphocytes TCD8<sup>+</sup> dans les ganglions mésentériques chez les souris KO par rapport aux souris sauvages (935.10<sup>3</sup> pour les AA WT versus 420.10<sup>3</sup> pour les AA KO). Ces résultats suggèrent que l'induction de l'allergie alimentaire stricte chez les souris CCR9<sup>-/-</sup> n'induit pas de différence dans l'inflammation systémique. Ainsi les données que nous avons pu observer sur les souris soumises au protocole de marche atopique, à savoir une aggravation de l'inflammation pulmonaire, ne peuvent pas être expliquées par une modification de l'inflammation systémique des souris. En conséquence, si l'inflammation systémique n'est pas la cause de l'aggravation de l'inflammation pulmonaire subséquente, une autre hypothèse est à formuler. De par nos

résultats obtenus avec les transferts adoptifs, nous avons émis l'hypothèse que CCR9, exprimé par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> était indispensable à l'évolution de cette inflammation. Il serait à présent intéressant de savoir d'où viennent ces cellules et comment migrent elles par la suite. Ainsi, si l'inflammation systémique n'est pas mis en jeu dans ce mécanisme, il faudrait analyser l'inflammation locale représentée par les lymphocytes intra-épithéliaux et les lymphocytes de la lamina propria dans des souris déficientes pour CCR9 afin de savoir s'ils sont des acteurs clés dans l'inflammation au cours de l'allergie alimentaire.



**Figure 30: Phénotypage des populations immunitaires dans les ganglions mésentériques et la rate par cytométrie en flux.** Mesure du nombre de lymphocyte CD3<sup>+</sup> (A), CD8<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup> (C), T régulateurs (D) et macrophages (E) totaux. N= 6 souris min par groupe \*p<0.05

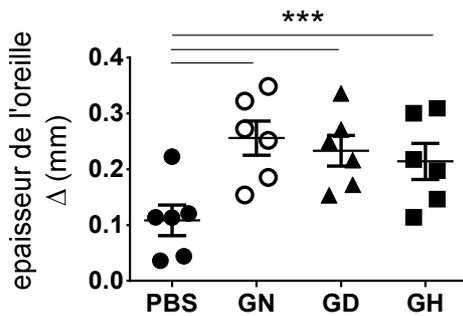
### *3) Modèle d'allergie alimentaire par sensibilisation cutanée*

Lors de mon parcours en thèse, j'ai eu l'opportunité de réaliser une mission d'un mois à l'étranger dans le cadre du réseau COST (European cooperation in science and technology). J'ai ainsi été accueillie dans le laboratoire du Dr Katrine Lindholm Bøgh, au sein du National Food Institute du DTU (Technical University of Denmark), à Copenhague. Le projet avait pour but de caractériser la réponse intestinale suite à un protocole d'allergie alimentaire par sensibilisation cutanée à trois formes de gluten. Plusieurs études montrent en effet que la peau représente un site crucial de sensibilisation et serait une porte d'entrée pour différents allergènes. Il a été montré que les enfants souffrant de dermatite atopique ou ayant une mutation du gène de la filaggrine ont plus de risque de développer des allergies alimentaires ou de l'asthme (Amat et al., 2015; Kelleher et al., 2016) . Par ailleurs, le blé et particulièrement le gluten est incriminé dans plusieurs cas d'allergie alimentaire et cutanée. Le blé est un aliment majeur de nos régimes occidentaux et il est très utilisé en tant qu'additif dans de nombreux produits afin d'améliorer leurs qualités de structure. De plus, l'hydrolyse du gluten est largement utilisée afin d'augmenter sa solubilité dans les produits alimentaires. Cependant, plusieurs cas d'allergie cutanée au gluten hydrolysé sur des patients non allergiques au blé ont été rapportés, notamment au Japon et en France. Ces réactions allergiques se produisent après application de produits cosmétiques contenant du gluten hydrolysé (Chinuki et al., 2013; Laurière et al., 2006; Varjonen, Petman, & Mäkinen-Kiljunen, 2000) . L'hydrolyse du gluten peut être réalisée de différentes façons : soit par une hydrolyse acide et on parlera dans ce cas de gluten désamidé soit une hydrolyse par enzyme. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser trois formes de gluten : gluten natif (GN), gluten désamidé (GD) et gluten hydrolysé par enzyme (GH) afin de caractériser la réponse allergique et l'allergénicité de ces trois produits sur des rats sensibilisés par voie cutanée. L'objectif de ce projet était de caractériser la réponse lymphocytaire T dans différents compartiments : les intestins (lymphocytes intra-épithéliaux et lymphocytes de la lamina propria), les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques, la peau et les poumons. Par ailleurs, j'ai pu comparer le potentiel immunogène des trois formes de gluten en dosant les IgE spécifiques, les IgG1 spécifiques et en réalisant des expériences d'avidité et d'inhibition.

#### *3.1) La sensibilisation cutanée induit une réponse allergique suite à un challenge*

Dans le but d'évaluer le potentiel allergénique de chaque forme de gluten, nous avons réalisé des mesures de l'épaississement de l'oreille des rats après injection par voie sous cutanée de

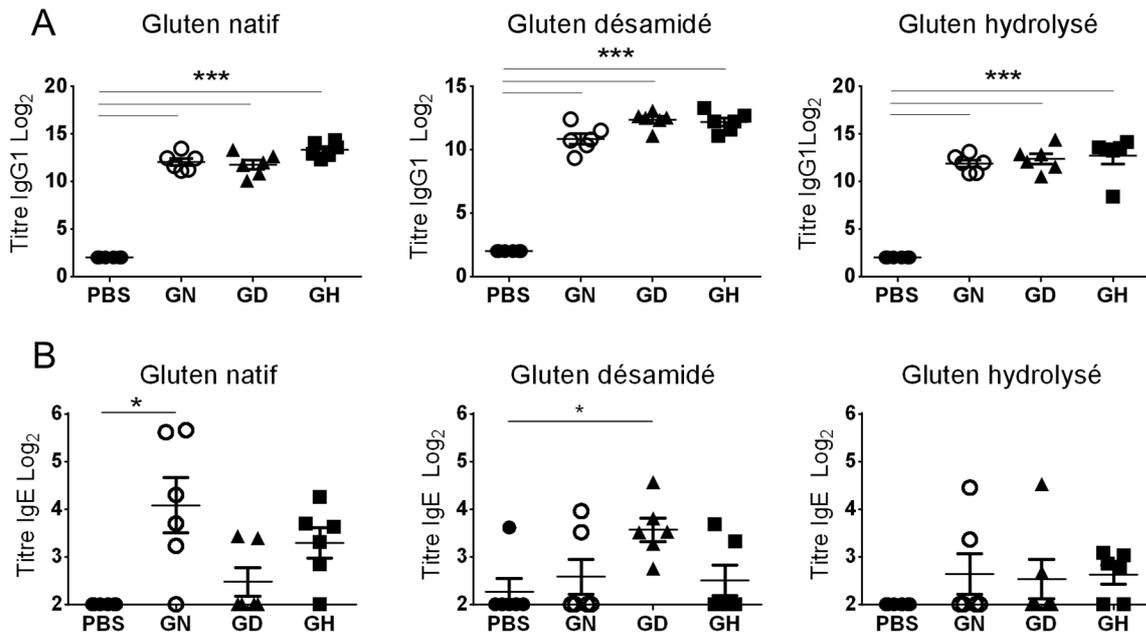
l'allergène avec lequel chaque rat a été sensibilisé. En effet, si le rat est bien sensibilisé par un allergène son injection induira une réponse inflammatoire provoquant la vasodilatation des vaisseaux sanguins de l'oreille. Comme nous le montrons dans la figure ci-dessous, chaque forme de gluten est capable de provoquer une réponse allergique car nous observons un épaissement significatif de l'oreille des rats sensibilisés avec les trois allergènes par rapport aux rats contrôles (PBS).



**Figure 31: Mesure de l'épaisseur de l'oreille après injection de l'allergène sensibilisant correspondant.** L'épaisseur de l'oreille est mesurée avant et après injection de l'allergène afin de calculer une différence. N= 6 souris par groupe \*\*\* $p < 0.001$

### 3.2) Les trois formes de gluten sont capables d'induire la production d'IgG1 et d'IgE spécifique

Dans l'objectif de comparer l'immunogénicité des différentes formes de gluten après sensibilisation, nous avons mesuré par ELISA les IgG1 spécifiques de chaque forme (Figure 32A). Chaque graphe représente l'ELISA spécifique d'une des formes de gluten (gluten natif, gluten désamidé et gluten hydrolysé) ; en abscisse se trouvent les quatre groupes de rats sensibilisés au gluten ou au PBS. Nous pouvons observer dans la figure A que chaque forme est capable d'induire une réponse immune spécifique comparé au contrôle. Nous avons mesuré une augmentation significative des IgG1 chez les rats sensibilisés par rapport aux contrôles pour les trois formes de gluten. Ainsi, peu importe l'allergène sensibilisant utilisé, les IgG1 produit par les rats sont capables de reconnaître les trois formes de gluten. Afin de mesurer le pouvoir sensibilisant de chaque forme de gluten, nous avons mesuré par ELISA les IgE spécifiques de chaque forme (Figure 32B). Une augmentation des IgE peut être observée chez les rats sensibilisés avec l'allergène coaté. Ainsi, chez les rats sensibilisés avec la forme native du gluten et le gluten désamidé, des IgE spécifiques sont produites et reconnaissent les épitopes des allergènes : leur niveau est significativement supérieur aux IgE des rats contrôles et des rats sensibilisés avec une autre forme que l'allergène coaté. Pour les rats sensibilisés avec le gluten hydrolysé, l'augmentation des IgE et plus difficile à mesurer : en effet le test ELISA est moins sensible pour cette forme-là.

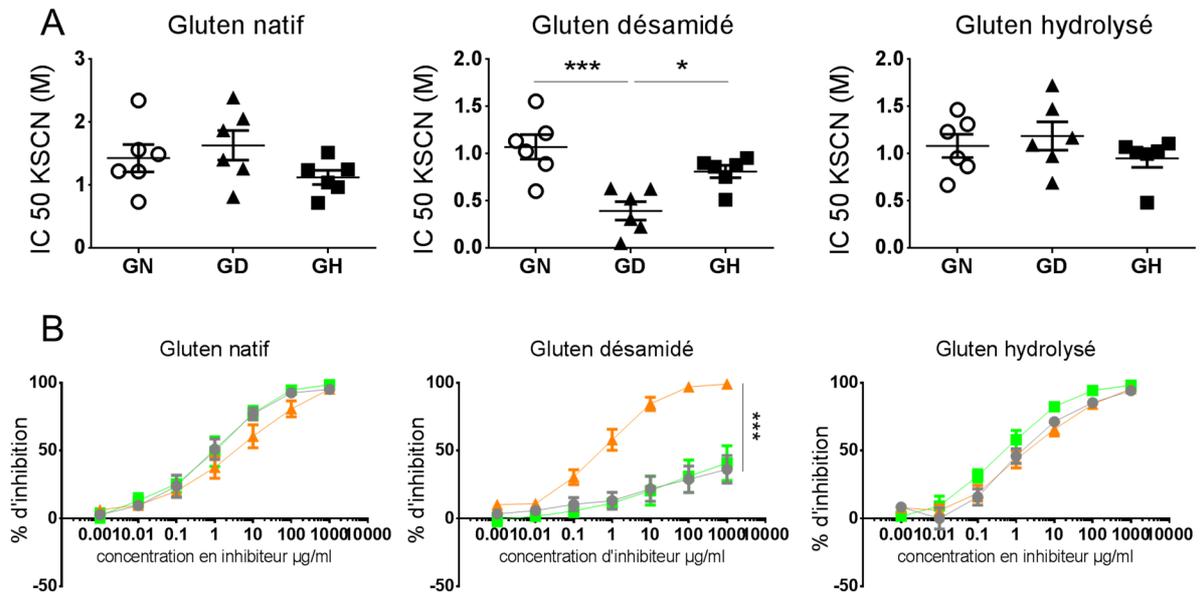


**Figure 32: Mesure des IgG1 (A) et des IgE (B) spécifiques des trois formes de gluten par ELISA. N= 6 souris par groupe, \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$**

### 3.3) La transformation du gluten par désamination entraîne la formation de nouveaux épitope

Afin de mesurer la force de la liaison entre les IgG1 et les trois formes de gluten, nous avons réalisé des tests d'avidité (Figure 33A). Chaque graphe correspond au test d'avidité pour chaque forme de gluten ; en abscisse se trouvent les quatre groupes de rats sensibilisés au gluten ou au PBS. Nous pouvons observer en figure A une différence d'avidité entre la forme gluten désamidé et les autres formes de gluten. Le test d'avidité avec la forme gluten désamidé montre qu'il faut une concentration plus faible d'inhibiteur chimique (KSCN) pour rompre la liaison entre les IgG1 et l'allergène. En effet, la concentration en KSCN nécessaire pour le test d'avidité avec le gluten désamidé est de 0.39M comparé à 1M et 0.8M pour le gluten natif et le gluten hydrolysé respectivement. Ce résultat montre ainsi que la liaison entre les IgG1 et le gluten désamidé est plus faible. Dans le but d'évaluer la capacité de chaque forme de gluten à inhiber la liaison entre les autres formes et leur IgG1 spécifiques, nous avons réalisé des tests d'inhibition (Figure 33B). Chaque graphe correspond au test d'inhibition d'une forme de gluten ; les différentes courbes correspondent à l'allergène utilisé en tant qu'inhibiteur. Comme nous pouvons l'observer dans la figure B, les résultats du test d'inhibition avec la forme gluten désamidé montre que les formes gluten natif et gluten hydrolysé ne sont pas capable d'inhiber la liaison entre le gluten désamidé et les IgG1 spécifiques. Dans les deux autres tests, nous

observons que toutes les formes de gluten sont capables d'inhiber la liaison entre les IgG1 et le gluten natif et la liaison entre les IgG1 et gluten hydrolysé par enzyme. Ainsi si la liaison IgG1/gluten désamidé ne peut pas être inhibée par les autres formes de gluten, nous pouvons en déduire que la désamidation a induit la création de nouveaux épitopes non reconnu par les IgG1 spécifiques des autres formes de gluten.



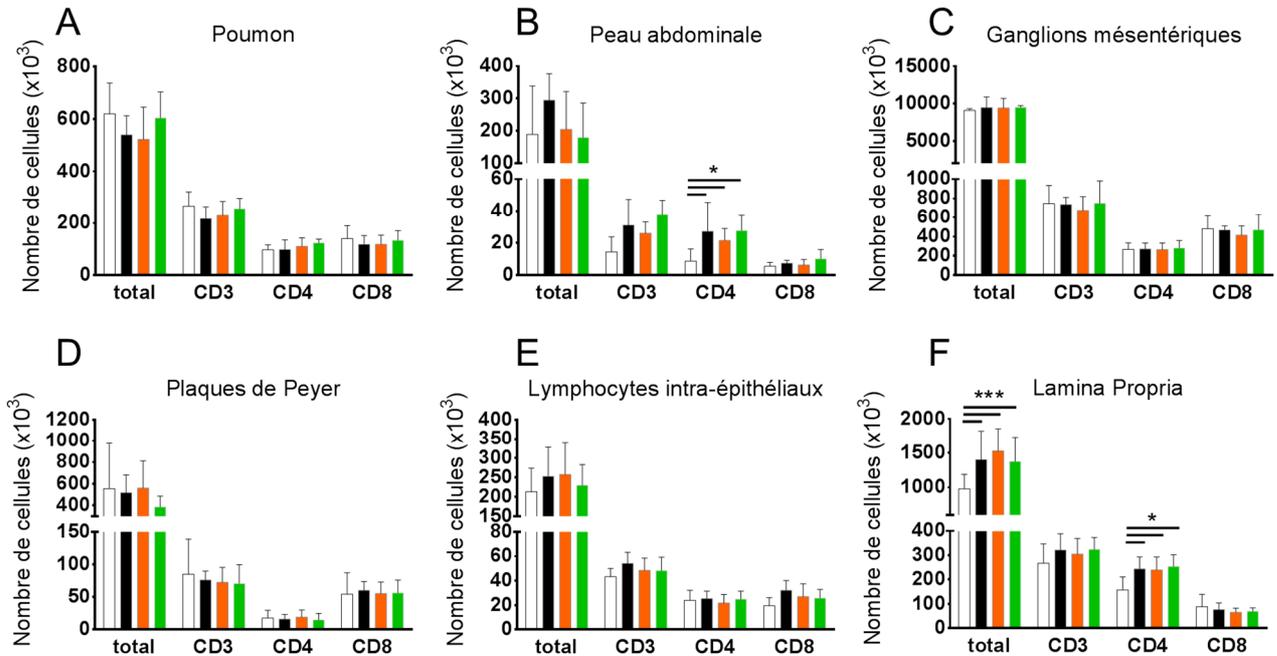
**Figure 33: Mesure de la force de la liaison IgG1/allergène par des tests d'avidité (A) et des tests d'inhibition (B)** Rond gris : gluten natif, triangle orange : gluten désamidé et carré vert : gluten hydrolysé par enzyme. N= 6 souris par groupe, \* $p < 0.05$  ; \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$

### 3.4) La sensibilisation cutanée induit une réponse allergique intestinale

Différents compartiments de l'intestin, les poumons ainsi que la peau ont été analysés en cytométrie en flux afin d'évaluer l'impact de la sensibilisation cutanée sur la réponse immunitaire de l'ensemble de l'organisme (Figure 34). La proportion des populations lymphocytaires T (CD4 et CD8) a été mesurée sur les poumons (A), la peau abdominale (B), les ganglions mésentériques (C), les plaques de Peyers (D) et le tissu intestinal (E et F) (lymphocytes intra-épithéliaux et lymphocytes de la lamina propria). Le nombre total de cellules et le nombre total de CD3, CD4 et CD8 est montré dans la figure ci-dessous. Nous n'observons aucune différence entre le groupe contrôle et les groupes de rats sensibilisés avec les différentes formes de gluten dans les ganglions mésentériques, les plaques de Peyer et les poumons. En revanche nous pouvons observer une augmentation significative du nombre de TCD4<sup>+</sup> dans la peau, qui reflète l'inflammation cutanée suivant la sensibilisation. Il est logique de penser que la sensibilisation au niveau abdominal a induit une réponse inflammatoire sur ce site. Par ailleurs nous pouvons observer une augmentation significative

## Résultats et discussion

du nombre total de cellules et du nombre de TCD4<sup>+</sup> chez les rats sensibilisés au gluten comparé au groupe contrôle, indépendamment de l'allergène utilisé, dans la lamina propria mais pas dans les IEL. Ces résultats suggèrent que la sensibilisation par voie cutanée est capable d'induire une inflammation locale au niveau de l'intestin. Cependant, pour chaque organe, nous ne retrouvons pas de différences entre les différents groupes de rats sensibilisés.



**Figure 34: Nombre de cellules totales, de lymphocytes TCD3<sup>+</sup>, TCD4<sup>+</sup> et TCD8<sup>+</sup> dans différents compartiments.** Un phénotypage des populations lymphocytaire T a été réalisé en cytométrie en flux sur les poumons (A), la peau (B), les ganglions mésentériques, (C), les plaques de Peyer (D), les lymphocytes intra-épithéliaux (E) et les lymphocytes de la lamina propria (F). Barre blanche : PBS, barre noire : gluten natif, barre orange : gluten désamidé, barre verte : gluten hydrolysé. N= 6 souris par groupe, \*p<0.05 ; \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001

## IV. Discussion et perspectives

Le modèle animal utilisé est un modèle mimant la marche atopique combinant un modèle d'allergie alimentaire au gluten de blé suivi d'un modèle d'asthme aigu aux acariens (HDM). Tout d'abord, le modèle d'asthme, bien caractérisé dans notre équipe (Thèse de J. Chesné, 2014) est un modèle d'inflammation mixte TH2/TH17 qui se rapproche au plus près de l'asthme allergique sévère des patients. En effet, l'originalité repose sur une sensibilisation percutanée par application d'HDM dans du DMSO sur l'oreille des souris. Cette sensibilisation percutanée vient renforcer l'inflammation mixte TH2/TH17 puisqu'il a été montré en 2007 qu'une sensibilisation cutanée oriente l'inflammation pulmonaire après challenge vers une réponse de type TH17 (He et al., 2007) . Par ailleurs, cette sensibilisation percutanée mime au plus près la réalité. Les patients asthmatiques présentant un asthme de type allergique sont généralement des patients atopiques qui peuvent avoir une peau altérée dès le plus jeune âge. Ils sont ainsi potentiellement sensibilisés à travers la barrière cutanée et non pas par voie nasale. En effet, l'hypothèse est émise depuis quelques années que la peau serait l'un des premiers sites de sensibilisation (Dharmage et al., 2014; du Toit et al., 2016) . Cette sensibilisation peut également conduire à l'apparition d'allergie alimentaire (Kelleher et al., 2016) . Le modèle d'asthme utilisé présente également une inflammation de type éosino-neutrophilique, ce qui se rapproche des asthmes allergiques sévères à infiltrat neutrophilique important (WENZEL et al., 1999) . Cet infiltrat est guidé par l'IL-17 et par plusieurs chimiokines dont l'IL-8 (CXCL8) qui attire les neutrophiles sur le site d'inflammation (Nembrini et al., 2009) . Le modèle d'asthme est précédé d'un modèle d'allergie alimentaire aux gliadines de blé. Cette association des deux types d'allergies permet de se rapprocher au plus près de la réalité des enfants atopiques. En effet, 50% des patients possédant un asthme de type allergique ont ou ont eu une autre forme d'allergie durant leur enfance (Wenzel, 2012) . Notre modèle est donc un vrai modèle de marche atopique puisqu'il prend en compte deux modèles complets d'allergie. Notre modèle d'allergie alimentaire est particulièrement robuste car la réponse inflammatoire intestinale persiste six semaines après l'induction de l'allergie comme nous l'avons vu dans les résultats. A l'inverse, la plupart des modèles de marche atopique décrits dans la littérature sont restreints à une sensibilisation alimentaire ou cutanée suivi de challenge respiratoire par voie intra-nasale. Si ces modèles suffisent à induire une inflammation mixte ou aggravée dans certains cas, ils ne miment pas la réalité de l'évolution de l'allergie que l'on retrouve chez les patients. Un des premiers modèles de marche atopique est celui de Spergel, constitué de trois séries de sensibilisations cutanées à l'ovalbumine par patch abdominaux et d'un challenge intra-nasal à l'OVA en fin de protocole (J M Spergel et al., 1998) . Ce modèle est le plus utilisé pour mimer une double sensibilisation

cutanée/pulmonaire (He et al., 2009) Il est parfois décliné par des injections en intra-péritonéal d'ovalbumine afin de mimer une sensibilisation systémique (Blumchen et al., 2006; Z. Zhu et al., 2011) ou avec un challenge intra-gastrique afin de mimer une double sensibilisation cutanée/intestinale (Hongwei Han et al., 2014). Des modèles plus élaborés ont été développés, combinant les trois types de voies. Ainsi, dans un premier modèle de marche atopique, les souris sont sensibilisées par injection intra-péritonéale d'ovalbumine puis sont challengées plusieurs fois par injections intra-gastriques d'OVA suivies d'injections intranasales d'HDM. Les résultats montrent une aggravation des réponses inflammatoires pulmonaires après allergie alimentaire (Brandt et al., 2006) . Des résultats similaires ont été montrés dans un deuxième modèle dans lequel les souris sont sensibilisées par voie intra-gastrique à la cacahuète puis challengées par voie intra-nasale à l'HDM (Utsch et al., 2017) . Dans notre modèle nous avons préféré employer l'HDM en tant qu'allergène respiratoire car c'est le plus pertinent par rapport aux patients. Par ailleurs nous avons choisi de ne pas utiliser de l'ovalbumine afin d'éliminer tout biais sur les réponses inflammatoires pulmonaires et/ou intestinales. Nous avons donc opté pour un allergène alimentaire moins répandu mais très controversé en alimentation : le gluten. Le gluten est très largement utilisé dans l'industrie agro-alimentaire en tant qu'agent texturant. En effet, grâce à ses propriétés viscoélastiques et son fort apport protéique, le gluten permet d'améliorer la texture des produits alimentaires et d'augmenter le taux de protéine (Day, Augustin, Batey, & Wrigley, 2006) . Cependant, le gluten est également incriminé dans plusieurs pathologies. Outre la maladie cœliaque dont il est la cause principale, le gluten et particulièrement les formes désamidées de ses protéines (gliadine) est mis en cause dans certaines allergies alimentaires et/ou cutanées (Denery & Papini et al., 2012) . La désamidation est utilisée par les industriels afin d'augmenter la solubilité du gluten qui est un composé insoluble dans les matrices alimentaires les plus courantes. Ainsi sa désamidation permet une incorporation plus facile dans des produits alimentaires comme la viande par exemple ou dans des produits à visée cosmétiques (crèmes et savons). Il a été plusieurs fois reporté que le gluten désamidé pouvait déclencher des réactions allergiques après application cutanée, même chez des personnes normalement tolérantes (Chinuki et al., 2013; Laurière et al., 2006; Varjonen et al., 2000) .

Néanmoins, notre modèle possède des limites difficilement évitables. Par sa construction, ce modèle est très long et très lourd pour les souris et a conduit à une mortalité bien plus élevée chez les souris Balb/c subissant le protocole dans son ensemble (FA+RA) par rapport aux souris contrôles ou aux souris ne subissant qu'une seule partie du modèle. En effet, au cours de l'année 2015/2016, sur le nombre total de souris décédées pendant le protocole de marche atopique, 68% étaient des souris appartenant au groupe FA+RA ; généralement décédées au cours des sensibilisations ou des challenges à l'acarien ou sacrifiées à cause d'une trop

grande perte de poids. Nous avons ainsi choisi de continuer le modèle de marche atopique sur des souris C57BL/6, plus résistantes. Par ailleurs, du fait de la disponibilité des souris CCR9KO uniquement sous une souche C57BL/6, nous avons été obligé de choisir cette souche là en tant que contrôle sauvage. Cependant, l'induction de l'allergie s'est avérée plus compliquée et plus longue que chez des souris balb/c, pro-TH2.

Chez l'humain, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, il est connu que la présence d'une sensibilisation alimentaire augmente le taux de morbidité de l'asthme. Mais il a également été montré que l'allergie alimentaire constitue un facteur de risque non négligeable sur le taux de mortalité de l'asthme. Une étude a analysé l'effet de l'allergie alimentaire en tant que facteur de risque d'une crise d'asthme mettant en danger la vie du patient. Les auteurs ont pris comme référence des patients admis en hôpital ayant été contraint à une ventilation mécanique après une exacerbation. Les résultats montrent que l'allergie alimentaire est un facteur de risque significatif : 52.6% des patients admis pour une exacerbation avaient des antécédent d'allergie alimentaire contre 10.5% des patients contrôles ( $P=0.006$ ) (Roberts, Patel, Levi-Schaffer, Habibi, & Lack, 2003) . Une autre étude a analysé l'effet de la sensibilisation alimentaire sur les hospitalisations d'enfants asthmatiques. Les auteurs observent que les enfants sensibilisés à un allergène alimentaire ont plus de risque d'être admis en hôpital pour leur asthme ( $P<0.01$ ), et requièrent une médication plus importante en corticostéroïde ( $P=0.025$ ) (Wang, Visness, & Sampson, 2005) . Ainsi la présence d'une sensibilisation alimentaire chez une population asthmatique augmente le risque d'hospitalisations. Enfin une dernière étude analysant le profil d'enfants allergiques hospitalisés pour anaphylaxie alimentaire, a montré que les patients avaient plus de risque d'être admis en hôpital s'il était aussi diagnostiqué pour un asthme (OR 7.4, IC 5.8-9.3) (Parlaman, Oron, Uspal, DeJong, & Tieder, 2016) .

Parmi les nombreux récepteurs de chimiokines existant, nous avons décidé de nous intéresser tout particulièrement à CCR9, car, avec son ligand CCL25, ils représentent l'unique couple permettant la migration des cellules inflammatoires vers l'intestin. Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, CCR9 a tout d'abord été catégorisé comme étant un récepteur de type homéostatique. Cependant, aujourd'hui cette classification est dépassée, il a été montré que CCR9 avait aussi un rôle dans l'inflammation. Une des premières études analysant le rôle de CCR9 dans les mécanismes fondamentaux de l'inflammation a montré qu'il était indispensable dans l'induction de la tolérance orale chez les souris (Cassani et al., 2011) . En effet, les auteurs observent qu'il est impossible d'induire une tolérance orale chez les souris déficientes pour CCR9,  $\alpha 4\beta 7$  ou MadCam1. Par ailleurs comme il a été montré auparavant, cette induction nécessite la voie de l'acide rétinoïque puisque la tolérance orale est également impossible à induire chez des souris dépourvues de vitamine A (Iwata et al., 2004) . Ainsi, premièrement,

CCR9 a été associé à des réponses de type régulatrices. Plus récemment il a été montré que les cellules dendritiques pouvaient, par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque, stimuler l'expression de CCR9 et  $\alpha 4\beta 7$  chez des lymphocytes T sécréteurs d'IL-10, possédant un phénotype de type régulateur (Bakdash et al., 2015) . Dans le sang humain, il a été montré que les cellules lymphocytaires circulantes mémoires CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> possédaient un phénotype de type TH1 ou Tréglulateur sécréteur d'IFN- $\gamma$  ou IL-10 respectivement (K A Papadakis et al., 2000) . Cependant, comme nous l'avons aussi montré, CCR9 serait également impliqué dans des réponses inflammatoires. Tout d'abord, une étude soulève des résultats contradictoires à ceux énoncés précédemment en montrant que l'inhibition de CCR9 n'empêche pas l'induction de la tolérance orale mais qu'il s'agit d'une question de dose d'antigène introduite chez la souris (Eksteen & Adams, 2010; M. J. Walters et al., 2010) . Dans notre modèle d'allergie alimentaire au gluten, nous observons une augmentation du nombre et de la fréquence des lymphocytes T exprimant CCR9 chez les souris allergiques par rapport aux souris contrôles. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent une augmentation de l'expression de CCR9 chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Rivera-Nieves et al., 2006; Wermers, McNamee, Wurbel, Jedlicka, & Rivera-Nieves, 2011) . Par ailleurs nos résultats indiquent que cette expression est retrouvée en majorité sur des lymphocytes tissulaires, intra-épithéliaux et de la lamina propria. Ainsi CCR9 agirait probablement directement au niveau local. Cependant, nos résultats sur les souris KO sont contradictoires. Nous observons une diminution de l'inflammation pulmonaire post modèle de marche atopique cependant les souris CCR9<sup>-/-</sup> ne semblent pas présenter de différences en terme d'inflammation systémique après challenge alimentaire. Il aurait été intéressant de regarder l'inflammation au niveau des lymphocytes intestinaux tissulaires. Les résultats sur les souris KO pour des récepteurs de chimiokines sont par ailleurs très contradictoires. Par exemple s'il est aujourd'hui admis que CCR4 est impliqué dans le recrutement des lymphocytes dans l'asthme, le blocage de CCR4 par un anticorps ne montre aucune diminution de l'inflammation des voies aériennes (Conroy et al. 2003). Dans une autre étude, seulement l'hyperréactivité bronchique et non le remodelage semble être atténué chez les souris CCR4<sup>-/-</sup> (Shuch et al. 2002). L'absence de CCR8 dans un modèle murin d'asthme à l'ovalbumine ne semble pas non plus avoir un effet sur l'inflammation des voies aériennes (Chung et al. 2003). Par ailleurs, au sein des modèle murins de colite, le rôle de CCR9 n'est pas clair car certaines études suggèrent un rôle inflammatoire de CCR9 et d'autres un rôle plus nuancé. Ainsi dans un modèle murin de colite induite au DSS, les souris déficientes pour le gène de CCR9 sont plus susceptibles de développer une inflammation par rapport aux souris sauvages, caractérisée par un taux de mortalité plus élevé, un score clinique augmenté et une rémission plus tardive (Wurbel et al. 2011). Ces données sont en corrélation avec nos

résultats car nous ne pouvons conclure quant au rôle de CCR9 dans notre modèle d'allergie alimentaire seule sur les souris CCR9<sup>-/-</sup>.

Finalement, si l'étude de CCR9 dans les réponses inflammatoires et particulièrement dans des modèles de KO soulève des résultats si contradictoires c'est probablement à cause de la redondance du système chimiokines/récepteurs. En effet, comme nous l'avons décrit, ce système est très redondant et un même récepteur peut fixer plusieurs chimiokines tandis qu'une même chimiokine peut se fixer à plusieurs récepteurs. Même si CCR9 est le seul récepteur de chimiokine décrit aujourd'hui dans la migration vers l'intestin, il n'est pas exclu qu'il en existe d'autres ou qu'un autre récepteur déjà décrit soit aussi impliqué dans la migration intestinale. Dans notre étude sur le modèle de marche atopique, nous avons mis en évidence l'effet de CCR9 sur la balance TH17/Treg et le caractère essentiel de CCR9 dans l'inflammation pulmonaire après allergie alimentaire. Dans notre modèle de marche atopique sur les souris CCR9<sup>-/-</sup>, les souris présentent un rétablissement de la balance Treg/TH17 avec une augmentation des Régulateurs CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> dans les poumons mais pas de modification des TH17. De façon similaire, une étude montre une augmentation des Treg Foxp3<sup>+</sup> dans la rate et les ganglions mésentériques de souris CCR9<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, les souris ne semblent pas présenter de changement de la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-17 par les cellules T CD4<sup>+</sup> (Evans-Marín et al., 2015) . Enfin, cette étude montre que l'interaction entre CCL25 et CCR9 inhibe le développement des Treg Foxp3<sup>+</sup>. En effet l'ajout *in vitro* de CCL25 à des cultures cellulaires de T CD4<sup>+</sup> en présence de TGF- $\beta$ , inhibe la différenciation en Treg (Evans-Marín et al., 2015) . Les auteurs suggèrent que cette inhibition du développement des Treg par CCR9 serait à l'origine de l'inflammation intestinale dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin dans lesquelles on retrouve une augmentation de CCR9. Dans des PBMC de patients atteints de conjonctivite allergique, il a été démontré qu'il existait un déséquilibre entre les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> et les cellules CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> et CCR9<sup>+</sup>. Après stimulation par *Der p*, les auteurs observent une augmentation des cellules T CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> et CCR9<sup>+</sup> et une augmentation de la production d'IL-5, IL-6 et IL-8. Ces résultats suggèrent un rôle inflammatoire des cellules CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> et CCR9<sup>+</sup> dans la réponse allergique (Galicia-Carreón et al., 2013) . En corrélation avec nos résultats, une étude faite sur un modèle murin d'inflammation allergique des voies aériennes à l'OVA, montre que le recrutement des cellules immunitaires dans les lavages broncho-alvéolaire était diminué chez des souris déficientes pour le gène de CCR9 (López-Pacheco, Soldevila, Pont, Hernández-Pando, & García-Zepeda, 2016) . Par ailleurs la sécrétion d'IL-4 et d'IL-5, caractérisant une réponse de type TH2 semble inchangée, ce que l'on retrouve également dans notre modèle. Particulièrement, CCR9 semble essentiel dans le recrutement des éosinophiles puisque les auteurs observent une diminution de CCR3 et CCL11 chez les souris KO (López-Pacheco et al., 2016) . Cette étude

suggère un rôle important de CCR9 dans les phases précoces de la réponse inflammatoires allergique tout comme nous avons observé le rôle indispensable de CCR9 dans l'établissement de l'inflammation pulmonaire après allergie alimentaire. Enfin des études ont caractérisé le rôle inflammatoire de CCR9 à travers son expression par les lymphocytes  $T\gamma\delta$ . En effet, les lymphocytes  $T\gamma\delta$  se localisent préférentiellement dans les sites muqueux et les tissus et font partie de ce que l'on appelle lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) au sein de l'intestin (Hayday, 2000) . Les lymphocytes  $T\gamma\delta$  expriment également  $\alpha 4\beta 7$  (Nakajima, Roswit, Look, & Holtzman, 1995) . La délétion de CCR9 sur des souris induit une diminution des lymphocytes  $T\gamma\delta$  intra-épithéliaux (M. A. Wurbel et al., 2001) . Il est ainsi raisonnable de penser que les  $T\gamma\delta$  de l'intestin pourraient avoir un rôle dans les réponses inflammatoires intestinales. Dans un modèle d'inflammation allergique à l'OVA, une étude a montré que CCL25 permettait la migration des lymphocytes  $T\gamma\delta$   $IL17^+$  exprimant  $\alpha 4\beta 7$ . Le blocage de  $\alpha 4\beta 7$  ou CCL25 inhibe la migration de ces cellules  $T\gamma\delta$   $IL17^+$  mais pas celle des  $T\alpha\beta$  (Costa et al., 2012) . Le couple CCL25/CCR9 ne posséderait donc pas qu'un effet homéostatique mais serait également impliqué dans des réponses inflammatoires comme nous l'avons décrit dans notre modèle murin de marche atopique.

Nos résultats et d'autres travaux (D. Ruane et al., 2013) montrent clairement qu'une inflammation engendrée au niveau d'un site donné peut induire une réponse sur un autre site. Au sein de notre modèle nous avons montré que l'inflammation allergique intestinale pouvait aggraver l'inflammation pulmonaire et ce grâce à CCR9. Ces résultats sont en corrélation avec le concept de Bienenstock qui postule que les différents sites muqueux du système immunitaire peuvent interagir entre eux (Bienenstock et al., 1978) . L'allergie peut ainsi être vue comme une maladie d'ensemble et non pas comme une maladie d'organe. Suivant ce principe nous avons voulu poursuivre nos travaux sur la marche atopique en collaborant avec une équipe du National Food Institute au Danemark qui a développé un modèle d'allergie alimentaire par sensibilisations cutanées. Ce modèle est pertinent car nous savons qu'une sensibilisation cutanée à travers une peau altérée peut induire une allergie alimentaire par la suite chez les enfants (Kelleher et al., 2016) . Nous avons ainsi analysé l'inflammation cutanée, pulmonaire et intestinale chez des rats sensibilisés à trois formes de gluten par application abdominale de l'allergène. Nous avons testé trois différentes formes de gluten : du gluten natif non modifié, du gluten hydrolysé par voie acide (gluten désamidé) et du gluten hydrolysé par voie enzymatique (gluten hydrolysé). Ces trois formes ont été choisies car il a été montré qu'une protéine transformée par digestion, hydrolyse ou chauffage pouvait avoir un pouvoir sensibilisant différent (Bøgh, Barkholt, Rigby, Mills, & Madsen, 2012; M. Claude et al., 2016; Mathilde Claude et al., 2017) . L'hydrolyse a été choisie car il a été montré chez les souris que le gluten hydrolysé possède un pouvoir sensibilisant plus important que celui du gluten natif

(Adachi, Nakamura, Sakai, Fukutomi, & Teshima, 2012) . Par ailleurs, la modification du gluten par désamidation peut entraîner une réponse allergique même chez des patients tolérants au gluten (Denery-Papini et al., 2012) . Des cas d'allergie au gluten désamidé ont ainsi été reportés après application de produits cosmétiques en contenant (Chinuki et al., 2013; Laurière et al., 2006; Varjonen et al., 2000) . L'hydrolyse et la désamidation conduisent à la formation de petits peptides et peut également causer l'agrégation de certains peptides. Ces nouveaux composés créés peuvent modifier le pouvoir sensibilisant de l'allergène. Nous avons ainsi montré que si chaque forme de gluten était capable d'induire la production d'IgG1 et d'IgE spécifiques dans le sérum des rats, l'hydrolyse a un impact sur la force de liaison entre les IgG1 et l'allergène. En effet, la mesure de l'avidité permet d'évaluer la force de la liaison et renseigne sur la conformation des épitopes nouvellement créés. Nous observons pour le gluten désamidé qu'il faut moins d'inhibiteur chimique (KSCN) pour rompre la liaison formée avec les IgG1. Ainsi, la liaison IgG1/ gluten désamidé est plus faible. Par ailleurs, les expériences d'inhibition par un autre allergène renseignent sur l'épitope formé mais également sur sa clonalité. Les résultats montrent que la forme gluten désamidé est moins inhibée par les deux autres formes de gluten, ainsi, nous pouvons conclure que la désamidation a permis la création de nouveaux épitopes différents qui ne sont pas reconnus et donc pas inhibés par les deux autres formes de gluten. Concernant la réponse allergique au niveau intestinal, les trois formes de gluten sont apparemment capables d'induire une réponse lymphocytaire CD4<sup>+</sup> au niveau tissulaire. Nous observons une augmentation des lymphocytes TCD4<sup>+</sup> dans la lamina propria qui concorde avec une inflammation de type allergie alimentaire. En effet, nous retrouvons une augmentation du nombre de lymphocytes tissulaires dans notre modèle d'allergie alimentaire au gluten. Notre modèle de sensibilisation par voie cutanée a donc bien conduit à une réponse allergique au niveau intestinal. Dans un modèle de sensibilisation cutanée par application abdominale d'extrait de cacahuète suivi de challenges oraux à l' $\alpha$ -lactalbumine (ALA) ou à l'OVA, une équipe a montré que la sensibilisation cutanée induisait une réponse TH2 et une activation des cellules dendritiques des ganglions lymphatiques drainant de la peau suffisante pour générer une réponse de type anaphylaxie (Tordesillas et al., 2014) . Dans une autre étude, les auteurs observent que la sensibilisation cutanée suivie d'un challenge oral à l'OVA est suffisante pour induire une anaphylaxie caractérisée par une augmentation des IgE dans le sérum, une baisse significative de la température et une augmentation de MCP-1 (Bartnikas et al., 2013) . Par ailleurs cette sensibilisation cutanée induit une expansion des macrophages au sein du jéjunum, reflétant une inflammation intestinale. Ces effets sont IgE-dépendant car ils ne sont plus observés chez des souris IgE<sup>-/-</sup> . Ainsi, une sensibilisation cutanée à un allergène alimentaire est suffisante pour développer l'allergie alimentaire chez la souris (Bartnikas et al., 2013) . Ces données de la littérature sont en corrélation avec nos résultats sur le modèle d'allergie alimentaire par sensibilisation

cutanée chez le rat. En effet, après sensibilisation par patch cutané avec le gluten, nous retrouvons une vasodilatation de l'oreille des rats, un niveau élevé d'IgE dans le sérum et surtout une augmentation du nombre de lymphocytes TCD4<sup>+</sup> dans la lamina propria. La sensibilisation cutanée est donc suffisante pour induire une réponse immunitaire au niveau intestinal, même sans provocation orale. Il est probable que les cellules sensibilisées au niveau de la peau aient migré vers l'intestin afin de déclencher une réponse allergique. Il aurait donc été intéressant d'analyser l'expression de différents récepteurs de chimiokines dont CCR9. Si l'effet de la sensibilisation cutanée sur le développement de l'allergie alimentaire est souvent observé dans des modèles de souris, le mécanisme régulant l'axe peau-intestin est encore peu clair. Une étude récente a soulevé l'importance des basophiles dans la réponse allergique (Hussain et al., 2017) . En effet, dans un modèle d'allergie par sensibilisations cutanées à l'OVA suivies de challenges intra-gastriques au même allergène, les auteurs observent une réponse prédominante basophile et TH2 dans la peau. Par ailleurs, en utilisant des souris KO conditionnelles pour l'IL-4 dans les basophiles, ils ont montré que la production de l'IL-4 par les basophiles était nécessaire pour induire une polarisation TH2 et l'induction de l'allergie alimentaire IgE-médiée caractérisée par un score clinique plus élevé, une augmentation des IgE et une augmentation de MCP-1. Les auteurs suggèrent ainsi que l'IL-4 produite par les basophiles cutanés favoriserait la progression de l'allergie de la peau vers le tractus gastro-intestinal (Hussain et al., 2017) . Concernant l'implication de la migration cellulaire dans les mécanismes de la marche atopique peau/intestin, une étude a montré le rôle de CCR4, un des récepteurs de chimiokine permettant la domiciliation cellulaire vers la peau, dans l'inflammation cutanée après sensibilisation intestinale (Oyoshi et al., 2011) . Les souris CCR4<sup>-/-</sup> sensibilisées par voie orale et challengées par voie cutanée ne présentent pas d'inflammation cutanée contrairement aux souris sauvages qui présentent une augmentation de l'infiltrat cellulaire et un épaissement de l'épiderme. Par ailleurs des transferts adoptifs similaires à notre étude montrent que le transfert de TCD4<sup>+</sup>α4β7<sup>+</sup> (homing intestinal) provenant de souris sensibilisées par voie orale dans des souris naïves challengées par voie cutanée ultérieurement induit une réponse inflammatoire au niveau de la peau ; cette réponse est perdue si les lymphocytes TCD4<sup>+</sup>α4β7<sup>+</sup> proviennent de souris CCR4<sup>-/-</sup>. Par ailleurs, la réponse est également inhibée si les souris sont dépourvues de ganglions lymphatiques. Les auteurs suggèrent ainsi que les lymphocytes TCD4<sup>+</sup>α4β7<sup>+</sup> spécifiques d'une réponse orale peuvent être reprogrammés au sein des ganglions lymphatiques afin de migrer sous l'influence de CCR4 et d'induire une réponse inflammatoire au niveau de la peau (Oyoshi et al., 2011) . Ces données sont en corrélation avec nos résultats ; en effet nous avons démontré que l'inflammation pulmonaire était abrogée si les lymphocytes TCD4<sup>+</sup> sensibilisés par l'allergie alimentaire transférés dans des souris naïves, provenaient de souris CCR9<sup>-/-</sup>. Ces lymphocytes seraient donc potentiellement capables d'être reprogrammés dans les ganglions

lymphatiques afin de migrer vers les poumons et de provoquer une réponse inflammatoire pulmonaire. Ces données renforcent donc l'hypothèse selon laquelle l'allergie est une maladie d'ensemble ; il serait donc pertinent de continuer à développer l'étude de l'axe intestin/poumon ou l'axe peau/intestin.

En perspective de ces conclusions, nous aimerions approfondir notre modèle de marche atopique en élaborant des modèles murins d'allergie cutanée/allergie respiratoire et allergie cutanée/allergie alimentaire. Ces modèles nous permettraient d'analyser le rôle d'autres récepteurs de chimiokines, notamment ceux impliqués dans la domiciliation cutanée. Les récepteurs CCR4, CCR8 et CCR10 ainsi que leurs ligands respectifs CCL17 et 22, CCL1 et 8 et CCL27 et 28 sont en effet impliqués dans les réponses immunitaires de la peau (Castan, Magnan, & Bouchaud, 2017) . Les récepteurs de chimiokines pourraient ainsi être analysés par cytométrie en flux sur les cellules immunitaires provenant de la peau, de l'intestin ou des poumons. Concernant les ligands de ces récepteurs, nous aimerions développer la culture primaire de cellules épithéliales intestinales et pulmonaires afin de pouvoir doser la sécrétion des chimiokines par les cellules épithéliales dans le surnageant par ELISA.

Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste de CCR9 serait un bon moyen de valider son rôle dans notre modèle de marche atopique. L'antagoniste de CCR9 (Vercirnon, Chemocentryx-GSK), donné par voie orale a été testé dans plusieurs essais cliniques sur des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. Notre objectif serait dans un premier temps de tester l'antagoniste sous forme d'injections dans le modèle murin, entre l'allergie alimentaire et le début du modèle d'asthme aux acariens.

Les récents essais cliniques avec supplémentation en pré ou probiotiques se révélant concluant, il est pertinent de se demander si le microbiote intestinal a un rôle important non seulement dans l'allergie alimentaire mais dans toutes les formes d'allergie. Que ce soit dans des études sur des souris ou sur des cohortes de patients, il paraît de plus en plus clair que le microbiote joue un rôle dans l'allergie. Selon la théorie de l'hypothèse hygiéniste, la composition et la colonisation du microbiote ainsi que le contact avec une certaine diversité microbienne influencerait très précocement le développement du système immunitaire de l'enfant. On sait par exemple aujourd'hui que l'accouchement par césarienne augmente le risque du développement d'allergies chez l'enfant (Papathoma, Triga, Fouzas, & Dimitriou, 2016) . Contrairement à l'accouchement par voie basse, il favorise le contact avec les bactéries cutanées de la mère et non vaginales. Chez la souris il a été montré que les souris germ-free possédait un système immunitaire immature ; en effet le système immunitaire associé au tube digestif dont les plaques de Peyer n'est pas fonctionnel voire absent (Furrie, Turner, & Strobel, 1994) . De plus, l'induction de la tolérance orale est difficile chez les souris élevées sous

atmosphère stérile (Sudo et al., 1997) , elles présentent en effet une réduction du nombre de Trégulateur ou une réduction de la sécrétion d'IL-10 (Geuking et al., 2011) . Il a également été montré que l'exposition périnatale aux antibiotiques altérait la composition du microbiote intestinal et favorisait la sensibilisation à des allergènes alimentaires (Stefka et al., 2014) . Chez l'homme également, plusieurs études soulèvent une corrélation entre allergie et dysbiose du microbiote intestinal. Une étude menée sur 166 enfants a ainsi montré que la richesse du microbiote intestinal mais non sa diversité était liée à une diminution significative de la sensibilisation alimentaire (Azad et al., 2015) . Chez des enfants allergiques au lait âgés de 3 à 6 mois, une étude a comparé la composition de leur microbiote à l'âge de 8 ans. Les auteurs observent que les enfants dont l'allergie a disparu à 8 ans possèdent un microbiote dont les phyla les plus importants sont les Firmicutes et Clostridia ; au contraire chez les enfants dont l'allergie au lait est toujours présente, les auteurs constatent une proportion plus importante de Bacteroidetes et de Enterobacter (Bunyavanich et al., 2016) . Chez la souris également, une dysbiose du microbiote serait à l'origine des allergies ou au contraire de leur protection. Des articles montrent en effet que la protection de l'allergie alimentaire est associée avec un phénotype particulier du microbiote intestinal (Diesner et al., 2016; Rivas et al., 2012) . Concernant l'asthme, une étude montre que la supplémentation en prébiotiques peut influencer la composition du microbiote intestinal et impacter la sévérité de l'asthme (Trompette et al., 2014) . Au vue de ces résultats, nous aimerions élaborer un modèle de suppression du microbiote intestinal par antibiotique (Reikvam et al., 2011) . Le microbiote intestinal serait ainsi supprimé après induction de l'allergie alimentaire par gavage avec différents antibiotiques et anti-fongiques ; l'objectif serait d'analyser si sa suppression a un impact sur la survenue de l'asthme après induction de l'allergie alimentaire.

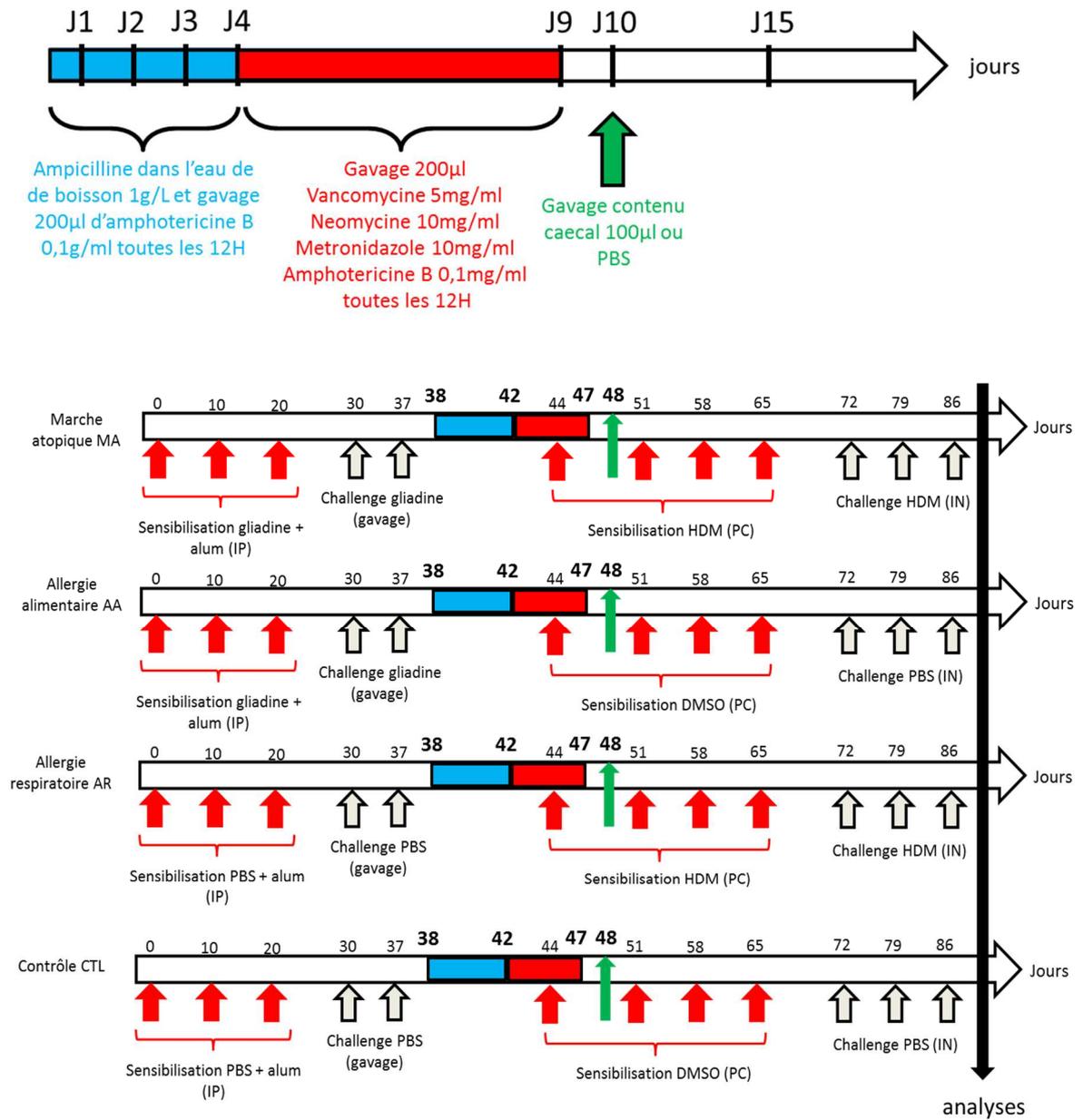


Figure 35: Protocole de délétion du microbiote intestinal par antibiotiques

En résumé, notre étude sur la marche atopique, et particulièrement les données sur CCR9 renforcent l'importance de l'axe intestin/poumon et l'hypothèse selon laquelle l'allergie est une maladie de l'ensemble de l'organisme et non une maladie d'organe. Le rôle clé que jouent les chimiokines et leurs récepteurs dans le mécanisme de la réponse immune a permis le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'antagoniste des récepteurs ou de neutraligands. Même si les différents essais cliniques notamment avec l'anti-CCR9 ne se sont pas avérés concluants sur des patients atteints de maladie inflammatoires de l'intestin, il serait intéressant d'analyser l'effet d'un antagoniste de CCR9 dans l'allergie et/ou dans l'asthme. Devant l'augmentation quasi épidémique de l'allergie, il est aujourd'hui nécessaire de continuer à en comprendre les mécanismes immunologiques afin de mettre en évidence de nouveaux marqueurs prédictifs.

# Annexes

Article 1: Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevent food allergy and promotes tolerance in offspring mice

Bouchaud G\*, Castan L\*, Chesne J, Braza F, Aubert P, Neunlist M, Magnan A, Bodinier M.  
Allergy, 2016

## Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice

G. Bouchaud<sup>1,\*</sup>, L. Castan<sup>1,2,3,4,\*</sup>, J. Chesne<sup>1,2,3,5</sup>, F. Braza<sup>1,2,3,5</sup>, P. Aubert<sup>3,5,7</sup>, M. Neunlist<sup>3,5,7</sup>, A. Magnan<sup>2,3,4,6,7</sup> & M. Bodinier<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UR1268 BIA, INRA; <sup>2</sup>UMR1087, l'institut du thorax, INSERM; <sup>3</sup>UMR6291, CNRS; <sup>4</sup>Universite de Nantes; <sup>5</sup>UMR913, Institut des Maladies de l'Appareil Digestif (IMAD), Faculte de Medecine, INSERM; <sup>6</sup>l'institut du thorax, Service de Pneumologie, CHU de Nantes; <sup>7</sup>DHU2020 me decine personnalisee des maladies chroniques, Nantes, France

To cite this article: Bouchaud G, Castan L, Chesne J, Braza F, Aubert P, Neunlist M, Magnan A, Bodinier M. Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy* 2016; 71: 68–76

### Keywords

gut; immunity; microbiota; symptoms; wheat.

### Correspondence

Dr. Marie Bodinier, INRA, UR1268 BIA, rue de la geraudie re, BP 71627, F-44316 Nantes, France.

Tel.: +33 240675035

Fax: +33 240675025

E-mail: [marie.bodinier@nantes.inra.fr](mailto:marie.bodinier@nantes.inra.fr)

\*These authors contributed equally to the work.

Accepted for publication 25 September 2015

DOI:10.1111/all.12777

Edited by: Hans-Uwe Simon

### Abstract

**Background:** Food allergies affect 4–8% of children and are constantly on the rise, thus making allergies a timely issue. Most importantly, prevention strategies are nonexistent, and current therapeutic strategies have limited efficacy and need to be improved. One alternative to prevent or reduce allergies, particularly during infancy, could consist of modulating maternal immunity and microbiota using nondigestible food ingredients, such as prebiotics. For this purpose, we studied the preventive effects of prebiotics in Balb/c mothers during pregnancy and breastfeeding on food allergy development in offspring mice.

**Methods:** After weaning, the offspring from mothers that were exposed to GOS/inulin mixture or fed a control diet were intraperitoneally sensitized to wheat proteins to induce a systemic allergic response and orally exposed to the same allergen. Immunological, physiological, and microbial parameters were analyzed.

**Results:** GOS/inulin mixture diet modified the microbiota of mothers and their offspring. Offspring from mothers that received GOS/inulin prebiotics were protected against food allergies and displayed lower clinical scores, specifically of IgE and histamine levels, compared to offspring from mothers fed a control diet. Moreover, GOS/inulin supplementation for the mother resulted in stronger intestinal permeability in the offspring. Enhancement of the regulatory response to allergic inflammation and changes in the Th2/Th1 balance toward a dampened Th2 response were observed in mice from GOS/inulin mixture-exposed mothers.

**Conclusion:** The treatment of pregnant and lactating mice with nondigestible GOS/inulin prebiotics promotes a long-term protective effect against food allergies in the offspring.

### Abbreviations

Alum, aluminum hydroxide; ANOVA, analysis of variance; CTL, control group; FAs, food allergies; F-ELISA, fluorometric enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; HBSS, Hank's balanced salt solution; HRP, horseradish peroxidase; IFN, interferon; Ig, immunoglobulin; IL, interleukin; PBS, phosphate-buffered saline; RPMI, Roswell Park Memorial Institute; SD, standard deviation; TGF, transforming growth factor; Treg, regulatory T cell; GOS, galacto-oligosaccharide; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; BCA, bicinchoninic acid; REA, Research Executive Agency; AU, arbitrary unit; FITC, fluorescein isothiocyanate; H&E, hematoxylin and eosin.

In developed countries, the prevalence of food allergies (FAs) is estimated to affect up to 8% of children and 2% of adults (1). FAs most often begin within the first 2 years of life and can be caused by an adverse immunological reaction involving immunoglobulin E (IgE) to an ingested food antigen. The low-affinity IgE receptor FcεRII (CD23), expressed on enterocytes, has been implicated in the bidirectional transport of allergen–IgE complexes from the lumen to the serosa in the intestine (2). Wheat is one of the eight foods that most frequently promote allergies in childhood; wheat allergy affects up to 0.5% of the population (3). To date, wheat has been considered a common childhood FA that is usually outgrown by school age (4, 5). The major wheat allergens are found among the relatively insoluble gluten proteins, consisting of gliadins and glutenins (6, 7). One explanation for the increased prevalence of allergies lies in the well-known ‘hygiene hypothesis’, which postulates that low or no exposure to exogenous antigens in early life may increase the risk of allergic diseases (8, 9). It has been described that an alteration of the microbial flora favors the persistence of Th2 cytokines (IL-4, IL-13, and IL-5), which are predominant at birth, and limits the shift toward a predominant Th1 response and the development of regulatory T cells. Moreover, declining microbial diversity, particularly in the gut, is implicated in the dramatic increase in allergies and other inflammatory and immune diseases (10, 11).

To date, clinical management of wheat allergies has been based on avoidance and the use of rescue medication for reactions. However, 35% of patients remain allergic by the age of 12, suggesting that new treatments are necessary. Over the last several years, new alternatives have been proposed to prevent and treat allergic diseases. Among these, research has focused on the use of probiotics and prebiotics. Despite more than 19 randomized controlled trials to assess the effects of probiotics in allergy prevention, there are still no definitive benefits or guidelines. There is early promise in using prebiotics to selectively stimulate the growth and activity of bacteria in the colon and improve host health. Prebiotics are nondigestible carbohydrates that stimulate the growth of probiotic bacteria in the intestine. The most common prebiotics are indigestible oligosaccharides, such as inulin and galacto-oligosaccharide (GOS). Both can interact with the gut microflora and play a central role in the maturation of the immune system. They regulate allergic inflammation through an inhibition of the Th2 profile and an upregulation of the Th1 and Treg responses (12–14). Recent data indicate that prebiotics might also exert a direct action on the immune system, notably by interacting with ‘galectins’ that can exert various immunomodulatory properties via their binding to some T-cell receptors (15). However, none of these mechanisms of action of prebiotics (direct or indirect) on the immune system are well understood. Previous studies in allergic mouse models have described prebiotics (i.e., FOS, GOS) as prophylactic immune-modulators that attenuate allergic responses against house dust mites or pollen (16).

Prenatal life and early infancy are crucial periods during which different systems are established, including the immune system, microbiota, gut barrier integrity, and oral tolerance (17). Recent work has shown that a maternal diet supplemented with prebiotics (a mix of oligosaccharides) during pregnancy or lactation can affect the development of allergic symptoms in the offspring (18, 19). Nevertheless, the effect of supplementing the diet of adult mice with prebiotics during perinatal period (pregnancy and breastfeeding) on the development of the microbiota and the immune system in the offspring has not been evaluated in the context of allergies and whether this period could be of interest.

We hypothesized that prebiotics might be a promising dietary concept for early-life intervention in the prevention of wheat allergies. Therefore, in this study, we aimed to investigate the effect of maternal supplementation with GOS/inulin mixture during pregnancy and lactation on the development of food allergies in the offspring.

## Methods

### Animal studies

Balb/c mice from Charles River, France, were used and housed in a ventilated cage system. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire region (CEEA.2011.52; 128; accreditation number: 4478). Mice were fed either a standard diet or a diet supplemented with 4% galacto-oligosaccharides and inulin in a 9:1 ratio (Safe, France) during pregnancy and breastfeeding. The pups were fed a normal diet until weaning at 3 weeks of age, and at 6 weeks were sensitized to wheat-deaminated gliadins (DG) by two intraperitoneal injections of 10 µg of DG in 100 µl of PBS and 100 µl of aluminum hydroxide. After 8 days, the pups were orally administered (gavage) 20 mg of DG to induce an allergic reaction (Fig. 1). Body temperature was measured with a rectal probe before and 30 min after the oral challenge. The clinical score was evaluated 1 h after the oral challenge according to the symptomatic scale described previously (20).

### Immunoglobulin assays

Blood samples were collected at the end of the protocol and centrifuged at 2000 g for 20 min. The quantifications of specific IgE, IgG1, IgG2a, and IgA and histamine levels were assayed on serum samples by indirect F-ELISA (20).

### Cytokine assays

Mesenteric lymph nodes and Peyer’s patches were collected and ground to obtain cell suspension. Pooled cell suspension was then specifically stimulated with DG at 10 µg/ml. After 5 days of growth, supernatants were collected and the

concentrations of cytokines were measured by ELISA as described (20).

#### Flow cytometry

Mesenteric lymph nodes and Peyer's Patches were collected from mice and ground. A total of  $1.10^6$  cells were transferred to a 96-well round-bottom plate and stimulated for 5 h with 50 ng/ml of phorbol-12-myristate-13-acetate and 1  $\mu$ g/ml of ionomycin (Sigma-Aldrich) together with brefeldin A (1 mg/ml; BD Bioscience). Cells were stained with surface markers (CD3-FITC, CD4-Alexa 405, CD25-PE-Cy7; BD Biosciences) in the presence of Fc blocker mouse CD16/

CD32 antibody (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). For intracellular staining, the cells were fixed and permeabilized using a Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and stained with Fox-p3-PE, IL-4-PE, or IFN- $\gamma$ -APC (BD Biosciences). Cells were analyzed on a Canto II flow cytometer (BD Biosciences). Data were acquired using Diva 8.0 software and analyzed with FlowJo X (TreeStar, Williamson Way, Ashland, USA).

#### Western blot

A total of 60 mg of intestine (jejunum) was immersed into 500  $\mu$ l of lysis buffer for 30 min. After sonication, the

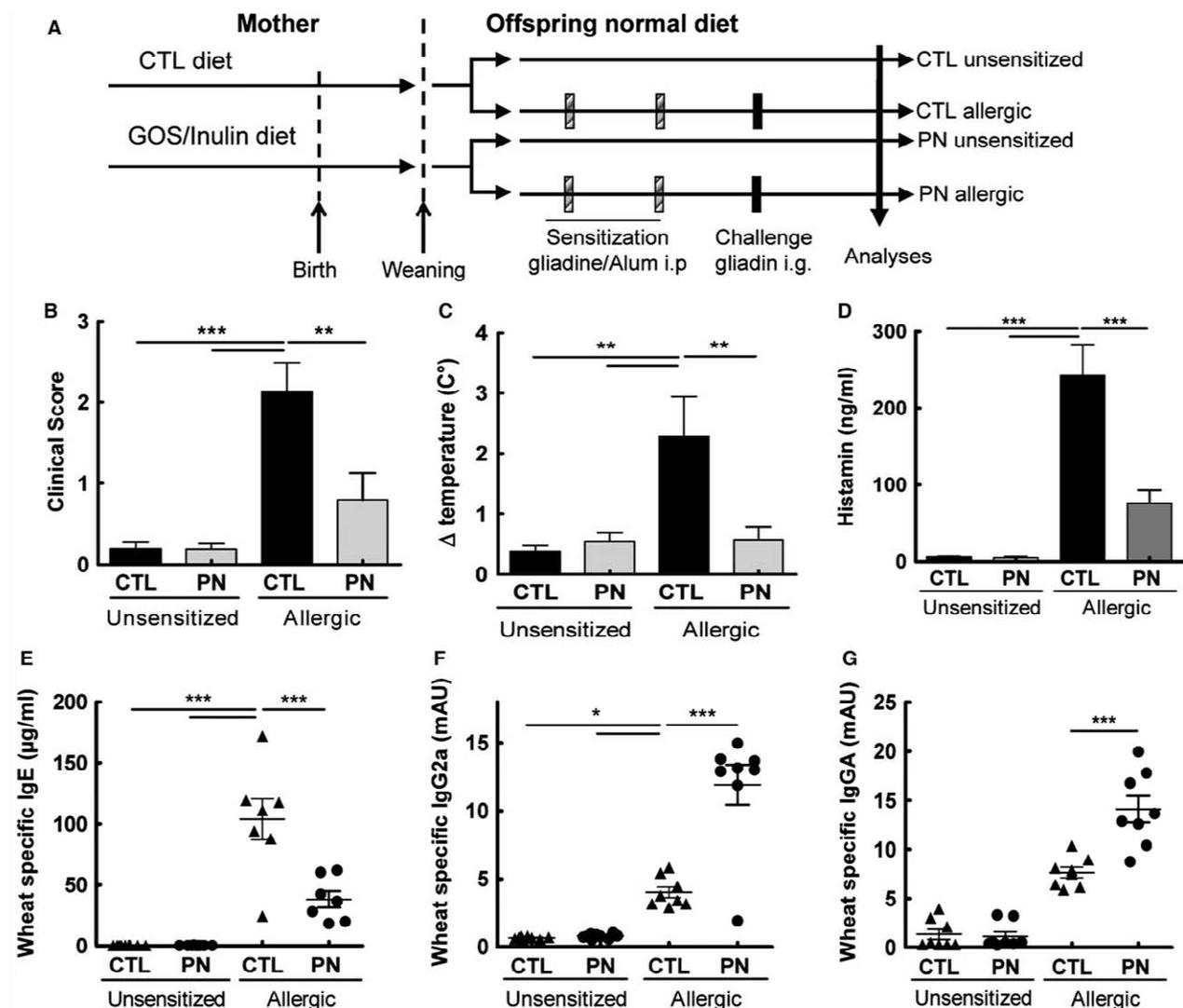


Figure 1 Maternal GOS/inulin diet protects offspring against symptoms of wheat protein food allergies. (A) Experimental protocol. Mothers were fed either a control diet (CTL) or a GOS/inulin diet (PN), and after weaning, their pups were left untouched (unsensitized) or intraperitoneally sensitized and orally challenged with wheat proteins (allergic). The mice were analyzed 1 h after

the challenge for their (B) clinical score, (C) body temperature: and histamin level (C). Concentrations of wheat-specific (E) IgE, (F) IgG2a, and (G) IgA in the plasma of the offspring of mothers fed either a control or a GOS/inulin diet were evaluated. Values are mean  $\pm$  SD (n = 8 animals per group); \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\* P < 0.005.

concentration of the intestinal proteins was assessed using Bi-succinimide acid (BCA). After migration on a 10% SDS-PAGE, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. In an attempt to quantify the proteins, the membrane was incubated with antibodies directed against CD23 and MUC2 (Life Technologies SAS, Saint-Aubin, France) and then revealed by chemiluminescence according to the manufacturer's instructions.

#### Ussing chambers

Pieces of jejunum were extracted from mice, washed with a Krebs solution and mounted in Ussing chambers. The paracellular permeability was assayed using a fluorescein-sulfonic acid gradient over time by fluorometry. The transcellular permeability was measured by the horseradish peroxidase (HRP) activity over time using a spectrofluorometer as previously described (21).

#### Short-chain fatty acid measurement and 16S DNA analyses from feces

To detect short-chain fatty acids, the content of ceca from mice was collected and centrifuged at 10000 g for 10 min. The concentration of short-chain fatty acids was calculated from the supernatant by gas-liquid chromatography. The bacteria were quantified by quantitative PCR (qPCR) in feces collected from pups on day 21 after birth (before allergy sensitization) and on day 54 (after allergy sensitization). Briefly, feces were added to 180  $\mu$ l of a solution of lysozymes (20 mg/ml), Triton (1.2%), and Tris-HCl/EDTA (1/0.5 M) and incubated at 37°C for 30 min. Then, 300 mg of zirconium beads (diameter 0.1 mm, BioSpec Products, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France) was added with 1 ml of InhibitEX solution from the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit, and the suspension was disrupted for 3 min at 30 Hz in a mini-bead beater (MM301; Retsch GmbH & Co., Haan, Germany). Afterward, the DNA was quantified by Nanovue (GE Healthcare, Aulnay sous Bois, France). Following the extraction, qPCR was conducted using the iCycler iQ real-time PCR detection system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The analyzed mixture consisted of a total volume of 15  $\mu$ l containing 5  $\mu$ l of the extracted DNA, 2.5  $\mu$ l of specific primers, and 7.5  $\mu$ l of QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands).

#### Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA). Values were expressed as mean  $\pm$  SEM and compared using one-way ANOVA. In the case of a positive ANOVA, means were compared using the Mann-Whitney U-test and the results were corrected by a Bonferroni multiple-comparisons test. A P-value of less than 0.05 was considered significant.

## Results

Offspring from GOS/inulin mixture-exposed mothers during pregnancy and lactation are protected from food allergies

An allergy to DG was induced in offspring from both control diet (CTL allergic)- and GOS/inulin mixture-supplemented mothers (PN allergic) (Fig. 1A). Nonallergic mice from both groups were used as controls to determine the effect of perinatal supplementation with GOS/inulin mixture on the development of allergies. Interestingly, feeding mothers the GOS/inulin diet limited the severity of the disease and dampened allergic inflammation in offspring. Indeed, our results showed that the introduction of GOS/inulin reduced the clinical score (2.1  $\pm$  0.3 AU vs 0.8  $\pm$  0.3 AU), body temperature (2.3  $\pm$  0.6°C vs 0.6  $\pm$  0.2°C), histamine level (242  $\pm$  41 ng/ml vs 76  $\pm$  17), and wheat-specific IgE level (104  $\pm$  16 lg/ml vs 38  $\pm$  7 lg/ml) compared to the control diet (Fig. 1B, D and E). Interestingly, plasma levels of wheat-specific IgG2a and IgA significantly increased in allergic offspring from GOS/inulin-supplemented mothers compared with allergic offspring from the control diet-fed mothers (3.7  $\pm$  0.4 mAU vs 11.9  $\pm$  2.5 mAU and 7.8 mAU  $\pm$  0.7 vs 14.1 mAU  $\pm$  1.5, respectively) (Fig. 1G and H). Together, these results demonstrate a protective effect of GOS/inulin mixture against food allergies in offspring when administered to mothers during gestation and lactation.

Maternal supplementation with GOS/inulin during gestation and lactation reduces the Th2 response in allergic offspring and increases regulatory responses in allergic offspring

We examined inflammatory and suppressive cytokines in the guts of offspring from mothers that did and did not receive GOS/inulin supplements (Fig. 2). The production of IL-4 and IL-5 by specifically stimulated cells such as T lymphocytes from mesenteric lymph nodes and Peyer's patches was upregulated in allergic mice from both control diet-fed and GOS/inulin-supplemented mothers compared with nonallergic mice. Moreover, GOS/inulin supplementation during pregnancy and lactation had a profound effect on preventing the secretion of IL-4 and IL-5, as significant decreases were found in pups from GOS/inulin-supplemented mothers compared to control diet-fed mothers (43.5  $\pm$  31 pg/ml vs 1.7  $\pm$  3 pg/ml and 176.6  $\pm$  42 pg/ml vs 42.3  $\pm$  7 pg/ml, respectively) (Fig. 2A and B). However, we observed no difference for IFN- $\gamma$  secretion in the guts of allergic offspring from control diet- or GOS/inulin-supplemented mothers (Fig. 2C). Similar results were obtained for the expressions of IL-4 (3.9  $\pm$  3.8% vs 9.8  $\pm$  3.9%) and IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> T cells from lymphoid organs (Fig. 2D and E). Regarding regulatory T cells, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg frequency decreased in allergic pups compared with nonallergic pups from control diet-fed mothers (Fig. 2F). However, this decrease was suppressed in offspring from GOS/inulin-supplemented mothers (Fig. 2F). The persistence of the Treg

response is particularly associated with the production of the cytokine TGF- $\beta$ , which was found to increase in the allergic offspring of PN mothers compared with other groups (Fig. 2G). However, no effect on IL-10 production was observed in food allergic mice, but IL-10 production was increased in nonallergic mice from GOS/inulin-supplemented mothers compared with control diet-fed mothers, confirming the effect of GOS/inulin in regulatory responses (Fig. 2H).

GOS/inulin feeding during the perinatal period protects offspring from increase intestinal permeability from allergies

To identify whether the changes in the allergic marker and the immune response in the presence of allergies are associated with the modification of the intestinal physiological parameters, jejunum permeability and intestinal protein expression were measured (Fig. 3). Allergic mice breastfed by mothers supplemented exhibited a fivefold decrease in FITC-sulfonic acid and a 2.5-fold decrease in the HRP area under the curve compared to pups from control mothers (Fig. 3A). Interestingly, offspring from GOS/inulin-fed mothers were protected from the increase of paracellular (left panel) and transcellular (right panel) permeability that occurred in the presence of food allergies (Fig. 3A and B), suggesting an important role of GOS and inulin in the maintenance of gut barrier integrity. Based on these results, we were interested in examining histological features of mice with allergies. Figure 3C highlights less cellular infiltration and villus deterioration in allergic offspring from GOS/inulin-supplemented mothers compared to offspring from control diet-fed mothers. In addition to the tissue inflammation, we verified gut

protection through the quantification of mucus protein, such as Mucin 2 (MUC2), which is secreted by goblet cells in the epithelial lining into the lumen of the large intestine. Western blot analysis of jejunum lysate revealed that MUC2 was overexpressed by sixfold in allergic mice from supplemented mother compared with others groups, proving the effect of GOS/inulin mixture on the protection of gut permeability in the presence of food allergies (Fig. 3E). Finally, the measurement of CD23 expression in the jejunum of allergic pups from supplemented mothers showed a drastic decrease compared with other groups (Fig. 3D). To conclude, this shows that perinatal treatment with GOS/inulin protects the gut barrier from allergic reactions through a modulation of the expression of intestinal proteins.

GOS/inulin feeding during the perinatal period alters the composition of microbiota in pups

To investigate the impact of early exposure to GOS/inulin mixture on the bacterial composition, we determined the cecum mass content, the bacterial activity by measuring the short-chain fatty acid (SCFA) level, and the composition of feces microbiota (Fig. 4). In nonallergic mice, the cecum content mass did not differ significantly between mice from GOS/inulin-supplemented mothers and control diet-fed mothers (0.168 mg vs 0.211 mg), whereas in allergic mice, the mass content decreased compared to nonallergic mice from the PN group (Fig. 4A). Concerning metabolic activity of microbiota, no difference was found between groups (Fig. 4B). Quantitative PCR analysis on 3-week-old offspring's feces revealed that GOS/inulin supplementation leads

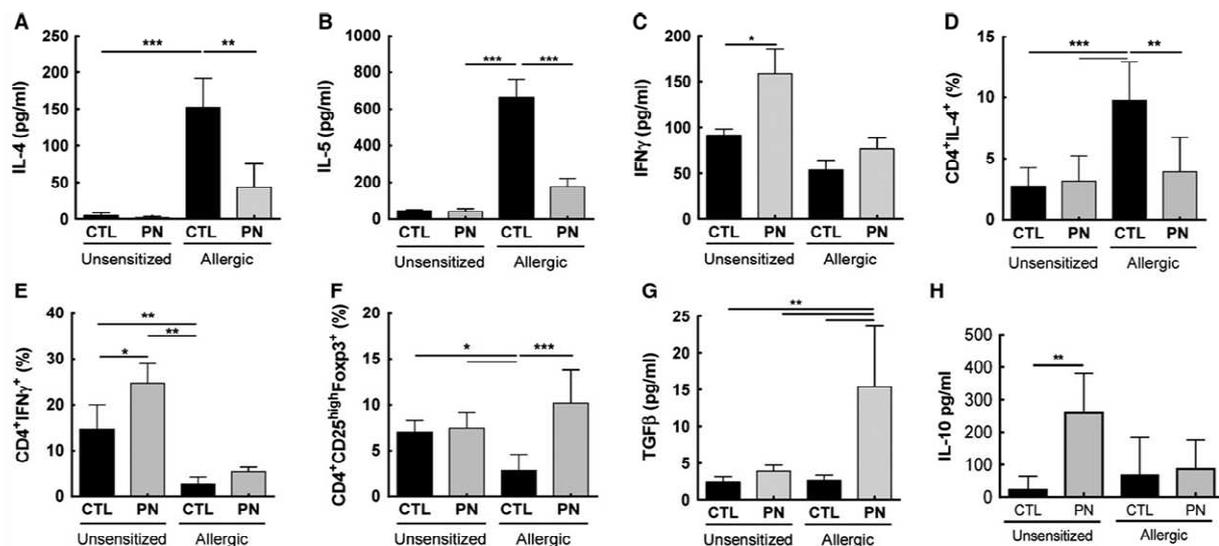


Figure 2 Maternal exposure to GOS/inulin modifies immune status of offspring related to allergies. The production of IL-4 (A), IL-5 (B), IFN- $\gamma$  (C), and TGF- $\beta$  (G) cytokines measured by ELISA in the supernatant from lymphoid cells specifically stimulated with DG. Quantifications of IL-4- and IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells (D, E) and

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg cells (F) and TGF- $\beta$  (G) and IL-10 (H) secretion were measured by flow cytometry after stimulation with PMA/ionomycin in the presence of brefeldin A for cytokine secretion. Data represent mean  $\pm$  SEM (n = 8 animals per group); \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, and \*\*\*P < 0.005.

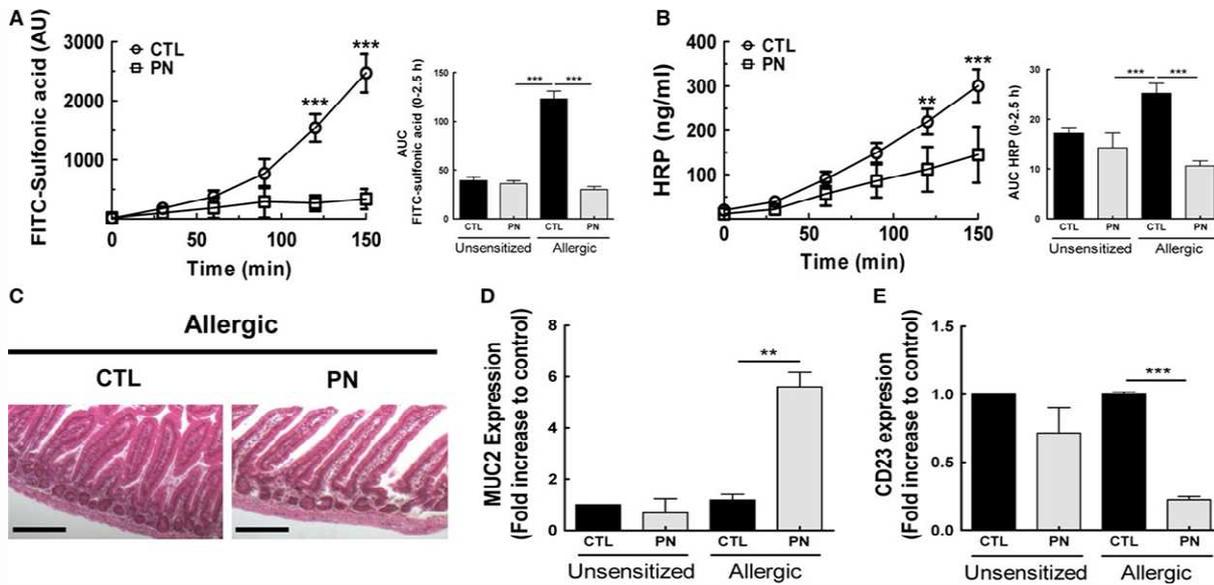


Figure 3 Maternal exposure to GOS/inulin protects offspring from intestinal barrier degradation in the presence of food allergies. Jejunum segments were isolated 1 h after the wheat protein challenge, and the intestinal transcellular permeability to sulfonic acid (A, left panel) and paracellular permeability to HRP (B, left panel) were measured in an Ussing chamber over a 150-min period in allergic pups of mothers from the CTL and PN groups. The AUC

for all groups of pups for transcellular (A, right panel) and paracellular (B, right panel) permeability is also shown. Representative jejunum sections H&E-stained from gliadin-challenged mice from the CTL and PN groups (C). Expression of intestinal proteins was measured in jejunum lysate in all groups of mice for CD23 (D) and MUC2 (E). Data are mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$  mice/group); \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.005$ . Scale bar = 250  $\mu$ m.

to a significant increase in bacterial load (Fig. 4C). Similar results were obtained in the mothers (data not shown). At weaning, mice from supplemented mothers displayed higher proportions of the Lactobacillus and Clostridium leptum phyla and lower proportions of Clostridium coccoides compared with the control group (Fig. 4D). However, changes in microbiota occurring in the presence of food allergies were similar in both groups, with a higher abundance of Lactobacillus phylum and a lower abundance of Clostridium and Erysipelothrix (Fig. 4E).

## Discussion

The early stages of life are of great importance in the development of an organism and specifically in microbiota and immune system maturation. The mother and her diet affect fetal development in utero and during breastfeeding. Studies suggest a preventive effect of a prebiotic-supplemented diet in adult mice on contact hypersensitivity (22), cutaneous allergies, and asthma (23). Maternal exposure to dietary factors may have immune-regulatory effects on the promotion or prevention of skin or respiratory allergic diseases in offspring (18, 19). Here, we show that mothers fed a GOS/inulin-supplemented diet gave birth to mice protected against an allergy to wheat. Those mice display lower clinical scores, and a preservation of the intestinal barrier integrity compared to pups from mothers that were fed a normal diet. Moreover, changes in the Th2/Th1 balance toward a damp-

ened Th2 and stronger Treg response were observed in those mice, demonstrating that the mother's diet could affect immune development in the offspring. This study and others have shown that nondigestible oligosaccharides are involved in the induction of beneficial effects through specific molecules or cell populations, such as regulatory T cells, and have a profound effect on the tolerance maintenance (24). These effects coincide with a lower production of Th2-related cytokines, which might change the Th2/Th1 balance toward a dampened Th2 response. Moreover, this is accompanied by an absence of Th2 population increase in the presence of allergies in the PN group, reinforcing the immune-regulatory effect of maternal exposure to GOS/inulin mixture. Previously, it has been shown that the intensity of allergic reactions to food can be attenuated by Treg (25), and Treg induction may underlie the protective effect of certain dietary interventions, including nondigestible oligosaccharides, in food allergy models. While wheat protein sensitization and challenge lead to a decrease in  $CD4^+CD25^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$  T cells in Peyer's patches and lymph nodes in controls, treating the mothers with GOS/inulin mixture prevents the decrease of this population in the presence of allergies. Moreover, treatment with GOS/inulin mixture leads to an increase of suppressive-related cytokines, such as TGF- $\beta$  and IL-10. These data suggest that GOS/inulin may induce suppressive responses in the intestine. However, supplementing the mother's diet had no effect on the Treg cells in nonallergic mice, suggesting that the GOS/inulin mixture enhances the

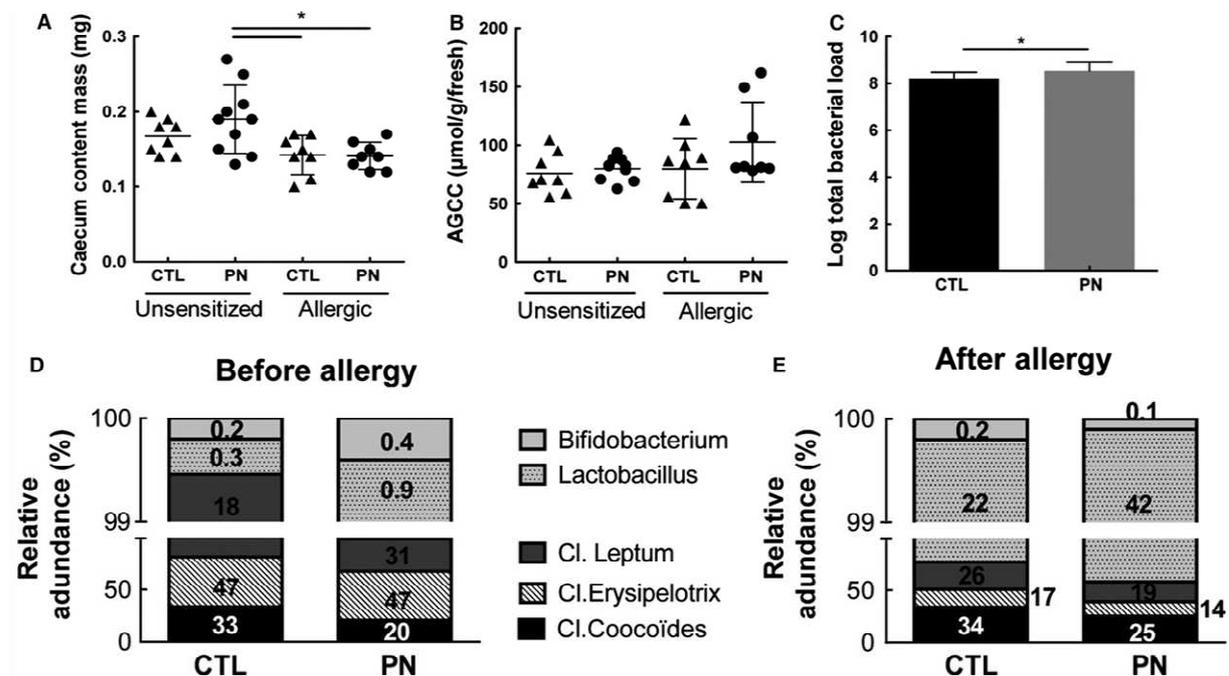


Figure 4 Maternal diet enriched with GOS/inulin alters the intestinal microbiota in offspring before but not after allergy sensitization. Analysis of caecum content mass (A) and total level of AGCC (B). Before food allergy sensitization, the total amount of bacteria in the feces (C) of pups from mothers fed with the control or GOS/inulin-supplemented diet was measured. Pyrosequencing analysis of the fecal microbiota composition in pups from control diet-fed mothers (CTL) and GOS/inulin mixture-supplemented mothers (PN)

regulatory response to allergic inflammation rather than inducing a T regulatory population that protects against allergy development. Together, these results show that maternal supplementation with GOS/inulin can affect in vivo immune responses in the adult offspring.

Prebiotics also impact gut physiology, and the mechanisms by which prebiotics improve gut permeability – in the particular context of allergies – are not fully understood. Among the suspected mechanisms, it has been demonstrated that the prebiotic modulation of the gut microbiota increases the villus height and crypt depth and leads to a thicker mucosal layer in the jejunum and the colon (26). These effects are related to the bacterial fermentation of the prebiotics. The resulting products of fermentation are mainly short-chain fatty acids (SCFAs), with butyrate acting as an energetic substrate for the colonocytes and having a trophic effect on mucosa. In addition to the putative role of SCFAs and specific bacterial strains, the exact mechanism underlying the relation between prebiotic-induced changes in gut microbiota and improved gut barrier function has not yet been described. It has been proposed that this higher permeability and allergic symptoms in mice are dependent on a disruption of key intestinal proteins, such as MUC2 and CD23 (27). In the vast majority of studies, prebiotics displayed a protective effect in increasing gut barrier integrity by stimulating the

secretion of antimicrobial peptides and mucus (acidic mucins, MUC-2, MUC-3, and MUC-4) or the expression of occludins (28). We demonstrated that maternal exposure to particular prebiotics (GOS/inulin mixture) protects offspring from the alteration of the gut barrier, probably by limiting allergic inflammation characterized by an increase in mucus protein expression and a decrease in CD23 expression.

Prebiotics have repeatedly been shown to selectively stimulate the growth of bifidobacteria and, in some cases, lactobacilli, leading to significant changes in gut microbiota composition (29). Prebiotics can also provide energy for the growth of endogenous favorable bacteria in the gut, thus improving the host microbial balance and increasing specific growth rate resulting in a transient increase in total amount of bacteria as we observed. This could be linked to the elevation of the caecum content weight after the oligosaccharide gavage which may result from an increase crypt depth and bacteria density by providing energy source and normalizing proliferation which in turn allows a higher bacterial count. There is now good evidence that the composition of the gut microbiota influences the development of allergies, and exposure to specific bacteria, including bifidobacteria and lactobacillus strains, can attenuate allergic responses (30). More specifically, studies with germ-free mice have identified key species within the microbiota, such as clostridia, that can

- during Pregnancy or Lactation Leads to Diminished Sensitization and Allergy in the Female Offspring. *J Nutr* 2015;145:996–1002.
19. Hogenkamp A, Thijssen S, van Vlies N, Garssen J. Supplementing pregnant mice with a specific mixture of nondigestible oligosaccharides reduces symptoms of allergic asthma in male offspring. *J Nutr* 2015;145:640–646.
  20. Gourbeyre P, Denery-Papini S, Larre C, Gaudin JC, Brossard C, Bodinier M. Wheat gliadins modified by deamidation are more efficient than native gliadins in inducing a Th2 response in Balb/c mice experimentally sensitized to wheat allergens. *Mol Nutr Food Res* 2011;56:336–344.
  21. Bouchaud G, Gourbeyre P, Bihouee T, Aubert P, Lair D, Cheminant MA et al. Consecutive Food and Respiratory Allergies Amplify Systemic and Gut but Not Lung Outcomes in Mice. *J Agric Food Chem* 2015;63:6475–6483.
  22. Watanabe J, Sasajima N, Aramaki A, Sonoyama K. Consumption of fructo-oligosaccharide reduces 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity in mice. *Br J Nutr* 2008;100:339–346.
  23. Vos AP, Haarman M, van Ginkel JW, Knol J, Garssen J, Stahl B et al. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatr Allergy Immunol* 2007;18:304–312.
  24. van't Land B, Schijf M, van Esch BC, van Bergenhenegouwen J, Bastiaans J, Schouten B et al. Regulatory T-cells have a prominent role in the immune modulated vaccine response by specific oligosaccharides. *Vaccine* 2010;28:5711–5717.
  25. Kanjarawi R, Dercamp C, Etchart N, Adel-Patient K, Nicolas JF, Dubois B et al. Regulatory T cells control type I food allergy to Beta-lactoglobulin in mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2011;156:387–396.
  26. Chang WH, Li JJ, Zhang S, Zheng AJ, Yuan JL, Cai HY et al. Effects of glucocorticoid-induced stress on absorption of glycy sarcosine in jejunum of broilers. *Poult Sci* 2015;94:700–705.
  27. Gourbeyre P, Desbuards N, Gremy G, Tranquet O, Champ M, Denery-Papini S et al. Perinatal and postweaning exposure to galactooligosaccharides/inulin prebiotics induced biomarkers linked to tolerance mechanism in a mouse model of strong allergic sensitization. *J Agric Food Chem* 2015;61:6311–6320.
  28. Shimotoyodome A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. Sulfated polysaccharides, but not cellulose, increase colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Dig Dis Sci* 2001;46:1482–1489.
  29. Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology* 2012;22:1147–1162.
  30. Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C et al. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat Med* 2014;20:159–166.
  31. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H et al. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 2013;500:232–236.
  32. Lyons A, O'Mahony D, O'Brien F, MacSharry J, Sheil B, Ccedia M et al. Bacterial strain-specific induction of Foxp3+ T regulatory cells is protective in murine allergy models. *Clin Exp Allergy* 2010;40:811–819.
  33. Julia V, Macia L, Dombrowicz D. The impact of diet on asthma and allergic diseases. *Nat Rev Immunol* 2015;15:308–322.

## Article 2: How proteins aggregate can reduce allergenicity : comparison of ovalbumins heated under opposite electrostatic conditions

Claude M, Bouchaud G, Lup R, **Castan L**, Tranquet O, Denery-Papini S, Bodinier M, Brossard C. J Agric Food Chem, 2017

## How Proteins Aggregate Can Reduce Allergenicity: Comparison of Ovalbumins Heated under Opposite Electrostatic Conditions

Mathilde Claude,<sup>†</sup> Grégory Bouchaud,<sup>†</sup> Roberta Lupi,<sup>†</sup> Laure Castan,<sup>†‡</sup> Olivier Tranquet,<sup>†</sup> Sandra Denery-Papini,<sup>†</sup> Marie Bodinier,<sup>†</sup> and Chantal Brossard<sup>\*†</sup> 

<sup>†</sup>UR 1268 Biopolymers Interactions Assemblies, INRA, Nantes, France

<sup>‡</sup>UMR 1087 Institut du Thorax, INSERM, Nantes, France

**ABSTRACT:** Heated foods are recommended for avoiding sensitization to food proteins, but depending on the physicochemical conditions during heating, more or less unfolded proteins aggregate differently. Whether the aggregation process could modulate allergenicity was investigated. Heating ovalbumin in opposite electrostatic conditions led to small (A-s, about 50 nm) and large (A-L, about 65  $\mu$ m) aggregates that were used to sensitize mice. The symptoms upon oral challenge and rat basophil leukemia degranulation with native ovalbumin differed on the basis of which aggregates were used during the sensitization. Immunoglobulin-E (IgE) production was significantly lower with A-s than with A-L. Although two common linear IgE-epitopes were found, the aggregates bound and cross-linked IgE similarly or differently, depending on the sensitizing aggregate. The ovalbumin aggregates thus displayed a lower allergenic potential when formed under repulsive rather than nonrepulsive electrostatic conditions. This further demonstrates that food structure modulates the immune response during the sensitization phase with some effects on the elicitation phase of an allergic reaction and argues for the need to characterize the aggregation state of allergens.

**KEYWORDS:** aggregation, egg allergy, food structure, thermal treatment

### INTRODUCTION

Hen egg is one of the most common foods responsible for allergies, and it has an estimated allergy prevalence of 1% in European children younger than 2 years old, which reaches up to 2% of this population in northwestern Europe.<sup>1</sup> Egg is a ubiquitous ingredient in many commercially available foods, and most of these foods undergo thermal treatment that could change the allergenic potential of the egg.<sup>2</sup> Many egg-allergic patients can tolerate heated egg-containing foods.<sup>3,4</sup> In mice sensitized with native ovalbumin (OVA; Gal d 2, 54% of total egg white proteins), the elicitation reaction after oral challenge with heated OVA also decreased compared to native OVA.<sup>5</sup> Immunoglobulin-E (IgE)-binding was generally found lower to heated than to nonprocessed egg proteins.<sup>6–11</sup>

The effect of heating on the ability of egg proteins to induce sensitization has been barely studied. Murine models are good tools to study allergenicity and IgE specificity upon sensitization with various forms of an allergen and the immunomodulatory effects.<sup>12–15</sup> Sensitizing mice with heated OVA locally induced a lower Th2 response compared to unheated OVA and resulted in lower allergic symptoms upon challenge with native OVA.<sup>7</sup> The thermal aggregation of OVA as large particles near its isoelectric point reduced its allergenicity by shifting toward a Th1 profile and displaying lower Ig binding and lower basophil activation capacities compared to native OVA.<sup>6</sup> The mechanisms responsible for this decrease were partly studied by stimulating T cells with heated OVA, which resulted in a shift from a Th2 cytokine to a Th1 cytokine response.<sup>16</sup> These studies compared heated to native OVA, but consuming a cooked egg rather than egg in a baked product was also reported to better prevent an allergy from developing.<sup>17</sup> This suggests that the ability of egg proteins to

induce sensitization could differ among thermally processed egg-containing foods.

Near its natural pH in stored eggs (pH 9.2–9.5), egg white forms a homogeneous gel network upon heating that is composed of particles ranging in size from 60 to 80 nm that are composed of OVA with embedded aggregated ovotransferrin, whereas ovomucoid does not tend to aggregate.<sup>18–20</sup> The microstructure of baked egg-containing products remains to be described at molecular and supramolecular scales; however, these products are generally heated in neutral or slightly acidic conditions, that is, far from the natural pH of stored egg white. Heating a protein above its denaturation temperature leads to unfolding and, depending on attractive and repulsive interactions, may lead to aggregation through hydrophobic interactions, disulfide bonds, and electrostatic interactions, which are sensitive to pH and ionic strength.<sup>21</sup> Electrostatic repulsion by counterbalancing the hydrophobic interactions modulates the aggregation kinetics and leads to aggregates of different sizes (from oligomers to polymers) and morphology (from linear, more or less branched, to spherical).<sup>22,23</sup> OVA aggregates of various structures showed differences in the kinetics of digestion and generated peptides,<sup>22</sup> and we hypothesized that how OVA aggregated could also modulate its ability to induce the sensitization and IgE specificity.

To evaluate the effect of the aggregation process on OVA allergenicity, we prepared OVA aggregates under opposite electrostatic conditions (at the natural egg white pH of stored

Received: February 13, 2017

Revised: April 18, 2017

Accepted: April 23, 2017

Published: April 24, 2017

eggs and low ionic strength and at pH near the isoelectric point of ovalbumin and high ionic strength). Using a murine model of allergy and a basophil leukemia (RBL) assay, we examined how these aggregates changed Ig production in mice, the specificity of the produced IgE, and the resulting elicitation phase upon challenge with native OVA.

## MATERIALS AND METHODS

**Protein Preparation and Characterization of OVA Aggregates.** OVA purified from egg white<sup>24</sup> was kindly provided by INRA, UMR 1253 "Science et Technologie du Lait et de l'œuf" (Rennes, France); its purity was estimated as 87%. OVA solutions were prepared at 15 mg/mL in 0.8 M NaCl, pH 5, for A-L or in 0.03 M NaCl, pH 9, for A-s and were heated for 6 h at 80 °C in a controlled-temperature water bath to form aggregates as previously described.<sup>22</sup> In these conditions, the absence of soluble native OVA after heat treatment in the aggregated samples was previously tested.<sup>22</sup> Nonaggregated OVA solution (N) was prepared by mixing equal parts of the nonheated solutions and adjusting to pH 7.6 and 0.15 M NaCl. The size distributions of A-L and A-s were determined by laser light scattering using a Mastersizer MS 3002 (Malvern Instruments, UK) or by dynamic light scattering on a Zetasizer (Malvern Instruments, UK), respectively. Measurements were collected in triplicate from three aliquots of each preparation. The aggregated samples were diluted with 2 M NaCl or Milli-Q water and PBS to adjust the solution to pH 7.6, 0.15 M NaCl, and to the required concentration for the subsequent experiments. Aliquots were stored at -20 °C until use.

**Mouse Model of Food Allergy.** This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Pays de la Loire (CEEA-PdL no. 6) under the number 4049. Three-week-old Balb/c female mice from the Centre d'Élevage RenéJanvier (France) were acclimatized for 3 weeks prior to immunization and were housed in a ventilated cage system (IVC Racks, Allentown, PA, USA) under pathogen-free husbandry conditions. Sensitizations were performed every 10 days by three intraperitoneal injections of 10 µg of OVA adsorbed on aluminum hydroxide. Four groups of mice ( $n = 9-10$ ) were established: two groups sensitized with A-s or A-L and two control groups, a positive control sensitized with N and a negative control sensitized with PBS.

Two weeks after the last sensitization, a challenge was performed by the intragastric administration of 200 µL of N (100 mg/mL; 20 mg OVA/mouse). In vivo challenge could not be performed with the aggregated samples: at 100 mg/mL, the thermal treatment induced gelation of the samples that could not be delivered through the ball tip needle. Blood samples were collected 1 h after the challenge by cardiac puncture under anesthesia, and the animals were sacrificed by vertebral dislocation. Sera were stored at -80 °C until use.

**Evaluation of the Food Allergic Reaction.** Mouse ear swelling upon oral challenge with 20 mg of N was assessed by measuring ear thickness under anesthesia a few days before and 1 h after challenge using a digital micrometer (Guilman SA, Saint-Herblain, France).<sup>25</sup>

The blood level of mouse mast cell protease-1 (mMCP-1) was determined in sera diluted at 1:100 using a commercial kit (eBiosciences, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

**Histological Analysis.** Jejunum samples were collected after sacrifice, washed from the luminal content with PBS, and immediately immersed in paraformaldehyde (4% in PBS) for at least 48 h at 4 °C, followed by the standard procedures for paraffin embedding. Sections were cut and stained with hematoxylin eosin or toluidine blue. The sections were observed under a microscope (Zeiss Axiovert 135 Inverted Fluorescence Phase microscope). Histological analysis was randomly performed by a person blind to the sample conditions using ImageScope software (Aperio Technologies, Inc.). Morphological alterations were assessed by considering villi atrophy, the number of goblet and inflammatory cells, the height of the crypts, and the number of mast cells.<sup>26</sup>

**RBL Test.** The degranulation of 2H3 RBL cells (ATCC, Manassas, VA, USA) was evaluated in vitro by measuring  $\beta$ -hexosaminidase release as previously described.<sup>6</sup> Sera from each sensitization group were pooled and diluted 1:100. The measurements were performed in triplicate for each pool with each allergen preparation and were replicated six times. OVA concentration varied from 0.02 to 20,000 ng/mL. The highest mediator release value (MaxD) and the allergen concentration corresponding to 50% of the highest release (EC50) were determined using GraphPad Prism 5.02 for Windows software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

**Immunoglobulin Analyses.** The efficiency of sensitization was evaluated by measuring the levels of OVA-specific Ig (IgE, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>) by indirect F-ELISA using the Biomek NXP Laboratory Automation Workstation as described previously.<sup>6</sup> Measurements were performed in triplicate per mouse on N, A-L, A-s, and PBS. The results were expressed as the ratio of mean fluorescence intensities measured with OVA (IF) over the mean fluorescence intensity measured with PBS (IF<sub>0</sub>) to take into account background differences between the sera.

**Immunoglobulin-E Binding to Solid-Phase Synthetic Peptides (Pepscan).** Sera from mice sensitized with the aggregates were pooled by sensitization group and used in a pepscan analysis as described previously.<sup>27</sup> Decapeptides, overlapping by eight amino acids, spanned the sequence (excluding the signal amino acid) of OVA (UniProt ID P01012). HRP-conjugated anti-mouse IgE antibody (Southern Biotechnology, Montrouge, France) diluted 1:100,000 was used to reveal mouse IgE binding to peptides with a chemiluminescent substrate (WesternBright Quantum, Advansta, Menlo Park, CA, USA). Luminescence was acquired with a CCD camera (Luminescent Image Analyzer LAS 3000; Fujifilm, Tokyo, Japan), and a semiquantitative evaluation of IgE binding was performed with Multi Gauge version 3.0 software (Fujifilm). Two replicates were run by pool. By replicate, the spot detected with the highest intensity was set at 100%, and relative intensities were calculated. Spots that were consistently revealed with a relative intensity above 10% were considered as positive.

**Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.02 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and  $p$  values below 0.05 were considered significant. The individual data and the mean  $\pm$  SEM are presented on graphs. The data for each group were first analyzed for normality using D'Agostino and Pearson's omnibus normality test and were log transformed when they failed the test. Next, analyses of variance (ANOVA) with subsequent Bonferroni's multiple-comparisons tests between means of the groups were performed. If Bartlett's test revealed that variances between groups were significantly different, Kruskal-Wallis and subsequent Dunn's multiple-comparisons tests between medians of the groups were performed. When data related to the specificity of the IgE binding were compared, Friedman's test with subsequent Dunn's post-tests or repeated-measures ANOVA with subsequent Bonferroni's post-tests were performed.

## RESULTS

**Size Distribution of the Aggregates.** The particle size distributions of A-L and A-s that were prepared for sensitization and analyzed by laser light scattering or dynamic light scattering, respectively, are shown in Figure 1. The mean particle size was  $49.7 \pm 3.5$  nm for A-s with a size distribution between 5 and 80 nm and  $66.4 \pm 2.9$  µm for A-L with a size distribution between 3 and 300 µm.

**Ability of the OVA Aggregates To Sensitize Mice. Elicitation with N after Sensitization with the Aggregates.** We first investigated the effect of sensitizing with the aggregates on the elicitation following an oral challenge with N. The ear thickness of the mice was measured a few days before and 1 h after the challenge to evaluate the vasodilatation by ear swelling as a symptom of elicitation. Before challenge, no significant differences in ear thickness were observed between the groups of mice ( $237.8 \pm 3.7$  µm for N,  $230.0 \pm 3.7$  µm for A-L,  $234.4$

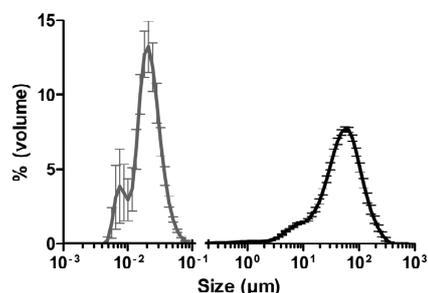


Figure 1. Characterization of the particle size distribution of the ovalbumin (OVA) aggregates formed by heating an OVA solution at 80 °C for 6 h under different physicochemical conditions (mean  $\pm$  SEM;  $n = 9$ ). Small aggregates measured by dynamic light scattering formed at pH 9, 0.03 M NaCl (left in gray), and large aggregates measured by laser light scattering formed at pH 5, 0.8 M NaCl (right in black).

$\pm 4.4 \mu\text{m}$  for A-s, and  $231.0 \pm 3.5 \mu\text{m}$  for the negative control). Upon the oral challenge with N, a significant difference in ear thickness was observed in mice sensitized with N and A-L ( $p < 0.0001$ ) corresponding to a mean 50 and 35  $\mu\text{m}$  ear swelling, respectively. These mice thus displayed a higher mean ear thickness after challenge than the mice of the negative control (Figure 2A). Ear thickness of the mice sensitized with A-s did not differ from the negative control and was lower than for mice sensitized with A-L or N.

All sensitized mice had higher significant mMCP-1 levels than mice from the negative control, and a significant difference was also noted between mice sensitized with A-L or A-s (Figure 2B).

The histological analysis of intestinal tissue preparations after N challenge did not show any significant differences for the five tested parameters between the groups of mice sensitized with the aggregates, and no significant differences were found between the controls either (data not shown).

The biological functionality of sera as a function of the aggregates used during the sensitization was also investigated with the RBL activation assay. RBL cells were sensitized with pools of sera from each group of mice and activated with N. No  $\beta$ -hexosaminidase release by RBL cells was observed with the pool from negative control mice, whereas degranulation occurred with all of the pools from OVA-sensitized mice (Figure 2C). The pools from the mice sensitized with N and A-L displayed significantly higher MaxD values than the pool from the mice sensitized with A-s (Figure 2D).  $EC_{50}$  was highest for the mice sensitized with A-s, intermediate for the mice sensitized with A-L, and smallest for N-sensitized mice (Figure 2E).

Thus, upon N stimulation, A-L-sensitized mice had higher in vivo elicitation and in vitro degranulation than A-s-sensitized mice. A-L-sensitized mice exhibited a behavior nearer that of N than A-s-sensitized mice.

**Production of N-Specific Immunoglobulins.** N-specific immunoglobulins produced by mice sensitized with native or aggregated OVA were then studied (Figure 3). As expected, negative control mice showed no production of OVA-specific immunoglobulins, as illustrated by the ratios of fluorescence intensities  $IF/IF_0$  set at  $1.00 \pm 0.06$ ,  $0.96 \pm 0.04$ , and  $0.98 \pm 0.03$  for specific IgE, IgG<sub>2a</sub>, and IgG<sub>1</sub>, respectively, whereas N-sensitized mice did. A-s induced a significantly lower production of N-specific IgE than A-L, which was at the

same level as the positive control (Figure 3A). Sensitization with A-L and A-s induced a similar amount of N-specific IgG<sub>2a</sub> able to bind to N, which tended to be higher than sensitization with N (Figure 3B), whereas no significant difference was observed in N-specific IgG<sub>1</sub> production between the two sensitizations with aggregated OVA, which displayed the same level as the positive control (Figure 3C).

Thus, N-specific IgG production was little influenced by the way OVA aggregated, whereas A-s promoted less N-specific IgE production than A-L.

**Capacity of the OVAs To Be Bound by and To Cross-Link Immunoglobulins as a Function of the Sensitizing OVA Form.** In each sensitization group, Ig-bindings to N, A-L, and A-s compared by ELISA and the degranulation capacity of N, A-L, and A-s assessed with the RBL degranulation assay were studied (Figure 4).

Looking at sera from the positive control, the aggregates displayed significantly lower Ig bindings (whatever the Ig class) and degranulation ability than N (Figure 4, left). A similar trend was found for the IgE binding for sera from mice sensitized with A-L, but IgG bindings were notably higher versus both N and the aggregates and showed large intermouse variability (Figure 4, middle). When degranulation was performed with pooled sera from mice sensitized with A-L, the gap between N and the aggregates was narrower than with pooled sera from the positive control as  $EC_{50}$  tended to increase for N (from 16 to 25 ng/mL) and significantly decreased for the aggregates (from 1900 to 130 ng/mL for A-L and from 3000 to 380 ng/mL for A-s).

Sera from mice sensitized with A-s displayed a very different behavior (Figure 4, right): IgG bindings (IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>) to A-s were significantly higher than to A-L, and N and A-s displayed a significantly higher IgE binding and ability to induce a degranulation than A-L ( $EC_{50}$  values were about 12 and 2000 ng/mL for A-s and A-L, respectively).

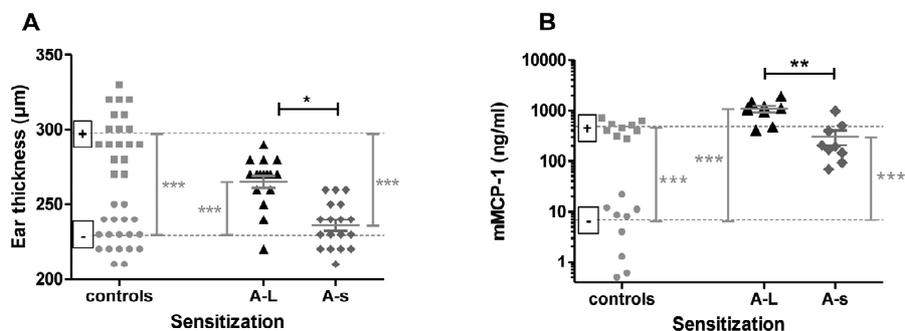
These results could be related to the specificity of the immunoglobulin repertoire as a function of the sensitizing aggregate. For the three Ig classes, A-s/A-L ratios were then calculated by mouse and were found significantly higher than 1 (Figure 5A) for mice sensitized with the A-s, suggesting Ig responses toward epitopes specific for this aggregated form. A pepscan analysis was then performed with pools of sera from mice sensitized with A-L or A-s. This analysis revealed in both cases two stretches of three or four peptides corresponding to two sequential epitopes on the OVA sequence: P57–P70 and P189–P200 (Figure 5B). P57–P70 (VRFDKLPGFGDSIE) largely dominated the IgE response in both cases.

Thus, specific IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub> produced upon sensitization with both aggregates showed Ig binding to the three OVAs, whereas those produced upon sensitization with N rather specifically bound to N. Sensitization with A-s induced lower IgE levels, and the Ig raised were at least partly specific of this aggregate.

## DISCUSSION

Applying the same heat treatment to OVA solutions under different physicochemical conditions resulted in A-s and A-L aggregates. The conditions were chosen to favor a slow and ordered aggregation of fully denatured OVA for A-s and a rapid and random aggregation of partly denatured OVA for A-L. The sizes measured in this study (approximately 50 nm and 66  $\mu\text{m}$ , respectively) agree with the previous study,<sup>22</sup> which also reported they differed in morphology, with A-s being linear

## In vivo elicitation of an allergic reaction by oral challenge with N



## In vitro degranulation with N of RBL cells sensitized with pools of sera

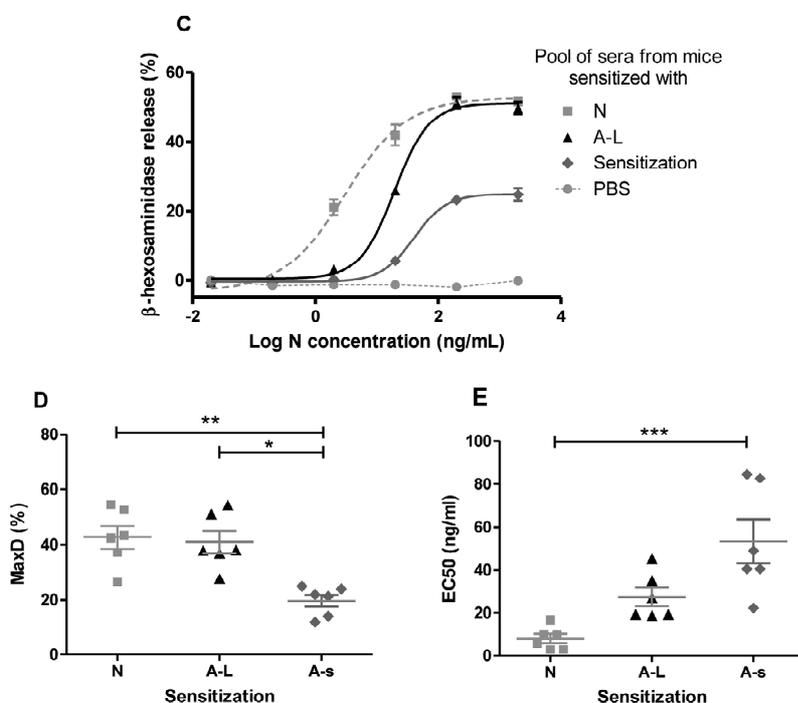


Figure 2. Elicitation with N after sensitization with the aggregates. (A, B) Evaluation of the allergic reaction upon challenge of the mice with 20 mg of native ovalbumin (N). Right and left ear thicknesses of the mice were measured 1 h after elicitation of the allergic reaction (A), and mean data of two determinations of the mMCP-1 level in sera (B) are shown for mice of the control groups and mice sensitized with large (A-L) and small (A-s) aggregates. The lines correspond to the mean values for the positive (mice sensitized with nonaggregated OVA) and the negative control. Means  $\pm$  SEM and the results of statistical tests are presented (Kruskal–Wallis and subsequent Dunn’s multiple-comparison tests in panel A, ANOVA and subsequent Bonferroni’s multiple-comparison tests of log transformed data in panel B; only significant differences are drawn; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). (C–E) RBL-2H3 cell activation assay with pools of sera from mice sensitized with native ovalbumin (N, squares), large aggregates (A-L, triangles), small aggregates (A-s, diamonds) or negative control mice (circles). Fitted mean degranulation curves (C) and calculated MaxD (D) and EC<sub>50</sub> (E) data for six repetitions in triplicate are presented. Means  $\pm$  SEM and the results of Kruskal–Wallis and subsequent Dunn’s multiple-comparison tests are shown (only significant differences are drawn; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

aggregates and A-L spherical-agglomerated aggregates. This confirms that physicochemical conditions in addition to temperature and duration modulate the aggregation kinetics of globular proteins and the resulting structure of the aggregates.<sup>28</sup> These aggregates were reported to differ in their digestibility (in terms of extent of digestion and nature of generated peptides), with the small aggregates being more rapidly and extensively hydrolyzed than the large aggregates.<sup>22,28</sup> We there show for the first time that the allergenicity of OVA aggregates is also modified depending on the

aggregation process: the A-s aggregates, which form under conditions in which electrostatic repulsions counterbalance hydrophobic attractions (near the natural pH of stored egg white and low ionic strength), display a reduced allergenicity compared to the A-L aggregates, which form when the electrostatic repulsions are minimal.

Using a mouse model of allergy, we showed that compared to mice sensitized with N, sensitization with both aggregates resulted in a shift from a Th2 profile with the production of specific IgE and IgG<sub>1</sub> to a mixed Th2–Th1 profile with a

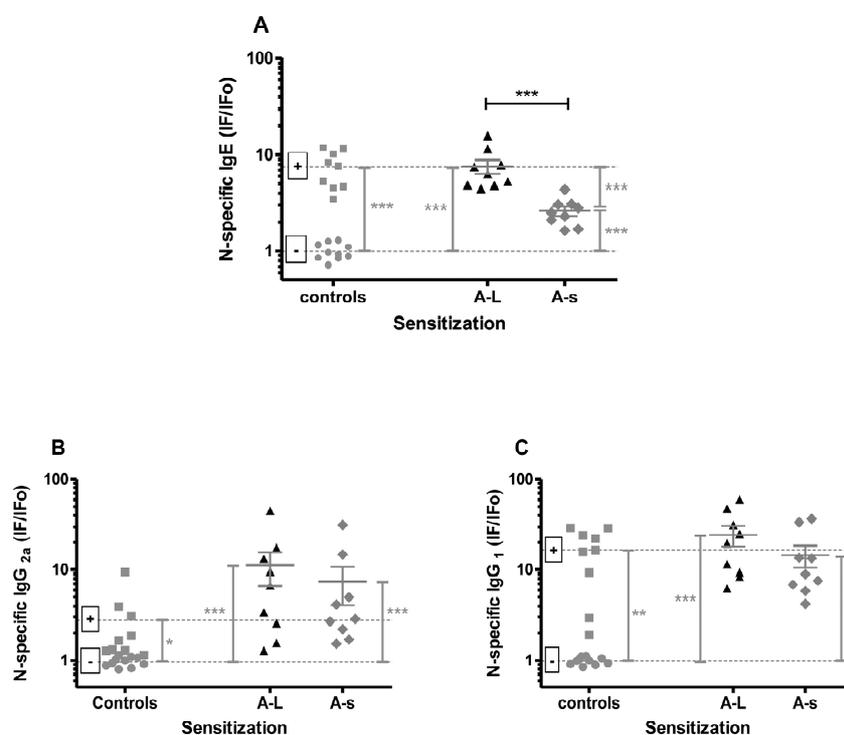


Figure 3. Evaluation of the immune response versus N upon sensitization. N-specific IgE (A), IgG<sub>2a</sub> (B), and IgG<sub>1</sub> (C) were detected by an indirect ELISA in sera from mice of the control groups and mice sensitized with the large (A-L) and small (A-s) aggregates. The results are expressed as the ratio of fluorescence intensities measured with native OVA (IF) over fluorescence intensity measured with PBS (IF<sub>0</sub>). The lines correspond to the mean values for the positive (mice sensitized with nonaggregated OVA) and negative controls. Individual data, along with the mean  $\pm$  SEM and the results of statistical tests of the log transformed data, are presented (A, ANOVA and Bonferroni's test; B and C, Kruskal–Wallis and Dunn's test; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

tendency of higher productions of specific IgG<sub>2a</sub> able to bind to the three OVAs. The allergic reaction measured by ear swelling of mice and the sensitivity of RBL activation upon challenge with native ovalbumin (N) were reduced in groups sensitized with the aggregates compared to N. Several studies reported a similar conclusion about a pro-Th1 shift with various heated OVAs compared to native OVA,<sup>7,9,16</sup> and this pro-Th1 shift was also notably found with glutaraldehyde-polymerized OVA.<sup>20</sup> Comparable results were observed with the isoform Bet v 1d from birch pollen, which had a tendency to form aggregates and induce similar levels of IgE but higher levels of IgG than the Bet v 1a component.<sup>30</sup>

Beyond these observations between native and heated/aggregated allergens, the novelty of this work is to show that how an allergen aggregates also modulates its sensitizing potency. Sensitization with the A-s pushed the Th2/Th1 balance toward a pro-Th1 profile compared to sensitization with the A-L. By producing more IgE able to bind native and aggregated OVA, sensitization with the A-L was greater than sensitization with the A-s. In agreement with these immunoglobulin patterns, the elicitation reaction *in vivo* and *in vitro* upon challenge with N was reduced in mice sensitized with the A-s compared to mice sensitized with the A-L.

How OVA aggregated also modified IgE reactivity. Similar to the sensitization with the native form, sensitization with the A-L produced IgE able to bind to and be cross-linked by the native form better than both aggregates, whereas IgE produced on sensitization with A-s bound to and was cross-linked by A-s and native OVA better than A-L. Differences in degranulation

ability between native and aggregated allergens were previously observed with Ara h 1<sup>31</sup> and Bet v 1,<sup>32</sup> which were explained by differences in flexibility and accessibility to the epitopes in the aggregates as well as differences in the IgE repertoire. Although sensitization with the A-s induced lower levels of IgE, these antibodies were partly directed to particular epitopes present in A-s but not (or masked) in A-L. As previously observed,<sup>6</sup> sensitization with A-L did not induce IgE directed specifically to this form. IgE produced after sensitization with A-L or A-s bound to two identical linear epitopes, which were previously identified: P57–70 in mice sensitized through different sensitization routes (oral, intraperitoneal, and subcutaneous) with raw OVA<sup>33</sup> and P189–204 in humans.<sup>34,35</sup> The specific epitopes on sensitization with A-s would then likely be conformational epitopes, known to dominate immunogenic responses, possibly resulting from the more ordered aggregate structure in A-s than in A-L. Observed differences in immunogenicity and immunoglobulin patterns let us hypothesize that these aggregates could be differently processed by the antigen-presenting cells during the sensitization phase, which should be further investigated.

The mouse model with intraperitoneal sensitization enabled a direct interaction between the allergen and the immune system and more likely corresponded to an acute model of sensitization because no modifications in intestinal histology were observed, despite significant elicitation responses. Both the larger and quicker digestion previously reported<sup>22</sup> and the presently reported lower immunogenicity suggest that there is a lower allergenicity for the A-s compared to the A-L. However,

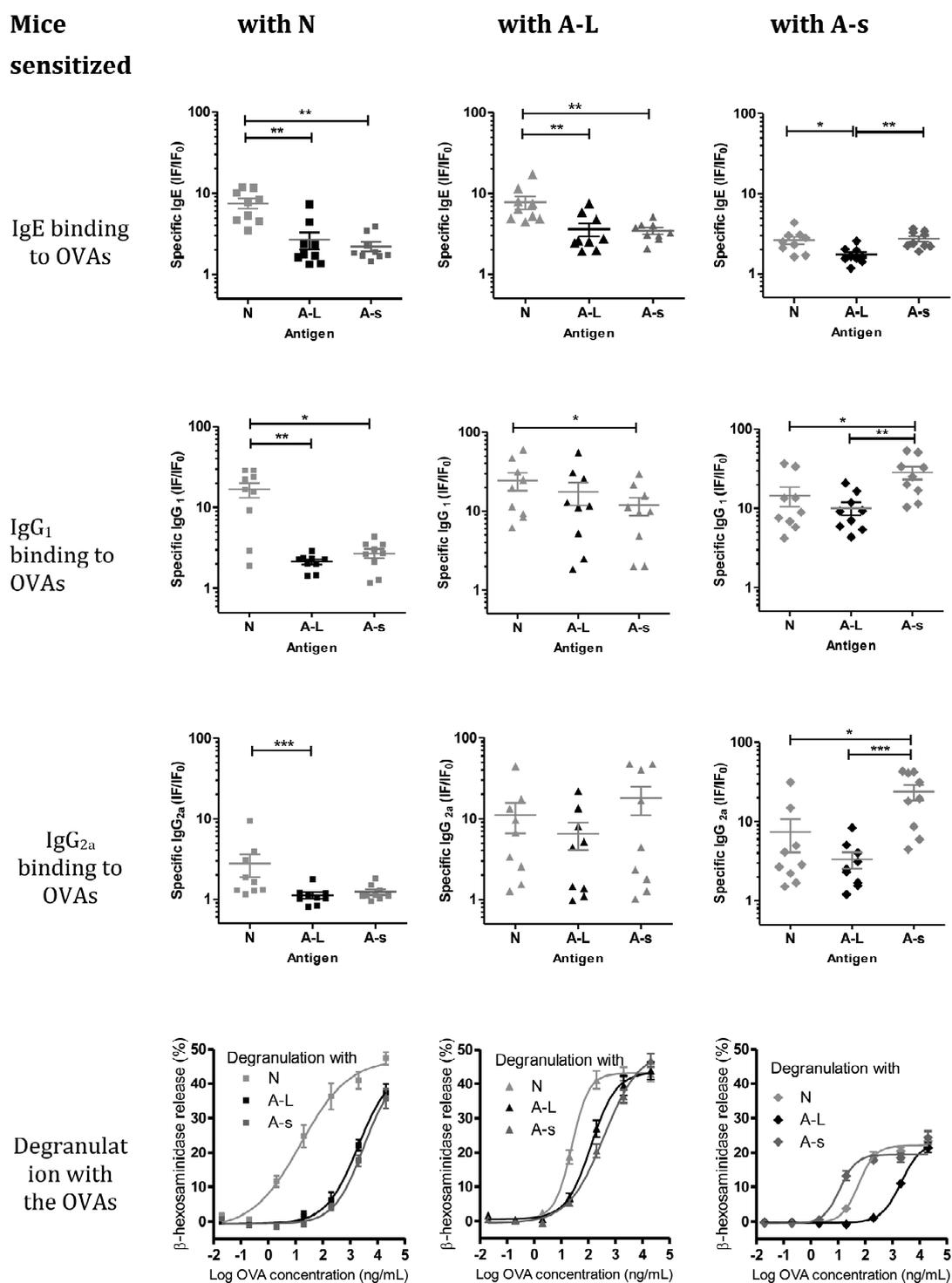


Figure 4. Ig bindings to and degranulation ability of native ovalbumin (N, light gray), large aggregates (A-L, black), or small aggregates (A-s, dark gray) of sera from mice sensitized with N (left), A-L (middle), and A-s (right). For Ig bindings, individual data, along with the mean  $\pm$  SEM and the results of the statistical tests (Friedman test with a subsequent Dunn's multiple-comparison test or repeated measures ANOVA with a subsequent Bonferroni's multiple-comparison test; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ) are presented. For degranulation, means  $\pm$  SEM of six repetitions in triplicate performed with mouse sera pooled by group of sensitization and fitted degranulation curves are presented.

transport of the antigens across the epithelium and the ability of antigens to prime the immune system after transcytosis are other parameters to consider. The limited quantity of

aggregates that could be delivered through the oral route precludes the lower allergenicity of the A-s to be investigated with a mouse model of oral sensitization in which both

- (25) Sakai, S.; Sugawara, T.; Kishi, T.; Yanagimoto, K.; Hirata, T. Effect of glucosamine and related compounds on the degranulation of mast cells and ear swelling induced by dinitrofluorobenzene in mice. *Life Sci.* 2010, *86* (9–10), 337–343.
- (26) Wang, C.-C.; Lin, Y.-R.; Liao, M.-H.; Jan, T.-R. Oral supplementation with areca-derived polyphenols attenuates food allergic responses in ovalbumin-sensitized mice. *BMC Complementary Altern. Med.* 2013, *13* (1), 154.
- (27) Deneroy-Papini, S.; Bodinier, M.; Pineau, F.; Triballeau, S.; Tranquet, O.; Adel-Patient, K.; Moneret-Vautrin, D. A.; Bakan, B.; Marion, D.; Mothes, T.; et al. Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clin. Exp. Allergy* 2011, *41* (10), 1478–1492.
- (28) Bryant, C. M.; McClements, D. J. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends Food Sci. Technol.* 1998, *9* (4), 143–151.
- (29) Gieni, R. S.; Yang, X.; Kelso, A.; Hayglass, K. T. Limiting dilution analysis of CD4 T-cell cytokine production in mice administered native versus polymerized ovalbumin: directed induction of T-helper type-1-like activation. *Immunology* 1996, *87* (1), 119–126.
- (30) Zaborsky, N.; Brunner, M.; Wallner, M.; Himly, M.; Karl, T.; Schwarzenbacher, R.; Ferreira, F.; Achatz, G. Antigen aggregation decides the fate of the allergic immune response. *J. Immunol.* 2010, *184* (2), 725–735.
- (31) Blanc, F.; Vissers, Y. M.; Adel-Patient, K.; Rigby, N. M.; Mackie, A. R.; Gunning, A. P.; Wellner, N. K.; Skov, P. S.; Przybylski-Nicaise, L.; Ballmer-Weber, B.; et al. Boiling peanut Ara h 1 results in the formation of aggregates with reduced allergenicity. *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, *55* (12), 1887–1894.
- (32) Campana, R.; Vrtala, S.; Maderegger, B.; Dall'Antonia, Y.; Zafred, D.; Blatt, K.; Hermann, H.; Focke-Tejkl, M.; Swoboda, I.; Scheiblhofer, S.; et al. Altered IgE epitope presentation: a model for hypoallergenic activity revealed for Bet v 1 trimer. *Mol. Immunol.* 2011, *48* (4), 431–441.
- (33) Mine, Y.; Yang, M. Epitope characterization of ovalbumin in BALB/c mice using different entry routes. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* 2007, *1774* (2), 200–212.
- (34) Mine, Y.; Rupa, P. Fine mapping and structural analysis of immunodominant IgE allergenic epitopes in chicken egg ovalbumin. *Protein Eng., Des. Sel.* 2003, *16* (10), 747–752.
- (35) Benede, S.; Lopez-Exposito, I.; Lopez-Fandino, R.; Molina, E. Identification of IgE-binding peptides in hen egg ovalbumin digested in vitro with human and simulated gastroduodenal fluids. *J. Agric. Food Chem.* 2014, *62* (1), 152–158.

# Références bibliographiques

- Abrahamsson, T. R., Jakobsson, H. E., Andersson, A. F., Björkstén, B., Engstrand, L., & Jenmalm, M. C. (2012). Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *129*(2), 434–40, 440.e1–2. doi:10.1016/j.jaci.2011.10.025
- Accordini, S., Corsico, A., Braggion, M., Gerbase, M., Gislason, D., Gulsvik, A., ... Il, T. (2012). The Cost of Persistent Asthma in Europe: An International Population-Based Study in Adults. *International Archives of Allergy and Immunology*, *160*(1), 93–101. doi:10.1159/000338998
- Adachi, R., Nakamura, R., Sakai, S., Fukutomi, Y., & Teshima, R. (2012). Sensitization to acid-hydrolyzed wheat protein by transdermal administration to BALB/c mice, and comparison with gluten. *Allergy*, *67*(11), 1392–1399. doi:10.1111/all.12018
- Agache, I., Akdis, C., Jutel, M., & Virchow, J. C. (2012). Untangling asthma phenotypes and endotypes. *Allergy*, *67*(7), 835–46. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02832.x
- Al-Shami, A., Spolski, R., Kelly, J., Keane-Myers, A., & Leonard, W. J. (2005). A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model. *The Journal of experimental medicine*, *202*(6), 829–39. doi:10.1084/jem.20050199
- Alduraywish, S., Lodge, C., Campbell, B., Allen, K., Erbas, B., Lowe, A., & Dharmage, S. (2016). The march from early life food sensitization to allergic disease: a systematic review and meta-analyses of birth cohort studies. *Allergy*, *71*(1), 77–89. doi:10.1111/all.12784
- Alduraywish, S., Standl, M., Lodge, C., Abramson, M., Allen, K., Erbas, B., ... Dharmage, S. (2017). Is there a march from early food sensitization to later childhood allergic airway disease? Results from two prospective birth cohort studies. *Pediatric Allergy and Immunology*, *28*(1), 30–37. doi:10.1111/pai.12651
- Allende, M. L., Tuymetova, G., Lee, B. G., Bonifacino, E., Wu, Y.-P. P., & Proia, R. L. (2010). S1P1 receptor directs the release of immature B cells from bone marrow into blood. *The Journal of experimental medicine*, *207*(5), 1113–24. doi:10.1084/jem.20092210
- Amat, F., Saint-Pierre, P., Bourrat, E., Nemni, A., Couderc, R., Boutmy-Deslandes, E., ... Just, J. (2015). Early-Onset Atopic Dermatitis in Children: Which Are the Phenotypes at Risk of Asthma? Results from the ORCA Cohort. *PLOS ONE*, *10*(6), e0131369. doi:10.1371/journal.pone.0131369
- Andreaskos, E., & Papadopoulos, N. G. (2014). IL-25: the missing link between allergy, viral infection, and asthma? *Science translational medicine*, *6*(256), 256fs38. doi:10.1126/scitranslmed.3010273
- Annacker, O., Coombes, J. L., Malmstrom, V., Uhlig, H. H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., ... Powrie, F. (2005). Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *The Journal of experimental medicine*, *202*(8), 1051–61. doi:10.1084/jem.20040662
- Arslanoglu, S., Moro, G. E., Schmitt, J., Tandoi, L., Rizzardi, S., & Boehm, G. (2008). Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *The Journal of nutrition*, *138*(6), 1091–5.
- Artis, D., & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, *517*(7534), 293–301. doi:10.1038/nature14189
- Asero, R. (1998). Effects of birch pollen-specific immunotherapy on apple allergy in birch pollen-hypersensitive patients. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *28*(11), 1368–73.
- Asher, M., Keil, U., Anderson, H., Beasley, R., Crane, J., Martinez, F., ... Williams, H. (1995). International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC): rationale and methods. *European Respiratory Journal*, *8*(3), 483–491. doi:10.1183/09031936.95.08030483

## Références bibliographiques

- Asher, M., Montefort, S., Björkstén, B., Lai, C., Strachan, D., Weiland, S., ... Group, I. (2006). Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *The Lancet*, *368*(9537), 733743. doi:10.1016/S0140-6736(06)69283-0
- Azad, M. B., Konya, T., Guttman, D. S., Field, C. J., Sears, M. R., HayGlass, K. T., ... Kozyrskyj, A. L. (2015). Infant gut microbiota and food sensitization: associations in the first year of life. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *45*(3), 632–43. doi:10.1111/cea.12487
- Baekkevold, E. S., Yamanaka, T., Palframan, R. T., Carlsen, H. S., Reinholt, F. P., von Andrian, U. H., ... Haraldsen, G. (2001). The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *The Journal of experimental medicine*, *193*(9), 1105–12.
- Baggiolini, M., Dewald, B., & Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annual review of immunology*, *15*, 675–705. doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.675
- Bakdash, G., Vogelpoel, L. T., van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L., & de Jong, E. C. (2015). Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells. *Mucosal immunology*, *8*(2), 265–78. doi:10.1038/mi.2014.64
- Bantz, S. K., Zhu, Z., & Zheng, T. (2014). The Atopic March: Progression from Atopic Dermatitis to Allergic Rhinitis and Asthma. *Journal of clinical & cellular immunology*, *5*(2). doi:10.4172/2155-9899.1000202
- Barczyk, A., Pierzchala, W., Caramori, G., Wiaderkiewicz, R., Kaminski, M., Barnes, P. J., & Adcock, I. M. (2014). Decreased percentage of CD4(+)Foxp3(+)TGF-β(+) and increased percentage of CD4(+)IL-17(+) cells in bronchoalveolar lavage of asthmatics. *Journal of inflammation (London, England)*, *11*, 22. doi:10.1186/1476-9255-11-22
- Barlow, J. L., Bellosi, A., Hardman, C. S., Drynan, L. F., Wong, S. H., Cruickshank, J. P., & McKenzie, A. N. (2012). Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *129*(1), 191–8.e1–4. doi:10.1016/j.jaci.2011.09.041
- Bartemes, K. R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G. M., McKenzie, A. N., & Kita, H. (2012). IL-33-responsive lineage- CD25+ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *188*(3), 1503–13. doi:10.4049/jimmunol.1102832
- Bartnikas, L. M., Gurish, M. F., Burton, O. T., Leisten, S., Janssen, E., Oettgen, H. C., ... Oyoshi, M. K. (2013). Epicutaneous sensitization results in IgE-dependent intestinal mast cell expansion and food-induced anaphylaxis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *131*(2), 451–60.e1–6. doi:10.1016/j.jaci.2012.11.032
- Bennett, L. D., Fox, J. M., & Signorel, N. (2011). Mechanisms regulating chemokine receptor activity. *Immunology*, *134*(3), 246–56. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03485.x
- Berin, M., & Sampson, H. (2013). Mucosal Immunology of Food Allergy. *Current Biology*, *23*(9). doi:10.1016/j.cub.2013.02.043
- Berin, M., & Shreffler, W. (2008). TH2 adjuvants: Implications for food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(6), 13111320. doi:10.1016/j.jaci.2008.04.023
- Berlin, C., Bargatze, R. F., Campbell, J. J., von Andrian, U. H., Szabo, M. C., Hasslen, S. R., ... Butcher, E. C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, *80*(3), 413–22.
- Beuther, D., & Sutherland, E. (2007). Overweight, Obesity, and Incident Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *175*(7), 661–666. doi:10.1164/rccm.200611-1717OC

## Références bibliographiques

- Bieber, T. (2008). Atopic dermatitis. *The New England journal of medicine*, *358*(14), 1483–94. doi:10.1056/NEJMra074081
- Bienenstock, J., McDermott, M., Befus, D., & O'Neill, M. (1978). A common mucosal immunologic system involving the bronchus, breast and bowel. *Advances in experimental medicine and biology*, *107*, 53–9.
- Bihouée, T., Bouchaud, G., Chesné, J., Lair, D., Rolland-Debord, C., Braza, F., ... Magnan, A. (2014). Food allergy enhances allergic asthma in mice. *Respiratory Research*, *15*(1), 142. doi:10.1186/s12931-014-0142-x
- Black, M., Smith, N., Porter, A., Jacobsen, S., & Koebnick, C. (2012). Higher Prevalence of Obesity Among Children With Asthma. *Obesity*, *20*(5), 1041–1047. doi:10.1038/oby.2012.5
- Blumchen, K., Gerhold, K., Schwede, M., Niggemann, B., Avagyan, A., Dittrich, A.-M., ... Hamelmann, E. (2006). Effects of established allergen sensitization on immune and airway responses after secondary allergen sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(3), 615–621. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.054
- Bogunovic, M., Ginhoux, F., Helft, J., Shang, L., Hashimoto, D., Greter, M., ... Merad, M. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, *31*(3), 513–25. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.010
- Boniface, K., Bak-Jensen, K. S., Li, Y., Blumenschein, W. M., McGeachy, M. J., McClanahan, T. K., ... de Waal Malefyt, R. (2009). Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling. *The Journal of experimental medicine*, *206*(3), 535–48. doi:10.1084/jem.20082293
- Bouchaud, G., Castan, L., Chesné, J., Braza, F., Aubert, P., Neunlist, M., ... Bodinier, M. (2016). Maternal exposure to GOS/inulin mixture prevents food allergies and promotes tolerance in offspring in mice. *Allergy*, *71*(1), 68–76. doi:10.1111/all.12777
- Bouchaud, G., Gourbeyre, P., Bihouée, T., Aubert, P., Lair, D., Cheminant, M.-A., ... Bodinier, M. (2015). Consecutive Food and Respiratory Allergies Amplify Systemic and Gut but Not Lung Outcomes in Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(28), 6475–6483. doi:10.1021/acs.jafc.5b02338
- Bousquet, J., Kiley, J., Bateman, E. D., Viegi, G., Cruz, A. A., Khaltayev, N., ... Zhi, L. (2010). Prioritised research agenda for prevention and control of chronic respiratory diseases. *European Respiratory Journal*, *36*(5), 995–1001. doi:10.1183/09031936.00012610
- Boyman, O., Kaegi, C., Akdis, M., Bavbek, S., Bossios, A., Chatzipetrou, A., ... Spertini, F. (2015). EAACI IG Biologicals task force paper on the use of biologic agents in allergic disorders. *Allergy*, *70*(7), 727–54. doi:10.1111/all.12616
- Brandt, E., Scribner, T., Akei, H., & Rothenberg, M. (2006). Experimental gastrointestinal allergy enhances pulmonary responses to specific and unrelated allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *118*(2), 420–427. doi:10.1016/j.jaci.2006.06.009
- Brandtzaeg, P., Kiyono, H., Pabst, R., & Russell, M. W. (2008). Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal immunology*, *1*(1), 31–7. doi:10.1038/mi.2007.9
- Branum, A. M., & Lukacs, S. L. (2008). Food allergy among U.S. children: trends in prevalence and hospitalizations. *NCHS data brief*, (10), 1–8.
- Brown, S. J., Asai, Y., Cordell, H. J., Campbell, L. E., Zhao, Y., Liao, H., ... McLean, W. H. (2011). Loss-of-function variants in the filaggrin gene are a significant risk factor for peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *127*(3), 661–7. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.031
- Broxmeyer, H. E., Orschell, C. M., Clapp, D. W., Hangoc, G., Cooper, S., Plett, P. A., ... Srour, E. F. (2005). Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with

## Références bibliographiques

- AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine*, 201(8), 1307–18. doi:10.1084/jem.20041385
- Brusselle, G. G., Kips, J. C., Tavernier, J. H., van der Heyden, J. G., Cuvelier, C. A., Pauwels, R. A., & Bluethmann, H. (1994). Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 24(1), 73–80.
- Budden, K. F., Gellatly, S. L., Wood, D. L., Cooper, M. A., Morrison, M., Hugenholtz, P., & Hansbro, P. M. (2017). Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. *Nature reviews. Microbiology*, 15(1), 55–63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
- Bullens, D. M., Truyen, E., Coteur, L., Dilissen, E., Hellings, P. W., Dupont, L. J., & Ceuppens, J. L. (2006). IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respiratory research*, 7, 135. doi:10.1186/1465-9921-7-135
- Bunting, M. D., Comerford, I., & McColl, S. R. (2011). Finding their niche: chemokines directing cell migration in the thymus. *Immunology and cell biology*, 89(2), 185–96. doi:10.1038/icb.2010.142
- Bunyavanich, S., Shen, N., Grishin, A., Wood, R., Burks, W., Dawson, P., ... Clemente, J. C. (2016). Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 138(4), 1122–1130. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.041
- Burgess, J., Dharmage, S., Byrnes, G., Matheson, M., Gurrin, L., Wharton, C., ... Walters, E. (2008). Childhood eczema and asthma incidence and persistence: A cohort study from childhood to middle age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(2), 280–285. doi:10.1016/j.jaci.2008.05.018
- Burney, P., Summers, C., Chinn, S., Hooper, R., Ree, R., & Lidholm, J. (2010). Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy*, 65(9), 1182–1188. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02346.x
- Busse, W. W., Holgate, S., Kerwin, E., Chon, Y., Feng, J., Lin, J., & Lin, S.-L. L. (2013). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of brodalumab, a human anti-IL-17 receptor monoclonal antibody, in moderate to severe asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 188(11), 1294–302. doi:10.1164/rccm.201212-2318OC
- Byers, M., Calloway, P., Shannon, L., Cunningham, H., Smith, S., Li, F., ... Vines, C. (2008). Arrestin 3 Mediates Endocytosis of CCR7 following Ligation of CCL19 but Not CCL21. *The Journal of Immunology*, 181(7), 4723–4732. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4723
- Bøgh, K. L., Barkholt, V., Rigby, N. M., Mills, E. N., & Madsen, C. B. (2012). Digested Ara h 1 loses sensitizing capacity when separated into fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(11), 2934–42. doi:10.1021/jf2052306
- Bøgh, K. L., van Bilsen, J., Głogowski, R., López-Expósito, I., Bouchaud, G., Blanchard, C., ... O'Mahony, L. (2016). Current challenges facing the assessment of the allergenic capacity of food allergens in animal models. *Clinical and translational allergy*, 6, 21. doi:10.1186/s13601-016-0110-2
- Campbell, J. J., Hedrick, J., Zlotnik, A., Siani, M. A., Thompson, D. A., & Butcher, E. C. (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 381–4.
- Campbell, J. J., Qin, S., Bacon, K. B., Mackay, C. R., & Butcher, E. C. (1996). Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *The Journal of cell biology*, 134(1), 255–66.
- Cassani, B., Villablanca, E., Quintana, F., Love, P., Lacy-Hulbert, A., Blaner, W., ... Mora, J. (2011). Gut-Tropic T Cells That Express Integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 Are Required for Induction of Oral Immune Tolerance in Mice. *Gastroenterology*, 141(6), 2109–2118. doi:10.1053/j.gastro.2011.09.015

## Références bibliographiques

- Castan, Magnan, & Bouchaud. (2017). Chemokine receptors in allergic diseases. *Allergy*, 72(5), 682–690. doi:10.1111/all.13089
- Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., ... Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 111(6), 1293–8.
- Chan, S. M., Turcanu, V., Stephens, A. C., Fox, A. T., Grieve, A. P., & Lack, G. (2012). Cutaneous lymphocyte antigen and  $\alpha 4\beta 7$  T-lymphocyte responses are associated with peanut allergy and tolerance in children. *Allergy*, 67(3), 336–42. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02765.x
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.-J. J., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine*, 198(12), 1875–86. doi:10.1084/jem.20030152
- Chesné, J., Braza, F., Chadeuf, G., Mahay, G., Cheminant, M.-A. A., Loy, J., ... Magnan, A. (2015). Prime role of IL-17A in neutrophilia and airway smooth muscle contraction in a house dust mite-induced allergic asthma model. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 135(6), 1643–1643.e3. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.1872
- Chesné, J., 2014. Mémoire de thèse de doctorat: Rôle de l'IL-17A dans un modèle d'asthme allergique aux acariens pdf.
- Chigaev, A., Wu, Y., Williams, D. B., Smagley, Y., & Sklar, L. A. (2011). Discovery of very late antigen-4 (VLA-4, alpha4beta1 integrin) allosteric antagonists. *The Journal of biological chemistry*, 286(7), 5455–63. doi:10.1074/jbc.M110.162636
- Chinthrajah, R. S., Tupa, D., Prince, B. T., Block, W. M., Rosa, J. S., Singh, A. M., & Nadeau, K. (2015). Diagnosis of Food Allergy. *Pediatric clinics of North America*, 62(6), 1393–408. doi:10.1016/j.pcl.2015.07.009
- Chinthrajah, S. R. (2016). Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL*, 137(4), 14.
- Chinuki, Y., Takahashi, H., Dekio, I., Kaneko, S., Tokuda, R., Nagao, M., ... Morita, E. (2013). Higher allergenicity of high molecular weight hydrolysed wheat protein in cosmetics for percutaneous sensitization. *Contact Dermatitis*, 68(2), 86–93. doi:10.1111/j.1600-0536.2012.02168.x
- Chirido, F. G., Millington, O. R., Beacock-Sharp, H., & Mowat, A. M. (2005). Immunomodulatory dendritic cells in intestinal lamina propria. *European journal of immunology*, 35(6), 1831–40. doi:10.1002/eji.200425882
- Chung C.D., Kuo F., Kumer J., Motani A.S., Lawrence C.E., Henderson W.R. Venkataraman C. (2003). CCR8 is not essential for the development of inflammation in a mouse model of allergic airway disease. *The Journal of Immunology*, 170, 581-587. doi: 10.4049/jimmunol.170.1.581
- Cianferoni, A., & Spergel, J. M. (2009). Food allergy: review, classification and diagnosis. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology*, 58(4), 457–66. doi:10.2332/allergolint.09-RAI-0138
- Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., Tranquet, O., Denery-Papini, S., ... Brossard, C. (2017). How proteins aggregate can reduce allergenicity: comparison of ovalbumin heated under opposite electrostatic conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi:10.1021/acs.jafc.7b00676
- Claude, M., Lupi, R., Bouchaud, G., Bodinier, M., Brossard, C., & Denery-Papini, S. (2016). The thermal aggregation of ovalbumin as large particles decreases its allergenicity for egg allergic patients and in a murine model. *Food Chemistry*, 203, 136–144. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.054

## Références bibliographiques

- Coelho, F. M., Natale, D., Soriano, S. F., Hons, M., Swoger, J., Mayer, J., ... Stein, J. V. (2013). Naive B-cell trafficking is shaped by local chemokine availability and LFA-1-independent stromal interactions. *Blood*, *121*(20), 4101–9. doi:10.1182/blood-2012-10-465336
- Conroy D.M., Jopling L.A., Lloyd C. M., Hodge M.R., Andrew D.P., Williams T.J., Pease J.E., Sabroe I. (2003). CCR4 blockade does not inhibit allergic airways inflammation. *Journal of Leukocytes Biology*, *74*, 558-563.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., & Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, *13*(6), 759–69.
- Coombes, J., Siddiqui, K., Arancibia-Cárcano, C., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., & Powrie, F. (2007). A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(8), 1757–1764. doi:10.1084/jem.20070590
- Cork, M. J., Robinson, D. A., Vasilopoulos, Y., Ferguson, A., Moustafa, M., MacGowan, A., ... Tazi-Ahnini, R. (2006). New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *118*(1), 3–21; quiz 22–3. doi:10.1016/j.jaci.2006.04.042
- Costa, M. F., Bornstein, V. U., Candéa, A. L. L., Henriques-Pons, A., Henriques, M. G., & Penido, C. (2012). CCL25 induces  $\alpha_4\beta_7$  integrin-dependent migration of IL-17+  $\gamma\delta$  T lymphocytes during an allergic reaction. *European journal of immunology*, *42*(5), 1250–60. doi:10.1002/eji.201142021
- Cuello-Garcia, C., Brožek, J., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nuñez, J., Terracciano, L., ... Schünemann, H. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*(4), 952–961. doi:10.1016/j.jaci.2015.04.031
- Curnock, A. P., Logan, M. K., & Ward, S. G. (2002). Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases. *Immunology*, *105*(2), 125–36. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01345.x
- Daubeuf, F., Hachet-Haas, M., Gizzi, P., Gasparik, V., Bonnet, D., Utard, V., ... Galzi, J.-L. L. (2013). An antedrug of the CXCL12 neutraligand blocks experimental allergic asthma without systemic effect in mice. *The Journal of biological chemistry*, *288*(17), 11865–76. doi:10.1074/jbc.M112.449348
- Day, L., Augustin, M. A., Batey, I. L., & Wrigley, C. W. (2006). Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(2), 82–90. doi:10.1016/j.tifs.2005.10.003
- Denery-Papini, S., Bodinier, M., Larré, C., Brossard, C., Pineau, F., Triballeau, S., ... Moneret-Vautrin, D. -A. (2012). Allergy to deamidated gluten in patients tolerant to wheat: specific epitopes linked to deamidation. *Allergy*, *67*(8), 1023–1032. doi:10.1111/j.1398-9995.2012.02860.x
- Denery-Papini, S., Bodinier, M., Pineau, F., Triballeau, S., Tranquet, O., Adel-Patient, K., ... Kasarda, D. (2011). Immunoglobulin-E-binding epitopes of wheat allergens in patients with food allergy to wheat and in mice experimentally sensitized to wheat proteins. *Clinical & Experimental Allergy*, *41*(10), 1478–1492. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03808.x
- Devereux, G., & Seaton, A. (2005). Diet as a risk factor for atopy and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *115*(6), 1109–17; quiz 1118. doi:10.1016/j.jaci.2004.12.1139
- Devreotes, P., & Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *The Journal of biological chemistry*, *278*(23), 20445–8. doi:10.1074/jbc.R300010200
- Dharmage, S., Lowe, A., Matheson, M., Burgess, J., Allen, K., & Abramson, M. (2014). Atopic dermatitis and the atopic march revisited. *Allergy*, *69*(1), 17–27. doi:10.1111/all.12268

## Références bibliographiques

- Di Cesare, A., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2009). The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *The Journal of investigative dermatology*, *129*(6), 1339–50. doi:10.1038/jid.2009.59
- Diesner, S., Bergmayr, C., Pfitzner, B., Assmann, V., Krishnamurthy, D., Starkl, P., ... Untersmayr, E. (2016). A distinct microbiota composition is associated with protection from food allergy in an oral mouse immunization model. *Clinical Immunology*, *173*, 10–18. doi:10.1016/j.clim.2016.10.009
- Du Toit, G., Tsakok, T., Lack, S., & Lack, G. (2016). Prevention of food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *137*(4), 998–1010. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.005
- Du Toit, G., Katz, Y., Sasieni, P., Mesher, D., Maleki, S., Fisher, H., ... Lack, G. (2008). Early consumption of peanuts in infancy is associated with a low prevalence of peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *122*(5), 984–991. doi:10.1016/j.jaci.2008.08.039
- EAACI, European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Global Atlas of Asthma, 2013.pdf.
- Edele, F., Molenaar, R., Gütle, D., Dudda, J. C., Jakob, T., Homey, B., ... Martin, S. F. (2008). Cutting edge: instructive role of peripheral tissue cells in the imprinting of T cell homing receptor patterns. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*(6), 3745–9.
- Ege, M. J., Mayer, M., Normand, A.-C. C., Genuneit, J., Cookson, W. O., Braun-Fahrländer, C., ... von Mutius, E. (2011). Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *The New England journal of medicine*, *364*(8), 701–9. doi:10.1056/NEJMoa1007302
- Eigenmann, P. A., Sicherer, S. H., Borkowski, T. A., Cohen, B. A., & Sampson, H. A. (1998). Prevalence of IgE-mediated food allergy among children with atopic dermatitis. *Pediatrics*, *101*(3), E8.
- Eksteen, B., & Adams, D. H. (2010). GSK-1605786, a selective small-molecule antagonist of the CCR9 chemokine receptor for the treatment of Crohn's disease. *IDrugs : the investigational drugs journal*, *13*(7), 472–81.
- Enrique, E., Pineda, F., Malek, T., Bartra, J., Basagaña, M., Tella, R., ... Cisteró-Bahíma, A. (2005). Sublingual immunotherapy for hazelnut food allergy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with a standardized hazelnut extract. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *116*(5), 1073–9. doi:10.1016/j.jaci.2005.08.027
- Erle, D. J., & Sheppard, D. (2014). The cell biology of asthma. *The Journal of cell biology*, *205*(5), 621–31. doi:10.1083/jcb.201401050
- Evans-Marin, H., Cao, A., Yao, S., Chen, F., He, C., Liu, H., ... Cong, Y. (2015). Unexpected Regulatory Role of CCR9 in Regulatory T Cell Development. *PLOS ONE*, *10*(7), e0134100. doi:10.1371/journal.pone.0134100
- Fahy, J. (2014). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nature Reviews Immunology*, *15*(1), 57–65. doi:10.1038/nri3786
- Farnworth, E. R. (2008). The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of nutrition*, *138*(6), 1250S–4S.
- Feagan, B., Sandborn, W., D'Haens, G., Lee, S., Allez, M., Fedorak, R., ... Chang, D. (2015). Randomised clinical trial: vercirnon, an oral CCR9 antagonist, vs. placebo as induction therapy in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *42*(10), 1170–1181. doi:10.1111/apt.13398
- Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F., & Dvorak, A. M. (1998). Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *The Journal of experimental medicine*, *187*(6), 903–15.
- Ferguson, S. S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews*, *53*(1), 1–24.

## Références bibliographiques

- Finkelman, F. D., Hogan, S. P., Hershey, G. K. K., Rothenberg, M. E., & Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *184*(4), 1663–74. doi:10.4049/jimmunol.0902185
- Fox, A. T., Sasieni, P., du Toit, G., Syed, H., & Lack, G. (2009). Household peanut consumption as a risk factor for the development of peanut allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(2), 417–23. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.014
- Friedman, R. S., Jacobelli, J., & Krummel, M. F. (2006). Surface-bound chemokines capture and prime T cells for synapse formation. *Nature immunology*, *7*(10), 1101–8. doi:10.1038/ni1384
- Fuchs, O., Genuneit, J., Latzin, P., Büchele, G., Horak, E., Loss, G., ... Mutius, E. (2012). Farming environments and childhood atopy, wheeze, lung function, and exhaled nitric oxide. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *130*(2), 382–388.e6. doi:10.1016/j.jaci.2012.04.049
- Furrie, E., Turner, M. W., & Strobel, S. (1994). Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system. *Immunology*, *83*(4), 562–7.
- Galand, C., Leyva-Castillo, J., Yoon, J., Han, A., Lee, M., McKenzie, A., ... Geha, R. (2016). IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(5), 1356–1366. doi:10.1016/j.jaci.2016.03.056
- Galicia-Carreón, J., Santacruz, C., Ayala-Balboa, J., Robles-Contreras, A., Perez-Tapia, S. M., Garfias, Y., ... Jiménez-Martínez, M. C. (2013). An imbalance between frequency of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and CCR4+ and CCR9+ circulating helper T cells is associated with active perennial allergic conjunctivitis. *Clinical & developmental immunology*, *2013*, 919742. doi:10.1155/2013/919742
- Galli, S., & Tsai, M. (2012). IgE and mast cells in allergic disease. *Nature Medicine*, *18*(5), 693–704. doi:10.1038/nm.2755
- Gasparik, V., Daubeuf, F., Hachet-Haas, M., Rohmer, F., Gizzi, P., Haiech, J., ... Frossard, N. (2012). Prodrugs of a CXC Chemokine-12 (CXCL12) Neutraligand Prevent Inflammatory Reactions in an Asthma Model in Vivo. *ACS medicinal chemistry letters*, *3*(1), 10–4. doi:10.1021/ml200017d
- Gauvreau, G., O'Byrne, P., Boulet, L.-P., Wang, Y., Cockcroft, D., Bigler, J., ... Parnes, J. (2014). Effects of an Anti-TSLP Antibody on Allergen-Induced Asthmatic Responses. *The New England Journal of Medicine*, *370*(22), 2102–2110. doi:10.1056/NEJMoa1402895
- GBDS, Healthcare Access and Quality Index based on mortality from causes amenable to personal health care in 195 countries and territories, 1990-2015: a novel analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. (2017). *Lancet (London, England)*, *390*(10091), 231–266. doi:10.1016/S0140-6736(17)30818-8
- Geuking, M. B., Cahenzli, J., Lawson, M. A., Ng, D. C., Slack, E., Hapfelmeier, S., ... Macpherson, A. J. (2011). Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity*, *34*(5), 794–806. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.021
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *14*(8), 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- Gonzalo, J. A., Lloyd, C. M., Peled, A., Delaney, T., Coyle, A. J., & Gutierrez-Ramos, J. C. (2000). Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(1), 499–508.

## Références bibliographiques

- Goubier, A., Dubois, B., Gheit, H., Joubert, G., Villard-Truc, F., Asselin-Paturel, C., ... Kaiserlian, D. (2008). Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*, *29*(3), 464–75. doi:10.1016/j.immuni.2008.06.017
- Gould, H. J., & Sutton, B. J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nature reviews. Immunology*, *8*(3), 205–17. doi:10.1038/nri2273
- Graham, M., & Nadeau, K. (2014). Lessons learned from mice and man: Mimicking human allergy through mouse models. *Clinical Immunology*, *155*(1). doi:10.1016/j.clim.2014.08.002
- Gregory, L., & Lloyd, C. (2011). Orchestrating house dust mite-associated allergy in the lung. *Trends in Immunology*, *32*(9), 402–411. doi:10.1016/j.it.2011.06.006
- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, *32*, 659–702. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120145
- Grindebacke, H., Stenstad, H., Quiding-Järbrink, M., Waldenström, J., Adlerberth, I., Wold, A. E., & Rudin, A. (2009). Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4+CD25high regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(7), 4360–70. doi:10.4049/jimmunol.0901091
- Guarnieri, M., & Balmes, J. R. (2014). Outdoor air pollution and asthma. *Lancet (London, England)*, *383*(9928), 1581–92. doi:10.1016/S0140-6736(14)60617-6
- Gunn, M. D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J. G., Rosen, S. D., & Williams, L. T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(1), 258–63.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., ... Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*, *34*(2), 237–46. doi:10.1016/j.immuni.2011.01.016
- Haldar, P., Brightling, C., Hargadon, B., Gupta, S., Monteiro, W., Sousa, A., ... Pavord, I. (2009). Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma. *The New England Journal of Medicine*, *360*(10), 973–984. doi:10.1056/NEJMoa0808991
- Haldar, P., Pavord, I. D., Shaw, D. E., Berry, M. A., Thomas, M., Brightling, C. E., ... Green, R. H. (2008). Cluster analysis and clinical asthma phenotypes. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *178*(3), 218–224. doi:10.1164/rccm.200711-1754OC
- Halim, T. Y., Krauss, R. H., Sun, A. C., & Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity*, *36*(3), 451–63. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.020
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M. A., Germain, R. N., & Lambrecht, B. N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nature medicine*, *15*(4), 410–6. doi:10.1038/nm.1946
- Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A., Kool, M., ... Lambrecht, B. N. (2010). Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *The Journal of experimental medicine*, *207*(10), 2097–111. doi:10.1084/jem.20101563
- Han, H., Roan, F., Johnston, L. K., Smith, D. E., Bryce, P. J., & Ziegler, S. F. (2017). IL-33 promotes gastrointestinal allergy in a TSLP-independent manner. *Mucosal immunology*. doi:10.1038/mi.2017.61

## Références bibliographiques

- Han, H., Thelen, T., Comeau, M., & Ziegler, S. (2014). Thymic stromal lymphopoietin-mediated epicutaneous inflammation promotes acute diarrhea and anaphylaxis. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(12), 5442–5452. doi:10.1172/JCI77798
- Han, H., Xu, W., Headley, M. B., Jessup, H. K., Lee, K. S., Omori, M., ... Ziegler, S. F. (2012). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP)-mediated dermal inflammation aggravates experimental asthma. *Mucosal immunology*, *5*(3), 342–51. doi:10.1038/mi.2012.14
- Han, H., & Ziegler, S. (2017). Intradermal administration of IL-33 induces allergic airway inflammation. *Scientific Reports*, *7*(1), 1706. doi:10.1038/s41598-017-01863-5
- Harb, H., Tol, E., Heine, H., Braaksma, M., Gross, G., Overkamp, K., ... Garn, H. (2013). Neonatal supplementation of processed supernatant from *Lactobacillus rhamnosus* GG improves allergic airway inflammation in mice later in life. *Clinical & Experimental Allergy*, *43*(3), 353–364. doi:10.1111/cea.12047
- Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature immunology*, *6*(11), 1123–32. doi:10.1038/ni1254
- Harris, N. L., Watt, V., Ronchese, F., & Le Gros, G. (2002). Differential T cell function and fate in lymph node and nonlymphoid tissues. *The Journal of experimental medicine*, *195*(3), 317–26. doi:10.1084/jem.20011558
- Hartl, D., Koller, B., Mehlhorn, A. T., Reinhardt, D., Nicolai, T., Schendel, D. J., ... Krauss-Etschmann, S. (2007). Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *119*(5), 1258–66. doi:10.1016/j.jaci.2007.02.023
- Hayday, A. C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annual review of immunology*, *18*, 975–1026. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.975
- He, R., Kim, H. Y., Yoon, J., Oyoshi, M. K., MacGinnitie, A., Goya, S., ... Geha, R. S. (2009). Exaggerated IL-17 response to epicutaneous sensitization mediates airway inflammation in the absence of IL-4 and IL-13. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *124*(4), 761–70.e1. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.040
- He, R., Oyoshi, M. K., Jin, H., & Geha, R. S. (2007). Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15817–22. doi:10.1073/pnas.0706942104
- Ho, M. H., Wong, W. H., & Chang, C. (2014). Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clinical reviews in allergy & immunology*, *46*(3), 225–40. doi:10.1007/s12016-012-8339-6
- Hogenkamp, A., Knippels, L., Garssen, J., & Esch, B. (2015). Supplementation of Mice with Specific Nondigestible Oligosaccharides during Pregnancy or Lactation Leads to Diminished Sensitization and Allergy in the Female Offspring. *Journal of Nutrition*, *145*(5), 9961002. doi:10.3945/jn.115.210401
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature medicine*, *18*(5), 673–83. doi:10.1038/nm.2731
- Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T., & Leung, D. (2006). Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *118*(1), 178–89. doi:10.1016/j.jaci.2006.03.047
- Hong, X., Hao, K., Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Tsai, H.-J. J., Liu, X., ... Wang, X. (2015). Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children. *Nature communications*, *6*, 6304. doi:10.1038/ncomms7304

## Références bibliographiques

- Hourihane, J. O., Dean, T. P., & Warner, J. O. (1996). Peanut allergy in relation to heredity, maternal diet, and other atopic diseases: results of a questionnaire survey, skin prick testing, and food challenges. *BMJ (Clinical research ed.)*, *313*(7056), 518–21.
- Hsu, C.-L. L., Neilsen, C. V., & Bryce, P. J. (2010). IL-33 is produced by mast cells and regulates IgE-dependent inflammation. *PLoS one*, *5*(8), e11944. doi:10.1371/journal.pone.0011944
- Hua, X., Goedert, J. J., Pu, A., Yu, G., & Shi, J. (2016). Allergy associations with the adult fecal microbiota: Analysis of the American Gut Project. *EBioMedicine*, *3*, 172–9. doi:10.1016/j.ebiom.2015.11.038
- Huang, A. J., Manning, J. E., Bandak, T. M., Ratau, M. C., Hanser, K. R., & Silverstein, S. C. (1993). Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells. *The Journal of cell biology*, *120*(6), 1371–80.
- Humbert, M., Durham, S. R., Ying, S., Kimmitt, P., Barkans, J., Assoufi, B., ... Corrigan, C. J. (1996). IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against “intrinsic” asthma being a distinct immunopathologic entity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *154*(5), 1497–504. doi:10.1164/ajrccm.154.5.8912771
- Hussain, M., Borcard, L., Walsh, K. P., Pena Rodriguez, M., Mueller, C., Kim, B. S., ... Noti, M. (2017). Basophil-derived IL-4 promotes epicutaneous antigen sensitization concomitant with the development of food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*. doi:10.1016/j.jaci.2017.02.035
- Iliev, I. D., Spadoni, I., Mileti, E., Matteoli, G., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., ... Rescigno, M. (2009). Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*, *58*(11), 1481–9. doi:10.1136/gut.2008.175166
- Illi, S., Depner, M., Genuneit, J., Horak, E., Loss, G., Strunz-Lehner, C., ... Mutius, E. (2012). Protection from childhood asthma and allergy in Alpine farm environments—the GABRIEL Advanced Studies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *129*(6), 1470–1477.e6. doi:10.1016/j.jaci.2012.03.013
- Islam, S. A., & Luster, A. D. (2012). T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nature medicine*, *18*(5), 705–15. doi:10.1038/nm.2760
- Isolauri, E., Arvola, T., Sütas, Y., Moilanen, E., & Salminen, S. (2000). Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *30*(11), 1604–10.
- Ivković-Jureković, I. (2015). Oral allergy syndrome in children. *International dental journal*, *65*(3), 164–8. doi:10.1111/idj.12164
- Iwata, M., Hirakiyama, A., Eshima, Y., Kagechika, H., Kato, C., & Song, S.-Y. (2004). Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity*, *21*(4), 527–538. doi:10.1016/j.immuni.2004.08.011
- Jacobsen, E. A., Zellner, K. R., Colbert, D., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2011). Eosinophils regulate dendritic cells and Th2 pulmonary immune responses following allergen provocation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *187*(11), 6059–68. doi:10.4049/jimmunol.1102299
- Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J. L., ... Agace, W. W. (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine*, *205*(9), 2139–49. doi:10.1084/jem.20080414
- Jarvis, D., Newson, R., Lotvall, J., Hastan, D., Tomassen, P., Keil, T., ... Burney, P. (2012). Asthma in adults and its association with chronic rhinosinusitis: The GA2LEN survey in Europe. *Allergy*, *67*(1), 91–98. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02709.x

## Références bibliographiques

- Jensen-Jarolim, E., Pali-Schöll, I., & Roth-Walter, F. (2017). Outstanding animal studies in allergy I. From asthma to food allergy and anaphylaxis. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, *17*(3), 169–179. doi:10.1097/ACI.0000000000000363
- Jin, T., & Hereld, D. (2006). Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *European journal of cell biology*, *85*(9-10), 905–13. doi:10.1016/j.ejcb.2006.04.008
- Johansson-Lindbom, B., & Agace, W. W. (2007). Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological reviews*, *215*, 226–42. doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00482.x
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Förster, R., & Agace, W. W. (2005). Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *The Journal of experimental medicine*, *202*(8), 1063–73. doi:10.1084/jem.20051100
- Johnston, L. K., Chien, K. B., & Bryce, P. J. (2014). The immunology of food allergy. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(6), 2529–34. doi:10.4049/jimmunol.1303026
- Just, J. (2011). De la dermatite atopique à l'asthme. *Revue Française d'Allergologie*, *51*(7), 629632. doi:10.1016/j.reval.2011.07.010
- Kagnoff, M. F. (1978). Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. I. priming of precursor cytotoxic T cells by antigen feeding. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *120*(2), 395–9.
- Kalindjian, S. B., Kadnur, S. V., Hewson, C. A., Venkateshappa, C., Juluri, S., Kristam, R., ... McVey, D. (2016). A New Series of Orally Bioavailable Chemokine Receptor 9 (CCR9) Antagonists; Possible Agents for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of medicinal chemistry*, *59*(7), 3098–111. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01840
- Kalliomäki, M., Kirjavainen, P., Eerola, E., Kero, P., Salminen, S., & Isolauri, E. (2001). Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *107*(1), 129–34. doi:10.1067/mai.2001.111237
- Kamekura, R., Kojima, T., Takano, K., Go, M., Sawada, N., & Himi, T. (2012). The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *42*(2), 218–28. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x
- Kansas, G. S. (1996). Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, *88*(9), 3259–87.
- Kearley, J., Buckland, K. F., Mathie, S. A., & Lloyd, C. M. (2009). Resolution of allergic inflammation and airway hyperreactivity is dependent upon disruption of the T1/ST2-IL-33 pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine*, *179*(9), 772–81. doi:10.1164/rccm.200805-666oc
- Keely, S., Talley, N. J., & Hansbro, P. M. (2012). Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal immunology*, *5*(1), 7–18. doi:10.1038/mi.2011.55
- Kelleher, M., Dunn-Galvin, A., Gray, C., Murray, D., Kiely, M., Kenny, L., ... Hourihane, J. (2016). Skin barrier impairment at birth predicts food allergy at 2 years of age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *137*(4), 1111–1116.e8. doi:10.1016/j.jaci.2015.12.1312
- Kelly, E., Bailey, C. P., & Henderson, G. (2008). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization. *British journal of pharmacology*, *153* Suppl 1, S379–88. doi:10.1038/sj.bjp.0707604
- Kim, H., Kim, H., Kim, N.-R., Jeong, B., Lee, J., Jang, S., & Chung, D. (2015). Oral administration of *Lactobacillus plantarum* lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models. *Journal of Microbiology*, *53*(1), 47–52. doi:10.1007/s12275-015-4483-z

## Références bibliographiques

- Klein Wolterink, R. G., Kleinjan, A., van Nimwegen, M., Bergen, I., de Bruijn, M., Levani, Y., & Hendriks, R. W. (2012). Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. *European journal of immunology*, *42*(5), 1106–16. doi:10.1002/eji.201142018
- Koga, C., Kabashima, K., Shiraishi, N., Kobayashi, M., & Tokura, Y. (2008). Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, *128*(11), 2625–30. doi:10.1038/jid.2008.111
- Koplin, J. J. (2015). Epidemiology of food allergy and food-induced anaphylaxis: is there really a Western world epidemic? *current opinion in allergy*, *15*, 5.
- Koplin, J. J., Peters, R. L., Ponsonby, A.-L. L., Gurrin, L. C., Hill, D., Tang, M. L., ... Allen, K. J. (2014). Increased risk of peanut allergy in infants of Asian-born parents compared to those of Australian-born parents. *Allergy*, *69*(12), 1639–47. doi:10.1111/all.12487
- Kouzaki, H., O'Grady, S. M., Lawrence, C. B., & Kita, H. (2009). Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(2), 1427–34. doi:10.4049/jimmunol.0900904
- Krug, N., Hohlfeld, J., Kirsten, A.-M., Kornmann, O., Beeh, K., Kappeler, D., ... Renz, H. (2015). Allergen-Induced Asthmatic Responses Modified by a GATA3-Specific DNase. *The New England Journal of Medicine*, *372*(21), 1987–1995. doi:10.1056/NEJMoa1411776
- Kufareva, I., Salanga, C. L., & Handel, T. M. (2015). Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunology and cell biology*, *93*(4), 372–83. doi:10.1038/icb.2015.15
- Kulis, M., Wright, B. L., Jones, S. M., & Burks, A. W. (2015). Diagnosis, management, and investigational therapies for food allergies. *Gastroenterology*, *148*(6), 1132–42. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.034
- Kumar, R. K., Herbert, C., & Foster, P. S. (2016). Mouse models of acute exacerbations of allergic asthma. *Respirology (Carlton, Vic.)*, *21*(5), 842–9. doi:10.1111/resp.12760
- Laatikainen, T., Herten, L., Koskinen, J. -P., Mäkelä, M., Jousilahti, P., Kosunen, T., ... Haahtela, T. (2011). Allergy gap between Finnish and Russian Karelia on increase. *Allergy*, *66*(7), 886–892. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02533.x
- Lack, G. (2012). Update on risk factors for food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *129*(5), 1187–97. doi:10.1016/j.jaci.2012.02.036
- Lambrecht, B., & Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine*, *18*(5), 684–692. doi:10.1038/nm.2737
- Lambrecht, B., & Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, *16*(1), 45–56. doi:10.1038/ni.3049
- Lampen, A., Meyer, S., Arnhold, T., & Nau, H. (2000). Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *295*(3), 979–85.
- Leckie, M.J., Brincke A.T., Khan J., Diamant Z., O'Connor B. J., Walls C.M.,... Barnes P.J. (2000). Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet (London, England)*, *356*(9248), pp.2144–8.
- Laurière, M., Pecquet, C., Bouchez-Mahiout, I., Snégaroff, J., Bayrou, O., Raison-Peyron, N., & Vigan, M. (2006). Hydrolysed wheat proteins present in cosmetics can induce immediate hypersensitivities. *Contact Dermatitis*, *54*(5), 283–289. doi:10.1111/j.0105-1873.2006.00830.x
- Lee, H.-J. J., Lee, N. R., Jung, M., Kim, D. H., & Choi, E. H. (2015). Atopic March from Atopic Dermatitis to Asthma-Like Lesions in NC/Nga Mice Is Accelerated or Aggravated by Neutralization of Stratum

## Références bibliographiques

- Corneum but Partially Inhibited by Acidification. *The Journal of investigative dermatology*, 135(12), 3025–33. doi:10.1038/jid.2015.333
- Lewkowich, I. P., Herman, N. S., Schleifer, K. W., Dance, M. P., Chen, B. L., Dienger, K. M., ... Wills-Karp, M. (2005). CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function. *The Journal of experimental medicine*, 202(11), 1549–61. doi:10.1084/jem.20051506
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), 678–89. doi:10.1038/nri2156
- Leyden, J. J., Marples, R. R., & Kligman, A. M. (1974). Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*, 90(5), 525–30.
- Leyva-Castillo, J. M., Hener, P., Jiang, H., & Li, M. (2013). TSLP produced by keratinocytes promotes allergen sensitization through skin and thereby triggers atopic march in mice. *The Journal of investigative dermatology*, 133(1), 154–63. doi:10.1038/jid.2012.239
- Lim, H. W., Lee, J., Hillsamer, P., & Kim, C. H. (2008). Human Th17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3+ regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(1), 122–9.
- Liu, C., Saito, F., Liu, Z., Lei, Y., Uehara, S., Love, P., ... Takahama, Y. (2006). Coordination between CCR7- and CCR9-mediated chemokine signals in prevascular fetal thymus colonization. *Blood*, 108(8), 2531–9. doi:10.1182/blood-2006-05-024190
- Lordan, J. L., Bucchieri, F., Richter, A., Konstantinidis, A., Holloway, J. W., Thornber, M., ... Davies, D. E. (2002). Cooperative effects of Th2 cytokines and allergen on normal and asthmatic bronchial epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(1), 407–14.
- Love, P. E., & Bhandoola, A. (2011). Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nature reviews. Immunology*, 11(7), 469–77. doi:10.1038/nri2989
- Lugogo, N. L., Bappanad, D., & Kraft, M. (2011). Obesity, metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(11), 1120–6. doi:10.1016/j.bbagen.2011.09.004
- Lugogo, N. L., Kraft, M., & Dixon, A. E. (2010). Does obesity produce a distinct asthma phenotype? *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 108(3), 729–34. doi:10.1152/jappphysiol.00845.2009
- Lukacs, N. W., Berlin, A., Schols, D., Skerlj, R. T., & Bridger, G. J. (2002). AMD3100, a CXCR4 antagonist, attenuates allergic lung inflammation and airway hyperreactivity. *The American journal of pathology*, 160(4), 1353–60. doi:10.1016/S0002-9440(10)62562-X
- Luyt, D., Ball, H., Kirk, K., & Stiefel, G. (2016). Diagnosis and management of food allergy in children. *Paediatrics and Child Health*, 26(7), 287–291. doi:10.1016/j.paed.2016.02.005
- López-Pacheco, C., Soldevila, G., Pont, G., Hernández-Pando, R., & García-Zepeda, E. (2016). CCR9 Is a Key Regulator of Early Phases of Allergic Airway Inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1–16. doi:10.1155/2016/3635809
- Mackay, D., Haw, S., Ayres, J. G., Fischbacher, C., & Pell, J. P. (2010). Smoke-free legislation and hospitalizations for childhood asthma. *The New England journal of medicine*, 363(12), 1139–45. doi:10.1056/NEJMoa1002861
- Maggi, E. (1998). The TH1/TH2 paradigm in allergy. *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering*, 3(4), 233–44. doi:10.1016/S1380-2933(97)10005-7
- Malmberg, L., Saarinen, K., Pelkonen, A., Savilahti, E., & Mäkelä, M. (2010). Cow's milk allergy as a predictor of bronchial hyperresponsiveness and airway inflammation at school age. *Clinical & Experimental Allergy*, 40(10), 1491–1497. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03567.x

## Références bibliographiques

- Mamessier, E., Nieves, A., Lorec, A. -M., Dupuy, P., Pinot, D., Pinet, C., ... Magnan, A. (2008). T-cell activation during exacerbations: a longitudinal study in refractory asthma. *Allergy*, *63*(9), 1202–1210. doi:10.1111/j.1398-9995.2008.01687.x
- Manni, M. L., Trudeau, J. B., Scheller, E. V., Mandalapu, S., Elloso, M. M., Kolls, J. K., ... Alcorn, J. F. (2014). The complex relationship between inflammation and lung function in severe asthma. *Mucosal immunology*, *7*(5), 1186–98. doi:10.1038/mi.2014.8
- Marenholz, I., Nickel, R., Rüschemdorf, F., Schulz, F., Esparza-Gordillo, J., Kerscher, T., ... Lee, Y.-A. A. (2006). Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *118*(4), 866–71. doi:10.1016/j.jaci.2006.07.026
- Martin, C., Burdon, P. C., Bridger, G., Gutierrez-Ramos, J. C., Williams, T. J., & Rankin, S. M. (2003). Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, *19*(4), 583–93.
- Matsukura, S., Stellato, C., Georas, S. N., Casolaro, V., Plitt, J. R., Miura, K., ... Schleimer, R. P. (2001). Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, *24*(6), 755–61. doi:10.1165/ajrcmb.24.6.4351
- McEver, R. P., & Cummings, R. D. (1997). Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation*, *100*(11 Suppl), S97–103.
- Medoff, B. D., Thomas, S. Y., & Luster, A. D. (2008). T cell trafficking in allergic asthma: the ins and outs. *Annual review of immunology*, *26*, 205–32. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090312
- Ménard, S., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2010). Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal immunology*, *3*(3), 247–59. doi:10.1038/mi.2010.5
- Mercier, F. E., Ragu, C., & Scadden, D. T. (2011). The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nature reviews. Immunology*, *12*(1), 49–60. doi:10.1038/nri3132
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., ... Rot, A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell*, *91*(3), 385–95.
- Millán, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P., & Ridley, A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature cell biology*, *8*(2), 113–23. doi:10.1038/ncb1356
- Milner, J. D., Stein, D. M., McCarter, R., & Moon, R. Y. (2004). Early infant multivitamin supplementation is associated with increased risk for food allergy and asthma. *Pediatrics*, *114*(1), 27–32.
- Mishra, A., Hogan, S. P., Lee, J. J., Foster, P. S., & Rothenberg, M. E. (1999). Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *The Journal of clinical investigation*, *103*(12), 1719–27. doi:10.1172/JCI6560
- Mitchell, P. D., & O'Byrne, P. M. (2017). Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest*, *151*(6), 1338–1344. doi:10.1016/j.chest.2016.10.042
- Miyasaka, M., & Tanaka, T. (2004). Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. *Nature reviews. Immunology*, *4*(5), 360–70. doi:10.1038/nri1354
- Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Pagé, N., ... Chakir, J. (2001). IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *108*(3), 430–8. doi:10.1067/mai.2001.117929

## Références bibliographiques

- Mora, J., Bono, M., Manjunath, N., Weninger, W., Cavanagh, L., Roseblatt, M., & Andrian, U. (2003). Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, *424*(6944), 88–93. doi:10.1038/nature01726
- Morita, H., Arae, K., Ohno, T., Kajiwara, N., Oboki, K., Matsuda, A., ... Nakae, S. (2012). ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. *Allergy International*, *61*(2), 265–273. doi:10.2332/allergolint.11-OA-0379
- Morita, H., Moro, K., & Koyasu, S. (2016). Innate lymphoid cells in allergic and nonallergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *138*(5), 1253–1264. doi:10.1016/j.jaci.2016.09.011
- Moro, G., Arslanoglu, S., Stahl, B., Jelinek, J., Wahn, U., & Boehm, G. (2006). A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age. *Archives of Disease in Childhood*, *91*(10), 814–819. doi:10.1136/adc.2006.098251
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., & Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology*, *25*(2), 75–84. doi:10.1016/j.it.2003.12.005
- Mosmann, T. R., & Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*, *17*(3), 138–46.
- Murdoch, C., & Finn, A. (2000). Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*, *95*(10), 3032–43.
- Muro, S., Minshall, E. M., & Hamid, Q. A. (2000). The pathology of chronic asthma. *Clinics in chest medicine*, *21*(2), 225–44.
- Mutalithas, K., Guillen, C., Raport, C., Kolbeck, R., Soler, D., Brightling, C., ... Wardlaw, A. (2010). Expression of CCR8 is increased in asthma. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *40*(8), 1175–85. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03504.x
- Muto, T., Fukuoka A., Kabashima K., Ziegler S.F., Nakanishi K., Matsushita K., Yoshimoto T. (2014). The role of basophils and proallergic cytokines, TSLP and IL-33, in cutaneously sensitized food allergy. *International Immunology*, *26*(10), pp.539–549.
- Nair, P., Pizzichini, M. M. M., Kjarsgaard, M., Inman, M. D., Efthimiadis, A., Pizzichini, E., ... O'Byrne, P. M. (2009). Mepolizumab for prednisone-dependent asthma with sputum eosinophilia. *The New England journal of medicine*, *360*(10), 985–93. doi:10.1056/NEJMoa0805435
- Nakajima, S., Roswit, W. T., Look, D. C., & Holtzman, M. J. (1995). A hierarchy for integrin expression and adhesiveness among T cell subsets that is linked to TCR gene usage and emphasizes V delta 1+ gamma delta T cell adherence and tissue retention. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*(3), 1117–31.
- Nathan, A. T., Peterson, E. A., Chakir, J., & Wills-Karp, M. (2009). Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(3), 612–8. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.006
- Neel, N. F., Schutyser, E., Sai, J., Fan, G.-H. H., & Richmond, A. (2005). Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine & growth factor reviews*, *16*(6), 637–58. doi:10.1016/j.cytogfr.2005.05.008
- Nembrini, C., Marsland, B., & Kopf, M. (2009). IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *123*(5), 986–994. doi:10.1016/j.jaci.2009.03.033
- Ngan, J., & Kind, L. S. (1978). Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *120*(3), 861–5.

## Références bibliographiques

- Nie, Y., Waite, J., Brewer, F., Sunshine, M.-J. J., Littman, D. R., & Zou, Y.-R. R. (2004). The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *The Journal of experimental medicine*, *200*(9), 1145–56. doi:10.1084/jem.20041185
- Niess, J. H., Brand, S., Gu, X., Landsman, L., Jung, S., McCormick, B. A., ... Reinecker, H.-C. C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5707), 254–8. doi:10.1126/science.1102901
- Nirula, A., Nilsen, J., Klekotka, P., Kricorian, G., Erondur, N., Towne, J., ... Budelsky, A. (2016). Effect of IL-17 receptor A blockade with brodalumab in inflammatory diseases. *Rheumatology*, *55*(suppl 2), ii43–ii55. doi:10.1093/rheumatology/kew346
- Nolz, J. C., Starbeck-Miller, G. R., & Harty, J. T. (2011). Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions. *Immunotherapy*, *3*(10), 1223–33. doi:10.2217/imt.11.100
- Norment, A. M., Bogatzki, L. Y., Gantner, B. N., & Bevan, M. J. (2000). Murine CCR9, a chemokine receptor for thymus-expressed chemokine that is up-regulated following pre-TCR signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *164*(2), 639–48.
- Novak, N. (2012). An update on the role of human dendritic cells in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *129*(4), 879–86. doi:10.1016/j.jaci.2012.01.062
- Nowak-Wegrzyn, A., Szajewska, H., & Lack, G. (2017). Food allergy and the gut. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, *14*(4), 241–257. doi:10.1038/nrgastro.2016.187
- Nwaru, B., Hickstein, L., Panesar, S., Roberts, G., Muraro, A., & Sheikh, A. (2014). Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy*, *69*(8), 992–1007. doi:10.1111/all.12423
- Okada, T., Ngo, V. N., Ekland, E. H., Förster, R., Lipp, M., Littman, D. R., & Cyster, J. G. (2002). Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *The Journal of experimental medicine*, *196*(1), 65–75.
- Olaussen, R., Karlsson, M., Lundin, K., Jahnsen, J., Brandtzaeg, P., & Farstad, I. (2007). Reduced Chemokine Receptor 9 on Intraepithelial Lymphocytes in Celiac Disease Suggests Persistent Epithelial Activation. *Gastroenterology*, *132*(7), 2371–2382. doi:10.1053/j.gastro.2007.04.023
- Osborne, N., Koplin, J., Martin, P., Gurrin, L., Lowe, A., Matheson, M., ... Investigators, H. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE-mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *127*(3), 668676.e2. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.039
- Oyoshi, M. K., Elkhail, A., Scott, J. E., Wurbel, M.-A. A., Hornick, J. L., Campbell, J. J., & Geha, R. S. (2011). Epicutaneous challenge of orally immunized mice redirects antigen-specific gut-homing T cells to the skin. *The Journal of clinical investigation*, *121*(6), 2210–20. doi:10.1172/JCI43586
- O'Sullivan, M. G., Thornton, G., O'Sullivan, G. C., & Collins, J. K. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality? *Trends in Food Science & Technology*, *3*, 309–314. doi:10.1016/S0924-2244(10)80018-4
- Pabst, O. (2012). Trafficking of regulatory T cells in the intestinal immune system. *International Immunology*, *25*(3), 139–143. doi:10.1093/intimm/dxs113
- Pabst, O., & Mowat, A. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal immunology*, *5*(3), 232–9. doi:10.1038/mi.2012.4
- Pakhale, S., Doucette, S., Vandemheen, K., Boulet, L.-P. P., McIvor, R. A., Fitzgerald, J. M., ... Aaron, S. D. (2010). A comparison of obese and nonobese people with asthma: exploring an asthma-obesity interaction. *Chest*, *137*(6), 1316–23. doi:10.1378/chest.09-2491

## Références bibliographiques

- Palaniyandi, S., Tomei, E., Li, Z., Conrad, D. H., & Zhu, X. (2011). CD23-dependent transcytosis of IgE and immune complex across the polarized human respiratory epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *186*(6), 3484–96. doi:10.4049/jimmunol.1002146
- Panina-Bordignon, P., Papi, A., Mariani, M., Di Lucia, P., Casoni, G., Bellettato, C., ... Sinigaglia, F. (2001). The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. *The Journal of clinical investigation*, *107*(11), 1357–64. doi:10.1172/JCI12655
- Papadakis, K. A., Landers, C., Prehn, J., Kouroumalis, E. A., Moreno, S. T., Gutierrez-Ramos, J.-C. C., ... Targan, S. R. (2003). CC chemokine receptor 9 expression defines a subset of peripheral blood lymphocytes with mucosal T cell phenotype and Th1 or T-regulatory 1 cytokine profile. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *171*(1), 159–65.
- Papadakis, K. A., Prehn, J., Nelson, V., Cheng, L., Binder, S. W., Ponath, P. D., ... Targan, S. R. (2000). The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *165*(9), 5069–76. doi:10.4049/jimmunol.165.9.5069
- Papadakis, K., Prehn, J., Moreno, S., Cheng, L., Kouroumalis, E., Deem, R., ... Targan, S. (2001). CCR9–Positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology*, *121*(2), 246–254. doi:10.1053/gast.2001.27154
- Papathoma, E., Triga, M., Fouzas, S., & Dimitriou, G. (2016). Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, *27*(4), 419–24. doi:10.1111/pai.12552
- Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H. H., ... Dong, C. (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature immunology*, *6*(11), 1133–41. doi:10.1038/ni1261
- Parlaman, J. P., Oron, A. P., Uspal, N. G., DeJong, K. N., & Tieder, J. S. (2016). Emergency and Hospital Care for Food-Related Anaphylaxis in Children. *Hospital pediatrics*, *6*(5), 269–74. doi:10.1542/hpeds.2015-0153
- Pecaric-Petkovic, T., Didichenko, S. A., Kaempfer, S., Spiegl, N., & Dahinden, C. A. (2009). Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood*, *113*(7), 1526–34. doi:10.1182/blood-2008-05-157818
- Perkin, M. R., & Lack, G. (2016). Introducing Allergenic Foods in Infants. *The New England journal of medicine*, *375*(8), e16. doi:10.1056/NEJMc1607281
- Perry, T. T., Conover-Walker, M. K., Pomés, A., Chapman, M. D., & Wood, R. A. (2004). Distribution of peanut allergen in the environment. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *113*(5), 973–6. doi:10.1016/j.jaci.2004.02.035
- Peters, A. S., Kellberger, J., Vogelberg, C., Dressel, H., Windstetter, D., Weinmayr, G., ... Radon, K. (2010). Prediction of the incidence, recurrence, and persistence of atopic dermatitis in adolescence: a prospective cohort study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *126*(3), 590–5.e1–3. doi:10.1016/j.jaci.2010.06.020
- Pham, T. H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C. G., & Cyster, J. G. (2008). S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*, *28*(1), 122–33. doi:10.1016/j.immuni.2007.11.017
- Pilette, C., Francis, J. N., Till, S. J., & Durham, S. R. (2004). CCR4 ligands are up-regulated in the airways of atopic asthmatics after segmental allergen challenge. *The European respiratory journal*, *23*(6), 876–84. doi:10.1183/09031936.04.00102504

## Références bibliographiques

- Platts-Mills, T. A. (2015). The allergy epidemics: 1870-2010. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *136*(1), 3–13. doi:10.1016/j.jaci.2015.03.048
- Prescott, S., Pawankar, R., Allen, K., Campbell, D., Sinn, J., Fiocchi, A., ... Lee, B.-W. (2013). A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organization Journal*, *6*(1), 1–12. doi:10.1186/1939-4551-6-21
- RACKEMANN, F. M. (1947). A working classification of asthma. *The American journal of medicine*, *3*(5), 601–6.
- Ransohoff, R. M. (2009). Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*, *31*(5), 711–21. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.010
- Ray, A., Khare, A., Krishnamoorthy, N., Qi, Z., & Ray, P. (2010). Regulatory T cells in many flavors control asthma. *Mucosal immunology*, *3*(3), 216–29. doi:10.1038/mi.2010.4
- Reed, C. E., & Kita, H. (2004). The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *114*(5), 997–1008; quiz 1009. doi:10.1016/j.jaci.2004.07.060
- Reikvam, D. H., Erofeev, A., Sandvik, A., Grcic, V., Jahnsen, F. L., Gaustad, P., ... Johansen, F.-E. E. (2011). Depletion of murine intestinal microbiota: effects on gut mucosa and epithelial gene expression. *PLoS one*, *6*(3), e17996. doi:10.1371/journal.pone.0017996
- Rescigno, M., & Di Sabatino, A. (2009). Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation*, *119*(9), 2441–50. doi:10.1172/JCI39134
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., ... Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, *2*(4), 361–7. doi:10.1038/86373
- Reynolds, A. R., & Hazen, A. (1893). The Water-Supply of Chicago: Its Source and Sanitary Aspects. *Public health papers and reports*, *19*, 146–51.
- Ritter, S. L., & Hall, R. A. (2009). Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *10*(12), 819–30. doi:10.1038/nrm2803
- Rivas, M., Burton, O., Wise, P., Zhang, Y., Hobson, S., Lloret, M., ... Chatila, T. (2012). A microbiota signature associated with experimental food allergy promotes allergic sensitization and anaphylaxis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *131*(1). doi:10.1016/j.jaci.2012.10.026
- Rivera-Nieves, J., Ho, J., Bamias, G., Ivashkina, N., Ley, K., Oppermann, M., & Cominelli, F. (2006). Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology*, *131*(5), 1518–29. doi:10.1053/j.gastro.2006.08.031
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, *137*(3 Suppl 2), 830S–7S.
- Roberts, G., Patel, N., Levi-Schaffer, F., Habibi, P., & Lack, G. (2003). Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *112*(1), 168–74.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., ... Kay, A. B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *The New England journal of medicine*, *326*(5), 298–304. doi:10.1056/NEJM199201303260504
- Rona, R., Keil, T., Summers, C., Gislason, D., Zuidmeer, L., Sodergren, E., ... Madsen, C. (2007). The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *120*(3), 638646. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.026

## Références bibliographiques

- Rothenberg, M. E. (2004). Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113(1), 11–28; quiz 29. doi:10.1016/j.jaci.2003.10.047
- Ruane, D., Brane, L., Reis, B. S., Cheong, C., Poles, J., Do, Y., ... Mehandru, S. (2013). Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*, 210(9), 1871–88. doi:10.1084/jem.20122762
- Ruane, D. T., & Lavelle, E. C. (2011). The role of CD103<sup>+</sup> dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. *Frontiers in immunology*, 2, 25. doi:10.3389/fimmu.2011.00025
- Rudd, C. E., Taylor, A., & Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological reviews*, 229(1), 12–26. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00770.x
- Rudders, S. A., Arias, S. A., & Camargo, C. A. (2014). Trends in hospitalizations for food-induced anaphylaxis in US children, 2000-2009. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 134(4), 960–2.e3. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.018
- Rutten, E. P., Spruit, M. A., Franssen, F. M., Buurman, W. A., Wouters, E. F., & Lenaerts, K. (2014). GI symptoms in patients with COPD. *Chest*, 145(6), 1437–8. doi:10.1378/chest.14-0285
- Saliganti, V., Kapila, R., Sharma, R., & Kapila, S. (2015). Feeding probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (MTCC 5897) fermented milk to suckling mothers alleviates ovalbumin-induced allergic sensitisation in mice offspring. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1168–1179. doi:10.1017/S000711451500286X
- Sampson, H. A. (2004). Update on food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113(5), 805–19; quiz 820. doi:10.1016/j.jaci.2004.03.014
- Saruta, M., Yu, Q. T., Avanesyan, A., Fleshner, P. R., Targan, S. R., & Papadakis, K. A. (2007). Phenotype and effector function of CC chemokine receptor 9-expressing lymphocytes in small intestinal Crohn's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), 3293–300.
- Sather, B. D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowiec, M., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., & Campbell, D. J. (2007). Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1335–47. doi:10.1084/jem.20070081
- Saunders, S. P., Moran, T., Floudas, A., Wurlod, F., Kaszlikowska, A., Salimi, M., ... Fallon, P. G. (2016). Spontaneous atopic dermatitis is mediated by innate immunity, with the secondary lung inflammation of the atopic march requiring adaptive immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 137(2), 482–91. doi:10.1016/j.jaci.2015.06.045
- Savage, J., Sicherer, S., & Wood, R. (2016). The Natural History of Food Allergy. *The journal of allergy and clinical immunology. In practice*, 4(2), 196–203; quiz 204. doi:10.1016/j.jaip.2015.11.024
- Schuh J.M, Power C.A., Proudfoot A.E., Kunkel S.L., Lukacs N.W., Hogaboam C.M. (2002). Airway hyperresponsiveness, but not airway remodeling, is attenuated during chronic pulmonary allergic responses to *Aspergillus* in CCR4<sup>-/-</sup> mice. *The FASEB Journal*, 16(10), 1313-1315. doi:10.1096/fj.02-0193fje
- Schulz, O., Hammerschmidt, S. I., Moschovakis, G. L., & Förster, R. (2016). Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics. *Annual review of immunology*, 34, 203–42. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055649
- Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E. K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W. W., & Pabst, O. (2009). Intestinal CD103<sup>+</sup>, but not CX3CR1<sup>+</sup>, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *The Journal of experimental medicine*, 206(13), 3101–14. doi:10.1084/jem.20091925
- Schumann, K., Lämmermann, T., Brückner, M., Legler, D. F., Polleux, J., Spatz, J. P., ... Sixt, M. (2010). Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*, 32(5), 703–13. doi:10.1016/j.immuni.2010.04.017

## Références bibliographiques

- Semlali, A., Jacques, E., Koussih, L., Gounni, A. S., & Chakir, J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-induced human asthmatic airway epithelial cell proliferation through an IL-13-dependent pathway. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(4), 844–50. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.044
- Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W., & Bourne, H. R. (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science (New York, N.Y.)*, *287*(5455), 1037–40.
- Shimura, S., Takai, T., Iida, H., Maruyama, N., Ochi, H., Kamijo, S., ... Ikeda, S. (2016). Epicutaneous Allergic Sensitization by Cooperation between Allergen Protease Activity and Mechanical Skin Barrier Damage in Mice. *Journal of Investigative Dermatology*, *136*(7), 1408–1417. doi:10.1016/j.jid.2016.02.810
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2006). 9. Food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *117*(2 Suppl Mini-Primer), S470–5. doi:10.1016/j.jaci.2005.05.048
- Sicherer, S. H., & Sampson, H. A. (2010). Food allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(2 Suppl 2), S116–25. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028
- Sidbury, R., Tom, W. L., Bergman, J. N., Cooper, K. D., Silverman, R. A., Berger, T. G., ... Eichenfield, L. F. (2014). Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *71*(6), 1218–33. doi:10.1016/j.jaad.2014.08.038
- Siddiqui, K., & Powrie, F. (2008). CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. *Mucosal Immunology*, *1*(1s), S34–S38. doi:10.1038/mi.2008.43
- Simpson, M. R., Dotterud, C. K., Storrø, O., Johnsen, R., & Øien, T. (2015). Perinatal probiotic supplementation in the prevention of allergy related disease: 6 year follow up of a randomised controlled trial. *BMC dermatology*, *15*, 13. doi:10.1186/s12895-015-0030-1
- Smit, J. J., Willemsen, K., Hassing, I., Fiechter, D., Storm, G., van Bloois, L., ... Pieters, R. H. H. (2011). Contribution of classic and alternative effector pathways in peanut-induced anaphylactic responses. *PloS one*, *6*(12), e28917. doi:10.1371/journal.pone.0028917
- Smyth, L. J., Eustace, A., Kolsum, U., Blaikely, J., & Singh, D. (2010). Increased airway T regulatory cells in asthmatic subjects. *Chest*, *138*(4), 905–12. doi:10.1378/chest.09-3079
- Sobko, T., Schiött, J., Ehlin, A., Lundberg, J., Montgomery, S., & Norman, M. (2010). Neonatal sepsis, antibiotic therapy and later risk of asthma and allergy. *Paediatric and perinatal epidemiology*, *24*(1), 88–92. doi:10.1111/j.1365-3016.2009.01080.x
- Sokol, C., & Luster, A. (2015). The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(5), a016303. doi:10.1101/cshperspect.a016303
- Spahn, T. W., Weiner, H. L., Rennert, P. D., Lügering, N., Fontana, A., Domschke, W., & Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *European journal of immunology*, *32*(4), 1109–13. doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<#60;1109::AID-IMMU1109>#62;3.0.CO;2-K
- Spergel, J. M., Mizoguchi, E., Brewer, J. P., Martin, T. R., Bhan, A. K., & Geha, R. S. (1998). Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *The Journal of clinical investigation*, *101*(8), 1614–22. doi:10.1172/JCI1647
- Spergel, J. M., & Paller, A. S. (2003). Atopic dermatitis and the atopic march. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *112*(6 Suppl), S118–27. doi:10.1016/j.jaci.2003.09.033

## Références bibliographiques

- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Santo, J., Eberl, G., ... Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13(2), 145–149. doi:10.1038/nri3365
- Stefka, A. T., Feehley, T., Tripathi, P., Qiu, J., McCoy, K., Mazmanian, S. K., ... Nagler, C. R. (2014). Commensal bacteria protect against food allergen sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(36), 13145–50. doi:10.1073/pnas.1412008111
- Stein, J. V., Rot, A., Luo, Y., Narasimhaswamy, M., Nakano, H., Gunn, M. D., ... von Andrian, U. H. (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine*, 191(1), 61–76.
- Stone, M. J., Hayward, J. A., Huang, C., E Huma, Z., & Sanchez, J. (2017). Mechanisms of Regulation of the Chemokine-Receptor Network. *International journal of molecular sciences*, 18(2). doi:10.3390/ijms18020342
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6710), 1259–60. doi:10.1136/bmj.299.6710.1259
- Su, Y., Raghuwanshi, S. K., Yu, Y., Nanney, L. B., Richardson, R. M., & Richmond, A. (2005). Altered CXCR2 signaling in beta-arrestin-2-deficient mouse models. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 175(8), 5396–402.
- Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., & Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 159(4), 1739–45.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6), 977–88. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.016
- Sullivan, P., Ghushchyan, V., Slejko, J., Belozeroff, V., Globe, D., & Lin, S.-L. (2011). The burden of adult asthma in the United States: Evidence from the Medical Expenditure Panel Survey. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), 363–369.e3. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.042
- Tang, H., Cao, W., Kasturi, S. P., Ravindran, R., Nakaya, H. I., Kundu, K., ... Pulendran, B. (2010). The T helper type 2 response to cysteine proteases requires dendritic cell-basophil cooperation via ROS-mediated signaling. *Nature immunology*, 11(7), 608–17. doi:10.1038/ni.1883
- Tang, M. L., Ponsonby, A.-L. L., Orsini, F., Tey, D., Robinson, M., Su, E. L., ... Donath, S. (2015). Administration of a probiotic with peanut oral immunotherapy: A randomized trial. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 135(3), 737–44.e8. doi:10.1016/j.jaci.2014.11.034
- Tariq, S., Matthews, S., Hakim, E., & Arshad, S. (2000). Egg allergy in infancy predicts respiratory allergic disease by 4 years of age. *Pediatric Allergy and Immunology*, 11(3), 162–167. doi:10.1034/j.1399-3038.2000.00077.x
- To, T., Stanojevic, S., Moores, G., Gershon, A., Bateman, E., Cruz, A., & Boulet, L.-P. (2012). Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey. *BMC Public Health*, 12(1), 1–8. doi:10.1186/1471-2458-12-204
- Tordesillas, L., Goswami, R., Benedé, S., Grishina, G., Dunkin, D., Järvinen, K., ... Berin, M. (2014). Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *Journal of Clinical Investigation*, 124(11), 4965–4975. doi:10.1172/JCI75660
- Torgerson, T. R., Linane, A., Moes, N., Anover, S., Mateo, V., Rieux-Laucat, F., ... Ruemmele, F. M. (2007). Severe food allergy as a variant of IPEX syndrome caused by a deletion in a noncoding region of the FOXP3 gene. *Gastroenterology*, 132(5), 1705–17. doi:10.1053/j.gastro.2007.02.044

## Références bibliographiques

- Trompette, A., Gollwitzer, E., Yadava, K., Sichelstiel, A., Sprenger, N., Ngom-Bru, C., ... Marsland, B. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature Medicine*, *20*(2), 159–166. doi:10.1038/nm.3444
- Turner, P. J., Gowland, M. H., Sharma, V., Ierodiakonou, D., Harper, N., Garcez, T., ... Boyle, R. J. (2015). Increase in anaphylaxis-related hospitalizations but no increase in fatalities: an analysis of United Kingdom national anaphylaxis data, 1992-2012. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *135*(4), 956–63.e1. doi:10.1016/j.jaci.2014.10.021
- Utsch, L., Logiantara, A., Ree, R., & Rijt, L. (2017). Experimental food allergy to peanut enhances the immune response to house dust mite in the airways of mice. *Clinical & Experimental Allergy*, *47*(1), 121–128. doi:10.1111/cea.12799
- Van der Hulst, A. E., Klip, H., & Brand, P. L. (2007). Risk of developing asthma in young children with atopic eczema: a systematic review. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *120*(3), 565–9. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.042
- Varjonen, E., Petman, L., & Mäkinen-Kiljunen, S. (2000). Immediate contact allergy from hydrolyzed wheat in a cosmetic cream. *Allergy*, *55*(3), 294–296. doi:10.1034/j.1398-9995.2000.00516.x
- Vassallo, M. F., & Camargo, C. A. (2010). Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *126*(2), 217–22. doi:10.1016/j.jaci.2010.06.011
- Velez, E., Galdeano, C., Carmuega, E., Weill, R., Bonet, M., & Perdígón, G. (2015). Probiotic fermented milk consumption modulates the allergic process induced by ovalbumin in mice. *British Journal of Nutrition*, *114*(4), 566–576. doi:10.1017/S0007114515001981
- Venkataraman, D., Soto-Ramírez, N., Kurukulaaratchy, R. J., Holloway, J. W., Karmaus, W., Ewart, S. L., ... Erlewyn-Lajeunesse, M. (2014). Filaggrin loss-of-function mutations are associated with food allergy in childhood and adolescence. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *134*(4), 876–882.e4. doi:10.1016/j.jaci.2014.07.033
- Venter, C., Hasan Arshad, S., Grundy, J., Pereira, B., Bernie Clayton, C., Voigt, K., ... Dean, T. (2010). Time trends in the prevalence of peanut allergy: three cohorts of children from the same geographical location in the UK. *Allergy*, *65*(1), 103–8. doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02176.x
- Vestergaard, C., Yoneyama, H., Murai, M., Nakamura, K., Tamaki, K., Terashima, Y., ... Matsushima, K. (1999). Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *Journal of Clinical Investigation*, *104*(8), 1097–1105. doi:10.1172/JCI7613
- Visness, C. M., London, S. J., Daniels, J. L., Kaufman, J. S., Yeatts, K. B., Siega-Riz, A.-M. M., ... Zeldin, D. C. (2009). Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *123*(5), 1163–9, 1169.e1–4. doi:10.1016/j.jaci.2008.12.1126
- Von Andrian, U. H., & Mempel, T. R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature reviews. Immunology*, *3*(11), 867–78. doi:10.1038/nri1222
- Von Hundelshausen, P., Weber, K. S., Huo, Y., Proudfoot, A. E., Nelson, P. J., Ley, K., & Weber, C. (2001). RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation*, *103*(13), 1772–7.
- Von Kobyletzki, L. B., Bornehag, C.-G. G., Hasselgren, M., Larsson, M., Lindström, C. B., & Svensson, Å. (2012). Eczema in early childhood is strongly associated with the development of asthma and rhinitis in a prospective cohort. *BMC dermatology*, *12*, 11. doi:10.1186/1471-5945-12-11

## Références bibliographiques

- Vos, A., Esch, B., Stahl, B., M'Rabet, L., Folkerts, G., Nijkamp, F., & Garssen, J. (2007). Dietary supplementation with specific oligosaccharide mixtures decreases parameters of allergic asthma in mice. *International immunopharmacology*, *7*(12), 1582–7. doi:10.1016/j.intimp.2007.07.024
- Vroon, A., Heijnen, C. J., & Kavelaars, A. (2006). GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *Journal of leukocyte biology*, *80*(6), 1214–21. doi:10.1189/jlb.0606373
- Wagner, N., Löhler, J., Kunkel, E. J., Ley, K., Leung, E., Krissansen, G., ... Müller, W. (1996). Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature*, *382*(6589), 366–70. doi:10.1038/382366a0
- Waite, K. J. (1995). Blackley and the development of hay fever as a disease of civilization in the nineteenth century. *Medical history*, *39*(2), 186–96.
- Walker, J. K., Fong, A. M., Lawson, B. L., Savov, J. D., Patel, D. D., Schwartz, D. A., & Lefkowitz, R. J. (2003). Beta-arrestin-2 regulates the development of allergic asthma. *The Journal of clinical investigation*, *112*(4), 566–74. doi:10.1172/JCI17265
- Walters, M., Ebsworth, K., Sullivan, T., Zhang, P., Powers, J., Jaen, J., & Schall, T. (2013). CCR9 inhibition does not interfere with the development of immune tolerance to oral antigens. *Immunology Letters*, *151*(1-2), 44–47. doi:10.1016/j.imlet.2013.01.006
- Walters, M. J., Wang, Y., Lai, N., Baumgart, T., Zhao, B. N., Dairaghi, D. J., ... Schall, T. J. (2010). Characterization of CCX282-B, an orally bioavailable antagonist of the CCR9 chemokine receptor, for treatment of inflammatory bowel disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, *335*(1), 61–9. doi:10.1124/jpet.110.169714
- Wan, H., Winton, H. L., Soeller, C., Taylor, G. W., Gruenert, D. C., Thompson, P. J., ... Robinson, C. (2001). The transmembrane protein occludin of epithelial tight junctions is a functional target for serine peptidases from faecal pellets of *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, *31*(2), 279–94.
- Wang, J., Visness, C. M., & Sampson, H. A. (2005). Food allergen sensitization in inner-city children with asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *115*(5), 1076–80. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.014
- WAO, world allergy organization, 2012. White book on allergy 2011-2012: executive summary.pdf.
- Wavrin, S., Bernard, H., Wal, J.-M., & Adel-Patient, K. (2014). Cutaneous or Respiratory Exposures to Peanut Allergens in Mice and Their Impacts on Subsequent Oral Exposure. *International Archives of Allergy and Immunology*, *164*(3), 189–199. doi:10.1159/000363444
- Weidinger, S., & Novak, N. (2016). Atopic dermatitis. *The Lancet*, *387*(10023), 1109–1122. doi:10.1016/S0140-6736(15)00149-X
- Wendt, E., & Keshav, S. (2015). CCR9 antagonism: potential in the treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical and experimental gastroenterology*, *8*, 119–30. doi:10.2147/CEG.S48305
- Wenzel, S. (2001). Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *The Lancet*, *368*(9537), 804–813. doi:10.1016/S0140-6736(06)69290-8
- Wenzel, S. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nature Medicine*, *18*(5), 716–725. doi:10.1038/nm.2678
- Wenzel, S., Castro, M., Corren, J., Maspero, J., Wang, L., Zhang, B., ... Teper, A. (2016). Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting  $\beta_2$  agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial. *The Lancet*, *388*(10039), 31–44. doi:10.1016/S0140-6736(16)30307-5

## Références bibliographiques

- Wenzel, S., Ford, L., Pearlman, D., Spector, S., Sher, L., Skobieranda, F., ... Pirozzi, G. (2013). Dupilumab in Persistent Asthma with Elevated Eosinophil Levels. *The New England Journal of Medicine*, *368*, 2455–2466. doi:10.1056/NEJMoa1304048
- WENZEL, S., SCHWARTZ, L., LANGMACK, E., HALLIDAY, J., TRUDEAU, J., GIBBS, R., & CHU, H. (1999). Evidence That Severe Asthma Can Be Divided Pathologically into Two Inflammatory Subtypes with Distinct Physiologic and Clinical Characteristics. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *160*(3), 1001–1008. doi:10.1164/ajrccm.160.3.9812110
- Wermers, J. D., McNamee, E. N., Wurbel, M.-A. A., Jedlicka, P., & Rivera-Nieves, J. (2011). The chemokine receptor CCR9 is required for the T-cell-mediated regulation of chronic ileitis in mice. *Gastroenterology*, *140*(5), 1526–35.e3. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.044
- Williams, H., Stewart, A., von Mutius, E., Cookson, W., & Anderson, H. R. (2008). Is eczema really on the increase worldwide? *The Journal of allergy and clinical immunology*, *121*(4), 947–54.e15. doi:10.1016/j.jaci.2007.11.004
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., & Donaldson, D. D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science (New York, N.Y.)*, *282*(5397), 2258–61.
- WILSON, J. W. (1947). Dutrochet and the cell theory. *Isis; an international review devoted to the history of science and its cultural influences*, *37*(107-108), 14–21.
- Wilson, R., Whitehead, G., Nakano, H., Free, M., Kolls, J., & Cook, D. (2009). Allergic Sensitization through the Airway Primes Th17-dependent Neutrophilia and Airway Hyperresponsiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(8), 720–730. doi:10.1164/rccm.200904-0573OC
- Wolfe, B. L., & Trejo, J. (2007). Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *8*(5), 462–70. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00551.x
- Wong, C. K., Ho, C. Y., Ko, F. W., Chan, C. H., Ho, A. S., Hui, D. S., & Lam, C. W. (2001). Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. *Clinical and experimental immunology*, *125*(2), 177–83.
- Woodruff, P., Modrek, B., Choy, D., Jia, G., Abbas, A., Ellwanger, A., ... Fahy, J. (2009). T-helper Type 2-driven Inflammation Defines Major Subphenotypes of Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *180*(5), 388–395. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M. W., Hintzen, G., Bernhardt, G., ... Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, *203*(3), 519–27. doi:10.1084/jem.20052016
- Worbs, T., Mempel, T. R., Bölter, J., von Andrian, U. H., & Förster, R. (2007). CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, *204*(3), 489–95. doi:10.1084/jem.20061706
- Wurbel, M. A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Meffre, E., Nussenzweig, M. C., Richelme, M., ... Malissen, B. (2001). Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a reduction in T-cell receptor gamma delta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood*, *98*(9), 2626–32. doi:10.1182/blood.V98.9.2626
- Wurbel, M., Philippe, J., Nguyen, C., Victorero, G., Freeman, T., Wooding, P., ... Naquet, P. (2000). The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *European Journal of Immunology*, *30*(1), 262–271. doi:10.1002/1521-4141(200001)30:1<262::AID-IMMU262>3.0.CO;2-0
- Wurbel, M.-A. A., Malissen, M., Guy-Grand, D., Malissen, B., & Campbell, J. J. (2007). Impaired accumulation of antigen-specific CD8 lymphocytes in chemokine CCL25-deficient intestinal epithelium and lamina propria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(12), 7598–606.

## Références bibliographiques

- Wurbel, M.-A., McIntire, M., Dwyer, P., & Fiebiger, E. (2011). CCL25/CCR9 Interactions Regulate Large Intestinal Inflammation in a Murine Model of Acute Colitis. *PLoS ONE*, *6*(1), e16442. doi:10.1371/journal.pone.0016442
- Yang, Q., Li, G., Zhu, Y., Liu, L., Chen, E., Turnquist, H., ... Lu, B. (2011). IL-33 synergizes with TCR and IL-12 signaling to promote the effector function of CD8<sup>+</sup> T cells. *European journal of immunology*, *41*(11), 3351–60. doi:10.1002/eji.201141629
- Youn, B. S., Kim, C. H., Smith, F. O., & Broxmeyer, H. E. (1999). TECK, an efficacious chemoattractant for human thymocytes, uses GPR-9-6/CCR9 as a specific receptor. *Blood*, *94*(7), 2533–6.
- Yu, L. C., Yang, P. C., Berin, M. C., Di Leo, V., Conrad, D. H., McKay, D. M., ... Perdue, M. H. (2001). Enhanced transepithelial antigen transport in intestine of allergic mice is mediated by IgE/CD23 and regulated by interleukin-4. *Gastroenterology*, *121*(2), 370–81.
- Yu, W., Freeland, D. M. H. M., & Nadeau, K. C. (2016). Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nature reviews. Immunology*, *16*(12), 751–765. doi:10.1038/nri.2016.111
- Zaballos, A., Gutiérrez, J., Varona, R., Ardavin, C., & Márquez, G. (1999). Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *162*(10), 5671–5.
- Zabel, B. A., Agace, W. W., Campbell, J. J., Heath, H. M., Parent, D., Roberts, A. I., ... Andrew, D. P. (1999). Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *The Journal of experimental medicine*, *190*(9), 1241–56.
- Zhang, Z., Hener, P., Frossard, N., Kato, S., Metzger, D., Li, M., & Chambon, P. (2009). Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(5), 1536–41. doi:10.1073/pnas.0812668106
- Zhu, S., Bing, Y., Wang, X., Yu, Q., Wang, Y., Xu, S., ... Zhou, R. (2014). CCL25/CCR9 Interactions Regulate the Function of iNKT Cells in Oxazolone-Induced Colitis in Mice. *PLoS ONE*, *9*(6). doi:10.1371/journal.pone.0100167
- Zhu, W.-J. J., Ma, H.-X. X., Cui, H.-Y. Y., Lu, X., Shao, M.-J. J., Li, S., ... Chen, Y.-Z. Z. (2015). Prevalence and Treatment of Children's Asthma in Rural Areas Compared with Urban Areas in Beijing. *Chinese medical journal*, *128*(17), 2273–7. doi:10.4103/0366-6999.163381
- Zhu, Z., Oh, M.-H., Yu, J., Liu, Y., & Zheng, T. (2011). The Role of TSLP in IL-13-Induced Atopic March. *Scientific Reports*, *1*(1), 23. doi:10.1038/srep00023
- Zlotnik, A., Burkhardt, A. M., & Homey, B. (2011). Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. *Nature reviews. Immunology*, *11*(9), 597–606. doi:10.1038/nri3049

# Thèse de Doctorat

Laure CASTAN

De l'allergie alimentaire à l'asthme : rôle de CCR9

From food allergy to asthma: role of CCR9

## Résumé

Aujourd'hui, l'allergie est classée 4ème maladie mondiale en termes de morbidité par l'OMS. Les allergies et leur évolution naturelle (marche atopique) sont devenues un problème majeur de santé publique particulièrement dans les pays industrialisés. La marche atopique se manifeste par l'évolution de la dermatite atopique et/ou des allergies alimentaires chez le jeune enfant vers des allergies respiratoires comme l'asthme ou la rhinite allergique plus tard dans l'adolescence. Ce passage pourrait impliquer un chimiotactisme contrôlé par le système chimiokine/récepteurs de chimiokine. A l'aide d'un modèle murin mimant la marche atopique composé d'un modèle d'allergie alimentaire au gluten et d'un modèle aigu d'asthme aux acariens, nous avons pu caractériser le rôle du récepteur de chimiokine CCR9 dans la maladie. Ainsi, des souris déficientes pour le gène de CCR9 montrent un phénotype atténué de la maladie démontrant une implication de ce récepteur dans la pathogénèse. De plus nous avons démontré que CCR9 agirait sur la balance TH17/Treg car sa délétion entraîne une augmentation des T régulateurs. En parallèle, dans un modèle d'allergie alimentaire au gluten par sensibilisation cutanée, nous avons analysé l'inflammation intestinale en réponse à plusieurs allergènes. Ces derniers travaux ont été réalisés en collaboration avec un laboratoire du National Food Institute au Danemark. Ainsi, nos résultats démontrent donc l'importance de l'axe intestin-poumon et l'importance d'aborder l'allergie comme une maladie de l'ensemble de l'organisme et non pas comme une maladie d'organe.

## Mots clés :

Marche atopique  
Allergie  
Asthme  
Chimiokine  
Modèle animal

## Abstract

Allergic diseases are now considered as the fourth worldwide diseases in terms of morbidity, according to the World Health Organization. Allergic diseases and their natural evolution (atopic march) are a major health issue, particularly among developed countries. Indeed, the atopic march is characterized by an evolution from atopic dermatitis and/or food allergies in young children (6 months to 2 years) to respiratory allergies such as asthma and rhinitis later in life. This natural history could involve the chemotaxis, controlled by the chemokine/chemokine receptor system. Using a murine model of atopic march combining a food allergy model to gluten and a model of acute asthma to house dust mite, we analyzed the role of the chemokine receptor CCR9 in the evolution of the disease. Using knock-out mice for CCR9, we observed a decrease of the symptoms of the disease, suggesting a role for this receptor in the pathology. Moreover, we showed that CCR9 seems to act on the Treg/TH17 balance; indeed its deletion induces an increase of the T regulators cell level. Meanwhile, using a food allergy model to gluten based on cutaneous sensitizations, we analyzed the intestinal inflammation to different gluten products. This work was done in collaboration with a lab of the National Food Institute, in Denmark. Our results prove the great significance of the gut-lung axis and more generally the importance of approaching the allergy as a whole disease and not as an organ-specific disease.

## Key Words :

Atopic march  
Allergy  
Asthma  
Chemokine  
Animal model