



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

**Année : 2011-2012**

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE**

*Rôle du couple fractalkine/CX<sub>3</sub>CR1 dans la dermatite atopique*

**Présentée et soutenue publiquement le 24/09/2012  
Par *Nicolas HORNEZ***

**Jury**

**Président : Monsieur le Professeur DELAPORTE**

**Assesseurs : Monsieur le Professeur PRIN  
Monsieur le Professeur THOMAS**

**Directrice de Thèse : Docteur STAUMONT-SALLE**

**Travail du Service de Dermatologie, Hôpital HURIEZ, Lille  
et du Laboratoire Inserm U 1011, Institut Pasteur, Lille**

## SOMMAIRE

INTRODUCTION	10
MATERIELS ET METHODES	25
RESULTATS	46
DISCUSSION	80
BIBLIOGRAPHIE	85
ANNEXE : Article soumis	92

# **Introduction**

La dermatite atopique (DA) est une dermatose inflammatoire et allergique chronique associant xérose cutanée, prurit et lésions récidivantes d'eczéma. Elle s'exprime préférentiellement chez le nourrisson mais peut persister toute la vie. C'est une pathologie très fréquente touchant 30% des enfants et 10% des adultes dans les pays occidentaux notamment dans les régions urbanisées et fortement polluées [1]. Son retentissement important sur la qualité de vie des malades ainsi que son coût, direct et indirect, en font un problème majeur de santé publique.

Elle est la manifestation cutanée du phénotype atopique qui inclut l'asthme, la rhino-conjonctivite allergique et dans une certaine mesure les allergies alimentaires. L'évolution de la DA se complique d'ailleurs d'un asthme allergique dans 60% des cas. On décrit ainsi la marche atopique ; les malades souffrant de DA dans l'enfance vont par la suite développer asthme et rhinite allergique par sensibilisation à des pneumallergènes en partie via la peau [2].

Actuellement, la prise en charge de la xérose cutanée et du prurit constitue l'essentiel du traitement de fond en association à un traitement local par dermocorticoïdes lors des poussées voire à des immunosuppresseurs locaux ou généraux. Malgré de récents progrès, des défis demeurent, notamment la prise en charge des malades présentant des formes chroniques sévères. Les immunosuppresseurs généraux restent des traitements d'exception assez lourds et n'agissent pas de façon ciblée. L'augmentation récente de la prévalence rend plus urgent encore le développement de traitements spécifiques à cette dermatose que seule une meilleure connaissance physiopathologique pourra faire émerger. De plus, optimiser la prise en charge de la DA permettrait de limiter la survenue d'autres pathologies atopiques comme l'asthme encore responsable actuellement de plus de 1000 décès par an en France.

La physiopathologie de la DA est complexe, encore imparfaitement comprise. C'est une dermatose inflammatoire chronique due à l'activation dans la peau de lymphocytes T spécifiques d'antigènes protéiques. Elle est multifactorielle associant prédisposition génétique, rôle de l'environnement, altération de la barrière cutanée, mécanismes allergiques, dysfonctionnement du système immunitaire et déficit de l'immunité innée.

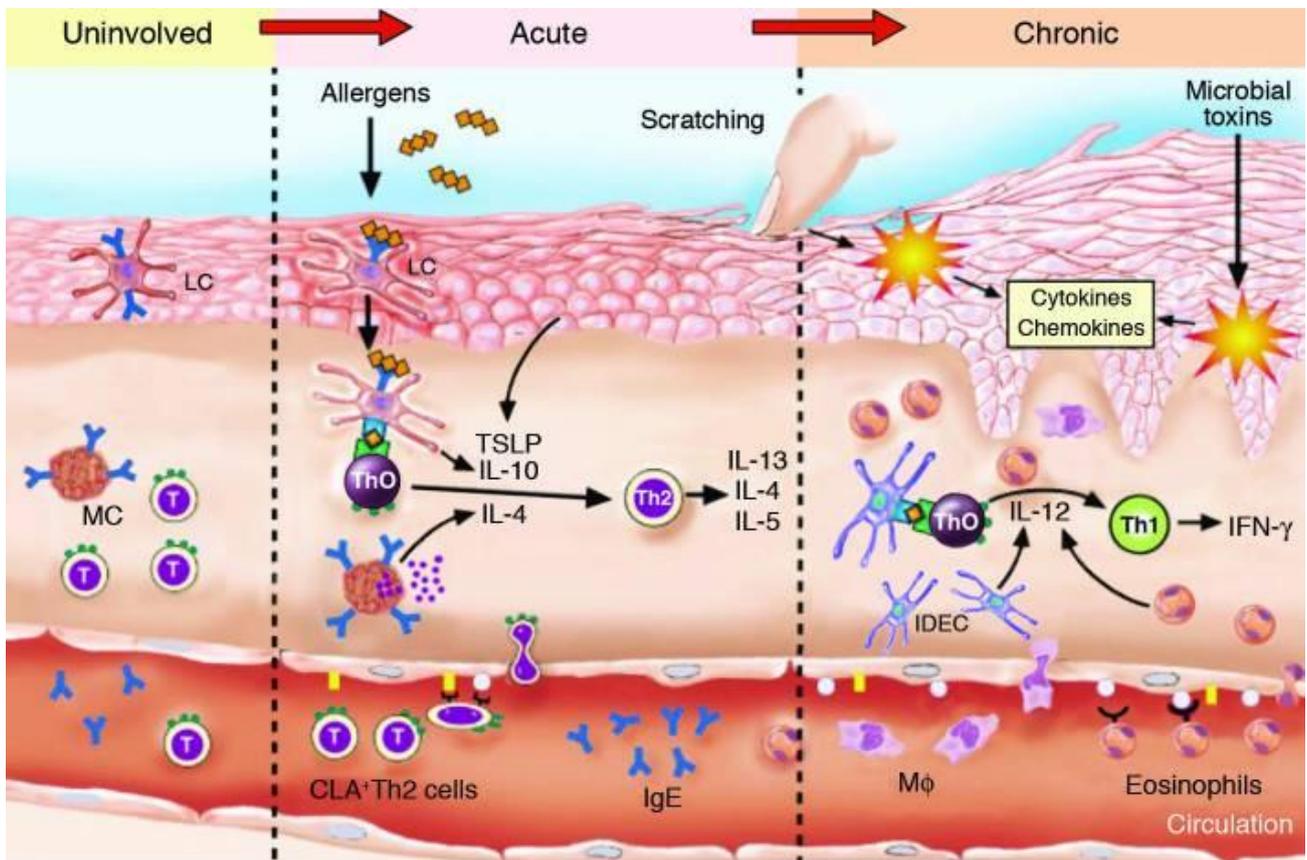
Des phénomènes allergiques sont impliqués, la plupart des patients ayant des taux d'IgE élevés avec présence d'IgE spécifiques d'allergènes environnementaux ou microbiens [3]. Les antigènes de la DA proviennent de molécules de notre environnement pour les DA « extrinsèques » associées à une hyper IgE ou de molécules du soi (auto-antigènes) pour les DA « intrinsèques » [4].

L'immunité innée est altérée. Contrairement au psoriasis, le niveau d'expression des peptides anti-microbiens (cathélicidines,  $\beta$ -défensines) est faible au sein des lésions aiguës et chroniques de DA favorisant la colonisation à *Staphylococcus aureus* et conduisant à un risque de surinfection locale et à l'exposition à des super-antigènes bactériens pérennisant l'inflammation. 90% des malades seraient ainsi colonisés de façon chronique à *Staphylococcus aureus* [5]. Par ailleurs, l'absence de stimulation de l'immunité innée dans les populations occidentales vaccinées, médicalisées et à très bonne hygiène pourrait amener le système immunitaire à développer des réactions contre des antigènes de son environnement [4]. Cette théorie « hygiéniste » est confortée par de nombreuses études épidémiologiques montrant une corrélation inverse entre infections et maladies atopiques ou auto-immunes [6].

Les altérations de la barrière cutanée, sécheresse cutanée et diminution du film hydrolipidique protecteur, contribuent à la physiopathologie de la DA en permettant aux allergènes, antigènes et facteurs irritants un accès facile à travers l'épiderme. Cette barrière est altérée par les nouvelles

habitudes de toilette ; les lavages sont plus fréquents et avec des produits plus détergents. Des anomalies génétiques sont également impliquées. Ainsi, les mutations du gène codant pour la filaggrine, une protéine permettant la cohésion cellulaire de la couche cornée de l'épiderme, sont désormais considérées comme facteur de risque majeur d'atopie et de DA de formes sévères [7]. On décrit également un cycle d'amplification de l'inflammation cutanée via le prurit [8]. Les démangeaisons induisent des lésions mécaniques avec augmentation du défaut de la barrière cutanée et production de cytokines et de chimiokines recrutant de leucocytes supplémentaires et induisant l'épaississement (ou lichénification) des lésions. L'activation des leucocytes est, de plus, à l'origine de la production d'IL-31 et de protéases perpétuant le prurit en association aux neuropeptides induits par le stress et à l'histamine issue des mastocytes.

Histologiquement, les lésions de DA sont caractérisées par une hyperkératose, une spongiose et un infiltrat inflammatoire dermique composé majoritairement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (80%), de mastocytes, d'éosinophiles, de macrophages et de cellules dendritiques [1]. Les lymphocytes T (LT) effecteurs pro-inflammatoires sont les principaux responsables des lésions cutanées. Si pendant longtemps la DA était associée à un profil de polarisation lymphocytaire Th2 caractérisé par une production d'IgE (via l'IL-4), un recrutement d'éosinophiles (via l'IL-5), une activation des mastocytes et la sécrétion des cytokines Th2, on sait désormais qu'un profil mixte Th1/Th2 (avec dominance Th1) caractérise les lésions chroniques lichénifiées de traitement plus complexe. La présence de LT Th1 producteurs d'IFN $\gamma$  est d'ailleurs corrélée à la sévérité et à la chronicité des lésions cutanées [9]. Les mécanismes de cette transition Th2 vers Th1 restent mal compris. Certains auteurs suggèrent le rôle de cellules dendritiques (DC) sécrétrices d'IL-12. Le rôle des autres populations lymphocytaires, Th17 et T régulatrices, est également suggéré mais reste à déterminer.



### Immunopathologie de la dermatite atopique [3]

Les antigènes sont présentés par les cellules de Langerhans (LC) aux LT naïfs (Th0) permettant leur différenciation en LT Th2. Les IgE stimulent les mastocytes qui facilitent cette différenciation. Les LT Th2 circulants, exprimant CLA, induisent une élévation des IgE sériques et une éosinophilie. Les agressions cutanées activent les kératinocytes qui libèrent cytokines et chimiokines amplifiant l'infiltrat inflammatoire local. Au sein des lésions chroniques, les mastocytes, les éosinophiles et cellules dendritiques épidermiques inflammatoires (IDEC) participeraient à la transition vers une polarisation Th1 via la production d'IL-12.

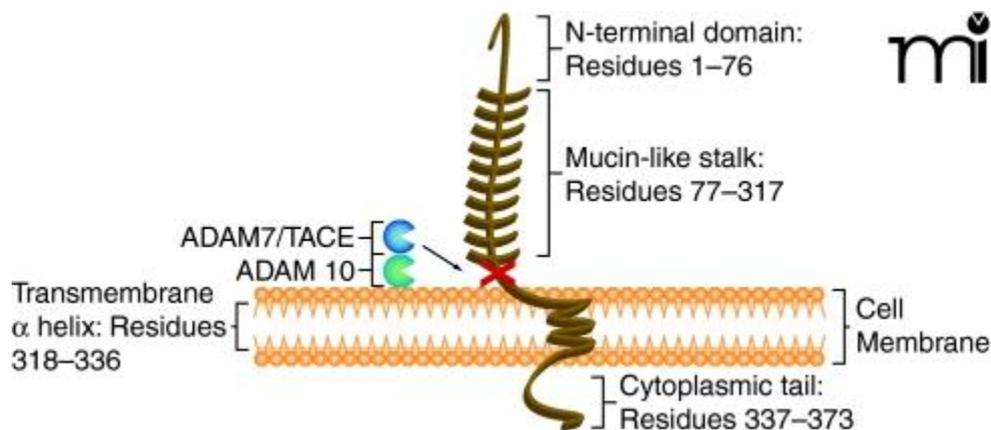
Le développement des lésions de DA est donc lié étroitement à l'accumulation de leucocytes migrant de l'endothélium vers la peau. Ce recrutement des leucocytes circulants aux sites inflammatoires est un processus dynamique impliquant plusieurs étapes : initialement, le contact avec l'endothélium, suivi du roulement leucocytaire médié par les sélectines, puis l'adhésion impliquant les intégrines et enfin la diapédèse suivie de la migration vers les tissus. La compréhension de ces mécanismes complexes a été éclairé par la découverte d'une 3<sup>ème</sup> classe de molécules, jouant un rôle dans l'adhésion et la migration : les chimiokines (cytokines chimiotactiques).

Les chimiokines constituent chez l'homme une famille d'une cinquantaine de protéines de bas poids moléculaire, classées en 4 groupes sur la base de leur structure (C,CC,CXC,CX<sub>3</sub>C). Leur action chimio-attractante est médiée par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G dont l'expression est différente selon le type cellulaire, le degré d'activation et les conditions, inflammatoires ou non. Elles exercent un rôle majeur dans le trafic leucocytaire, en conditions basales mais aussi pathologiques, permettant un recrutement cellulaire sélectif vers les sites inflammatoires. Elles permettent l'adhésion ferme à l'endothélium et initient le passage vers les espaces périvasculaires. Le gradient de chimiokines guide ensuite les leucocytes vers les tissus.

Ainsi, elles participent à de multiples pathologies : inflammatoires et allergiques mais aussi tumorales, auto-immunes, cardiovasculaires et neurologiques. Toutefois, l'étude du réseau de chimiokines est complexe en raison de son caractère dégénéré et redondant ; plusieurs récepteurs étant capables de fixer une même chimiokine et inversement.

Exception notable à cette redondance, la Fractalkine (FKN) également nommée CX<sub>3</sub>CL1, est le membre unique, à la fois chez l'homme [10] et la souris [11], de la famille des CX<sub>3</sub>C-chimiokines. La FKN agit par l'intermédiaire d'un récepteur unique CX<sub>3</sub>CR1. L'interaction semblait exclusive jusqu'à récemment ; l'équipe de Nakayama ayant démontré que CCL26 est aussi

un ligand (avec une affinité 10 fois inférieure) pour CX<sub>3</sub>CR1 chez l'homme uniquement, CCL26 n'étant qu'un pseudogène chez la souris [12]. La FKN existe sous 2 formes, soluble ou membranaire, et associe propriétés chimiotactiques et d'adhésion. Elle permet à la fois la migration cellulaire trans-endothéliale [13] et l'adhérence ferme par un mécanisme indépendant du roulement médié par les sélectines et de l'activation d'intégrines [14]. Elle peut notamment immobiliser les leucocytes circulants lors de flux artériels élevés.

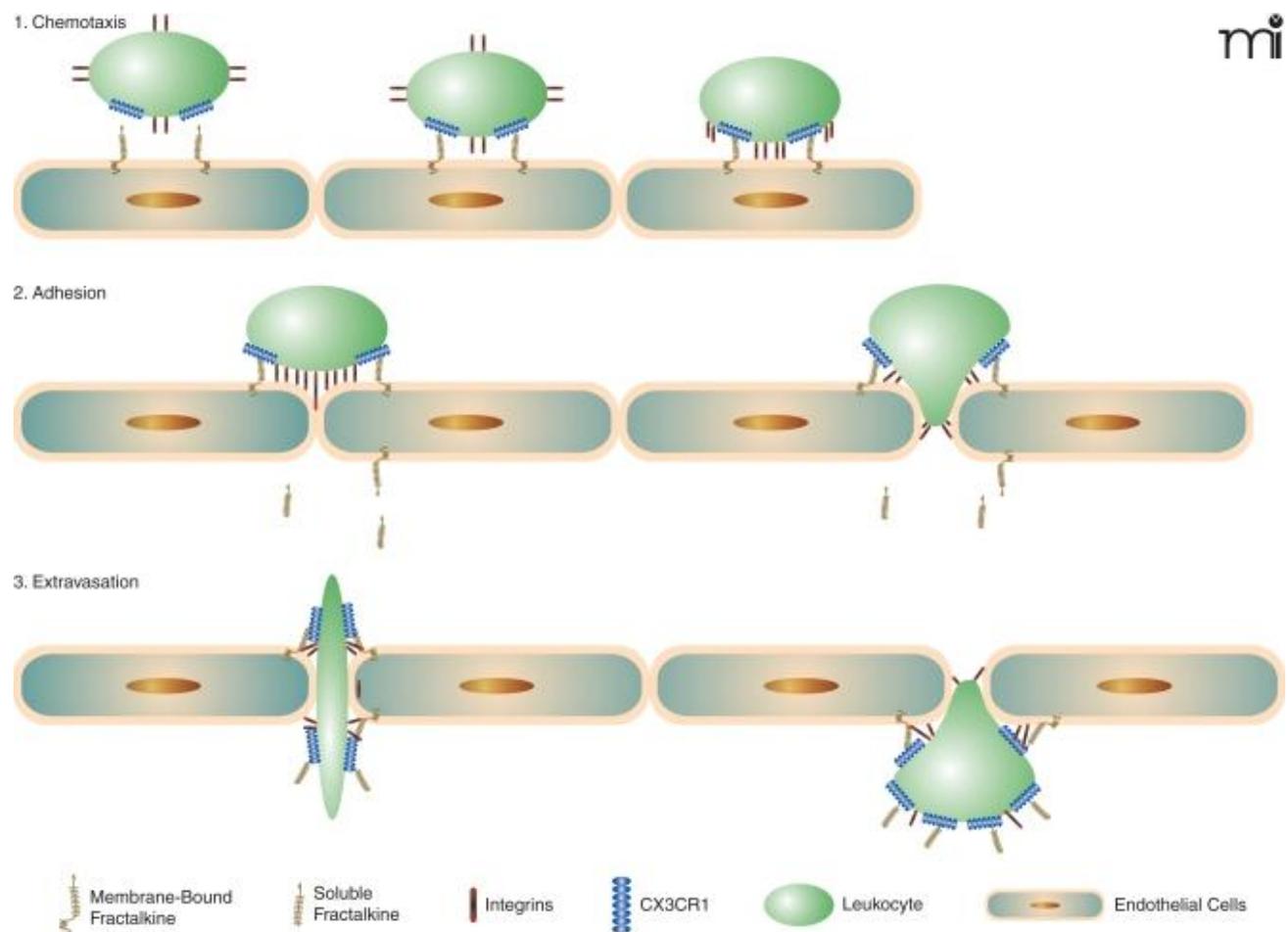


### **Fractalkine, forme membranaire. Représentation schématique.** [15]

La forme membranaire de la FKN est exprimée de façon ubiquitaire par de nombreuses populations cellulaires : les cellules endothéliales [10] et épithéliales (intestin et bronches), les kératinocytes [16], les neurones [17], les cellules dendritiques (DC) notamment folliculaires [18], les cellules musculaires lisses (vasculaires et pulmonaires) et les fibroblastes [19]. Selon le type cellulaire son expression membranaire est augmentée via des signaux pro-inflammatoires comme l'IL1- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le LPS ou via des cytokines Th1 comme l'IFN $\gamma$  alors que les cytokines Th2, IL-4 et IL-13, seraient plutôt inhibitrices [20].

La FKN membranaire peut être clivée par l'action des métallo-protéases ADAM-17 et ADAM-10 [21] pour être libérée sous une forme soluble, ce qui lui confère des propriétés chimio-

attractantes classiques sur les cellules exprimant CX<sub>3</sub>CR1 : les cellules Natural Killer (NK), les monocytes sanguins, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> [13] la microglie cérébrale (permettant une interaction avec les neurones), les LT  $\gamma/\delta$ , les mastocytes (permettant leur migration sans dégranulation) et les DC matures ou immatures [22].



### Etapes du chimiotactisme médié par FKN/CX<sub>3</sub>CR1 [15]

L'interaction entre la FKN membranaire présente à la surface des cellules endothéliales et CX<sub>3</sub>CR1 exprimé par les leucocytes circulants permet tout d'abord le recrutement sélectif puis l'adhésion ferme avec l'aide des intégrines. La FKN soluble aide ensuite à l'extravasation et guide la cellule vers les tissus cibles.

De nombreuses études font état d'un rôle du couple Fractalkine/CX<sub>3</sub>CR1 en situation pathologique. Les premières données ont été apportées par des études génétiques associant polymorphisme génétique T280M de CX<sub>3</sub>CR1 à un risque diminué de pathologies cardiovasculaires liées à l'athérome, accidents coronariens aigus ou occlusions de l'artère carotide interne [23]. Ce polymorphisme est associé à des capacités d'adhésion diminuées [24] laissant supposer un rôle de la FKN dans l'athérosclérose. La surexpression de la FKN au sein des lésions d'athérome, notamment des plaques en rupture, et le rôle protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose d'une déficience en CX<sub>3</sub>CR1 ou en FKN dans un modèle murin ont permis de confirmer ce rôle délétère [25]. Elle interviendrait dans le recrutement des cellules dendritiques et des macrophages au sein des plaques d'athérome, en conjonction avec les chimiokines CCR2 et CCR5. Une action proliférative et anti-apoptotique sur les cellules musculaires lisses est également démontrée. Par ailleurs, son rôle est également suggéré dans d'autres pathologies vasculaires comme l'hypertension artérielle primitive [26] et l'anévrisme artériel [27].

Le couple Fractalkine (exprimée par les neurones) et CX<sub>3</sub>CR1 (exprimé par la microglie) dans le système nerveux central (SNC) exercerait un rôle neuro-protecteur en inhibant la mort cellulaire induite par Fas-ligand ou par des signaux inflammatoires activant la microglie chez le rat [28]. La FKN pourrait, par ce biais, être un élément de la physiopathologie complexe des 2 pathologies neuro-dégénératives les plus fréquentes, à savoir la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Une diminution du taux de FKN soluble est d'ailleurs retrouvée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer [29]. Concernant les pathologies inflammatoires comme l'encéphalite auto-immune expérimentale, plusieurs équipes suggèrent une participation de la FKN notamment dans le recrutement des cellules NK avec surexpression de CX<sub>3</sub>CR1 chez les animaux symptomatiques [30]. Dans la sclérose en plaques, il existe une corrélation entre un pourcentage bas de cellules NK CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> et la sévérité de la maladie. La FKN peut également être délétère pour le

SNC et aurait un rôle dans les dommages après un accident vasculaire ischémique [31]. Elle serait également impliquée dans le développement des douleurs nociceptives chroniques mais aussi neuropathiques après lésions nerveuses [32]. Le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 modulerait la douleur, ayant une action pro-algique dans le système nerveux périphérique et antalgique dans le système nerveux central [33].

En pathologie tumorale, la FKN peut jouer des rôles divergents. En conditions expérimentales, la surexpression tumorale de FKN induit le développement d'une réponse immune spécifique anti-tumorale faisant intervenir cellules NK, LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> et cellules dendritiques [34]. Une approche par thérapie génique avec surexpression de la FKN par les cellules tumorales est ainsi efficace dans un modèle d'hépatocarcinome murin [35]. De même, les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 ont une réponse anti-tumorale atténuée dans un modèle de mélanome B16 [36]. Enfin, le recrutement de cellules NK via la FKN est protecteur dans un modèle de lymphome murin [37]. Des données en pathologie humaine confirment un rôle anti-tumoral de la FKN comme dans le cas du carcinome hépatocellulaire et du cancer colorectal où l'expression de FKN au sein des pièces opératoires est corrélée à un meilleur pronostic et à un infiltrat lymphocytaire tumoral plus dense [38]. Par contre, dans le cancer de la prostate, la FKN aurait un rôle dans l'adhésion et la migration des cellules cancéreuses participant au développement des métastases osseuses [39] et à la survie des cellules tumorales via l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt [40]. Dans le cancer du sein, l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 serait corrélée à la survenue de métastases cérébrales [41]. Dans le cancer du pancréas, la FKN jouerait un rôle également délétère participant à la dissémination tumorale péri-neurale à l'origine des douleurs neuropathiques intenses et mal contrôlées par les traitements classiques [42]. En résumé, l'effet anti-tumoral de la FKN serait médié par la stimulation de la réponse immune contre la tumeur alors que les effets néfastes seraient liés à sa participation à la migration des cellules cancéreuses.

Un rôle dans la physiopathologie du rejet de greffe rénale et cardiaque est également suggéré. L'expression de la FKN est augmentée au sein de l'endothélium des greffons rénaux et cardiaques rejetés [43]. Le taux de FKN urinaire serait un bon marqueur de rejet aigu de greffe rénale [44]. La FKN pourrait être une cible thérapeutique en contexte de greffe. Un traitement quotidien par anticorps anti-CX<sub>3</sub>CR1 prolonge ainsi la survie du greffon de 7 à 49 jours dans un modèle murin de greffe cardiaque [45].

Il existe de multiples exemples d'implication de la FKN dans des pathologies infectieuses. Ainsi, le récepteur US28 du CMV humain exprimé à la surface des cellules infectées reconnaît la FKN avec une haute affinité et participe aux contacts cellules-cellules permettant la propagation de l'infection [46]. De même, la glycoprotéine du VRS responsable de bronchiolites sévères du nourrisson mime la FKN [47]. Concernant le VIH, le polymorphisme T280M, induisant une diminution d'expression et d'affinité de CX<sub>3</sub>CR1, est associé à une progression plus rapide vers le stade SIDA [48]. L'expression de la FKN est d'ailleurs augmentée dans le tissu cérébral des malades séropositifs avec un rôle protecteur démontré *in vivo* sur les neurones hippocampiques vis-à-vis de la neurotoxicité induite par la protéine gp120 du VIH [49]. Dans un modèle murin de péritonite septique, l'absence de CX<sub>3</sub>CR1 diminue la défense immunitaire [50]. La FKN surexprimée par les cellules dendritiques participe à l'élaboration d'une réponse Th1 dirigée contre *Legionella pneumophila* [51]. Dans une dermatose virale, le pityriasis rosé de Gibert, probablement lié aux virus HHV 6 et 7, le taux sérique de FKN chez les malades est significativement élevé [52]. Enfin, les globules rouges infectés par *Plasmodium falciparum* adhèrent à la FKN exprimée par l'endothélium ce qui pourrait participer à leur migration vers les tissus [53].

Etant donné son rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires vers les tissus, il n'est pas étonnant de constater son implication dans de nombreuses pathologies auto-immunes et inflammatoires.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont représentées par la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Les polymorphismes V249I et T280M de CX<sub>3</sub>CR1 sont associés aux formes fibrosténosantes de la maladie de Crohn [55]. Les patients souffrant de maladie de Crohn présentent une augmentation des LT CD4<sup>+</sup>CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> sanguins et muqueux et la FKN est surexprimée au sein des lésions inflammatoires intestinales [54].

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est la pathologie inflammatoire articulaire la plus fréquente. La FKN soluble et le taux de leucocytes circulants, lymphocytes T et monocytes, exprimant CX<sub>3</sub>CR1 y sont élevés. Au niveau articulaire, CX<sub>3</sub>CR1 et la FKN, exprimée par les synoviocytes et l'endothélium, sont surexprimés chez l'homme et dans un modèle d'arthrite chez le rat [56]. L'utilisation d'un anticorps anti-FKN dans un modèle murin d'arthrite résulte en une diminution du score clinique, des lésions ostéo-articulaires et du recrutement de cellules inflammatoires [57]. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les anti-TNF, traitement de référence dans cette pathologie, diminuent l'expression de la FKN chez les malades [58].

Le rôle de la FKN est également très fortement suggéré dans la physiopathologie du syndrome hémolytique et urémique et dans les glomérulonéphrites [59]. Dans la maladie de Gougerot-Sjögren, caractérisée par un syndrome sec (xérophtalmie, xérostomie) lié à une atteinte des glandes exocrines, la FKN est surexprimée au sein des glandes lacrymales [60]. Dans le purpura thrombopénique auto-immun, l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 au sein de la moelle osseuse hématogène est augmentée [61]. Une élévation du taux de FKN soluble et de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 par les

leucocytes circulants est retrouvée dans plusieurs vascularites, comme la maladie de Wegener et la polyangéite microscopique, mais aussi dans la sclérodermie, le lupus et la dermatomyosite. L'efficacité thérapeutique d'un blocage de l'interaction FKN/CX<sub>3</sub>CR1 a d'ailleurs été démontrée dans plusieurs modèles murins parmi lesquels un modèle de néphrite lupique [63] et un modèle de myosite [62].

Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique caractérisée par une hyperprolifération de kératinocytes et un infiltrat inflammatoire constitué de LT CD4<sup>+</sup> Th1, de LT CD8<sup>+</sup>, de cellules dendritiques, de monocytes et de neutrophiles. La FKN y est exprimée par les kératinocytes et les vaisseaux dermiques [16]. Elle pourrait jouer un rôle dans le recrutement des LT Th1 mais aussi de LT CD8<sup>+</sup> agissant par la sécrétion de cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), par leur fonction cytotoxique et en régulant l'apoptose des kératinocytes qui, en retour, ont un rôle de présentation antigénique par l'expression de CMH I et II.

Le rôle de la FKN en pathologie allergique a d'abord été suggéré par des données épidémiologiques mettant en relation polymorphisme des gènes codant pour CX<sub>3</sub>CR1 et phénotype atopique ou asthmatique [64]. Les patients atteints de rhinite et d'asthme allergique présentent des taux élevés de FKN soluble et une surexpression de CX<sub>3</sub>CR1 par les LT CD4<sup>+</sup>. Un test de provocation allergénique augmente l'expression sanguine et bronchique de la FKN chez ces malades [65]. La FKN produite par les cellules musculaires lisses des voies aériennes contribuerait au recrutement des mastocytes dans l'asthme allergique [66]. Le rôle du couple CX<sub>3</sub>CR1 a récemment été étudié de manière approfondie par nos collaborateurs niçois (Inserm E0344, IPMC, Sofia-Antipolis). Ils ont démontré que CX<sub>3</sub>CR1 est indispensable au développement de la réponse inflammatoire dans un modèle murin d'asthme. Les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 et les souris traitées par un antagoniste de la FKN ont une réponse significativement atténuée. L'expression de

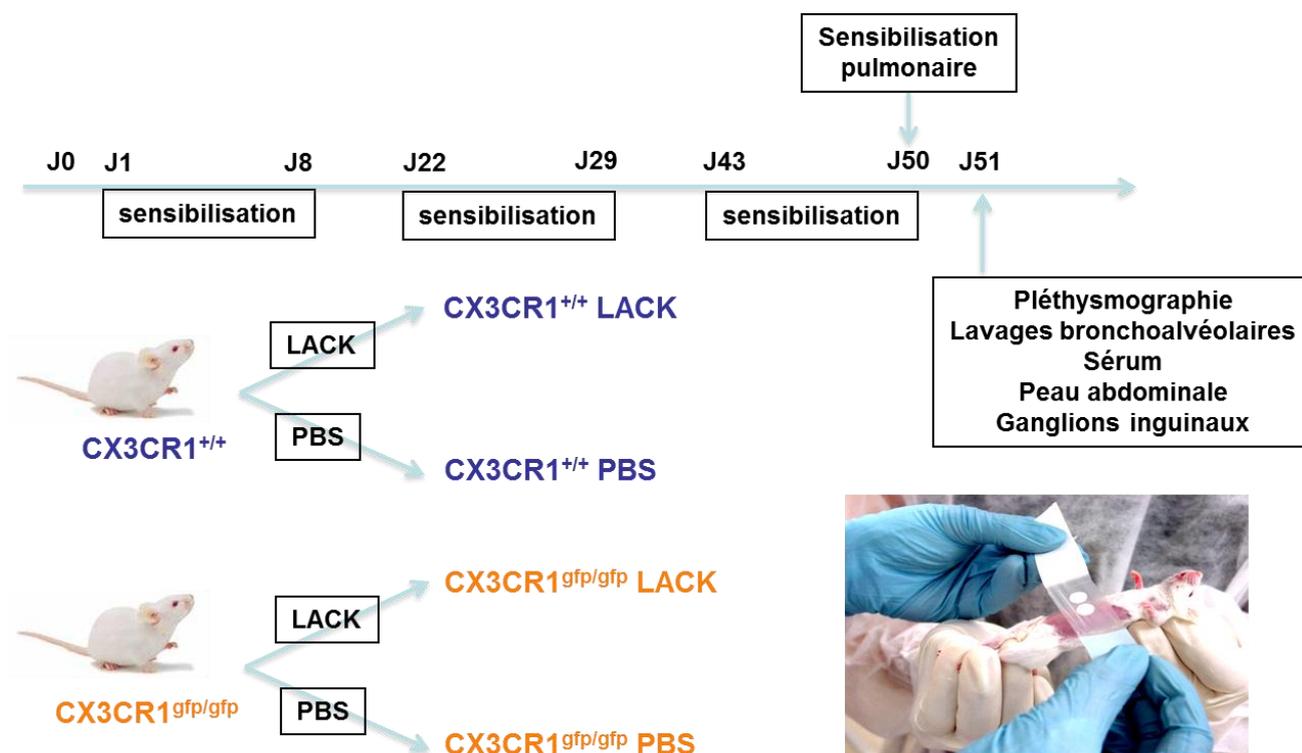
CX<sub>3</sub>CR1 par les LT polarisés Th2 permettrait leur survie prolongée dans les poumons favorisant ainsi le développement de l'inflammation [67].

En revanche la littérature fournit peu d'informations concernant le rôle de la FKN dans la DA. Les premières données ont été apportées par l'équipe de Fraticelli mettant en évidence, en immunohistochimie, une expression importante de FKN par les cellules endothéliales au sein de lésions cutanées de psoriasis mais très faible dans les lésions de dermatite atopique. Les kératinocytes exprimaient la FKN dans les 2 groupes. L'expression cutanée de CX<sub>3</sub>CR1 est mise en évidence dans les 2 pathologies, principalement par les LT CD4<sup>+</sup>. Aucune précision n'était donnée sur la caractère aigu ou chronique des lésions de DA analysées [20]. L'équipe d'Echigo met, par contre, en évidence une forte expression de FKN par les cellules endothéliales cutanées dans la DA comme dans le psoriasis. Les cellules CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> cutanées, principalement des LT (80%), sont nombreuses dans les 2 groupes. Le taux sérique de FKN est élevé seulement chez les patients suivis pour DA. Ce taux est corrélé à la gravité et diminue à l'amélioration clinique. L'expression cutanée de l'ARN de FKN est également augmentée significativement par rapport aux témoins sains [68]. Une dernière étude, plus récente, a mis en évidence une forte expression en ARN de CX<sub>3</sub>CR1 dans les lésions de psoriasis et de DA ainsi qu'une forte expression de FKN dans les lésions de psoriasis et de DA de forme sévère uniquement [12]. Ces résultats semblent indiquer que la FKN joue un rôle dans la DA, notamment dans le recrutement des LT CD4<sup>+</sup>.

L'objectif de ce travail est d'évaluer le rôle potentiel de la FKN et de son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 dans la DA. Dans ce but, nous avons, tout d'abord, utilisé un modèle expérimental murin de DA par sensibilisation antigénique épicutanée sans adjuvant. Le phénotype obtenu est très proche de la pathologie humaine, avec une réponse cutanée mais aussi humorale et pulmonaire [69]. Dans ce modèle, nous avons étudié la réponse de souris déficientes pour CX<sub>3</sub>CR1 et de souris de souche sauvage traitées par un antagoniste de la FKN. Puis, à partir des résultats obtenus, d'autres expériences *in vitro* et *in vivo* ont été menées afin de mieux cerner le mécanisme d'action du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 dans la physiopathologie de la DA. Enfin, un protocole de recherche clinique a été mis en place permettant d'analyser des prélèvements cutanés de malades et de les comparer à des témoins sains afin de confirmer la relevance des résultats expérimentaux en pathologie humaine et d'apporter des données supplémentaires ; les études déjà publiées étant contradictoires sur certains points.

# **Matériels et Méthodes**

## A/ PROTOCOLE DE DERMATITE ATOPIQUE EXPERIMENTALE MURINE



### 1/ Animaux

Il s'agit de souris femelles Balb/c ByJ (Charles River, L'Arbresle, Rhône, France) âgées de 8 à 12 semaines au début du protocole de sensibilisation. Des souris de souche sauvage proficientes ( $CX_3CR1^{+/+}$ ) et des souris déficientes en  $CX_3CR1$  ( $CX_3CR1^{-/-}$  ou  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ ) pour lesquelles le gène codant pour  $CX_3CR1$  a été remplacé par un gène codant pour la GFP [67]. Ces souris sont de même fond génétique et ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Dr V. Julia Inserm E0344, IPMC, Sofia-Antipolis. Les animaux sont situés, selon les expériences, soit à l'animalerie de l'institut Pasteur de Lille ou à celle de l'institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire de Sofia-Antipolis. Toutes les expériences ont été réalisées après approbation du comité d'éthique en expérimentations animales local.

Des souris transgéniques WT15  $CX_3CR1^{+/gfp}$  Thy1.1<sup>+/-</sup> ou  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  Thy1.1<sup>+/+</sup>, exprimant un récepteur T (TCR $\alpha\beta$ ) spécifique de LACK âgées de 8 à 12 semaines ont été utilisées pour l'étude

de la prolifération ganglionnaire des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et pour les expériences de transferts adoptifs.

## **2/ Protocole de dermatite atopique** [70]

La DA expérimentale est induite par 3 séries de sensibilisation épicutanée des souris par de l'antigène LACK (Leishmania analogue of the receptors of activated C kinase) à 2% dans du PBS sans adjuvant. Le LACK est produit et détoxifié à l'aide de colonnes EndoTrap (Profos). La peau abdominale et dorsale des souris est rasée 24h avant le début de chaque série de sensibilisation. Le lendemain, 4 pastilles de papier buvard de 7 mm chacune, imbibées de 25µL de LACK ou de PBS seul (Phosphate Buffered Saline, Invitrogen), sont appliquées sur la peau abdominale (Promedica, La Chaussée-Saint-Victor, France). Les solutions de LACK et de PBS ont été filtrées sur une membrane de 0,22 µm (Millex<sup>®</sup>-GV, Bedford, USA) avant utilisation. Les pastilles sont maintenues en place grâce à un pansement occlusif transparent (Visulin, Hartmann, Châtenoi, France), lui-même protégé des morsures par un sparadrap élastique (Optiplaste, BSN medical, Vibraye, France). Les pastilles sont renouvelées au 3<sup>ème</sup> jour et laissées en place 7 jours au total. Les souris subissent une sensibilisation de 3 semaines avec un intervalle libre de 15 jours entre chaque semaine de sensibilisation. A la fin de la dernière semaine de sensibilisation épicutanée, à J50, les animaux subissent une épreuve de sensibilisation pulmonaire par nébulisation de LACK (0,2% dans du PBS) pendant 20 minutes. A J51, la fonction pulmonaire est analysée par une pléthysmographie invasive (FlexiVent) : inhalation successive de doses croissantes d'un bronchoconstricteur non spécifique, la méthacholine, à 3, 6, 12 et 24 mg/mL, 20 secondes à chaque concentration. La fonction pulmonaire est enregistrée pendant 3 minutes entre chaque nébulisation. Afin d'évaluer la détresse respiratoire des animaux, la Penh (« Enhanced pause » ou élévation de la pause) est mesurée : elle est d'autant plus élevée qu'il existe une détresse respiratoire. Un prélèvement sanguin est ensuite effectué par ponction du sinus rétro-orbitaire, puis les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Le lavage

broncho-alvéolaire (LBA) est réalisé avec 1 mL de PBS injecté à 3 reprises dans les poumons par la trachée. Enfin, la peau abdominale, les ganglions inguinaux et les poumons sont prélevés pour analyse histologique et RT-PCR après extraction d'ARN [68]. Les érythrocytes présents dans les LBA sont lysés par le tampon de lyse ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{NaHCO}_3$  10 mM, EDTA 0,1 mM) pendant 3 minutes. Après 2 lavages, le nombre total de cellules est déterminé à l'aide d'une cellule de Thoma. Les cellules ( $10^5$ ) sont ensuite déposées sur lames par centrifugation, puis colorées à l'aide du kit R.A.L555<sup>®</sup> (Reactif RAL, Bordeaux, France) permettant le comptage des mastocytes, neutrophiles, éosinophiles et lymphocytes.

### **3/ Histologie**

Les échantillons de peau, ganglions et poumons de souris sont incubés dans un fixateur (ImmunoHistoFix, Intertile, Bruxelles, Belgique) pendant un minimum de 4 jours à 4°C. Ils subissent une déshydratation dans 4 bains successifs d'éthanol de concentration croissante et sont ensuite immergés dans une résine (ImmunoHistoWax, Intertile, Bruxelles, Belgique). Des coupes de 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées avec un microtome (Leica RM2265, Allemagne) puis déposées sur des lames gélatinées. La résine d'inclusion des coupes d'échantillon de peau et de ganglions (5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) est éliminée par deux bains d'acétone de 3 minutes chacun. Les échantillons sont ensuite réhydratés dans des bains d'éthanol de concentration décroissante à raison de 1 minute par bain. Les échantillons sont colorés, 4 jours plus tard, au Giemsa, permettant la mise en évidence des mastocytes et des éosinophiles.

La mesure de l'épaississement cutané est évaluée par la moyenne de 10 mesures réalisées dans les zones les plus épaissies de l'épiderme, visualisées au microscope optique avec l'objectif X 40, puis exprimées en  $\mu\text{m}$ .

Les comptages cellulaires (mastocytes, éosinophiles) sont réalisés avec les objectifs X 100 grâce à une grille de comptage de 1x1cm qui est déplacée sur l'ensemble du derme, là où

l'épaississement cutané est le plus important et sur l'ensemble de la surface des ganglions. Les comptages sont exprimés en nombre de cellules/mm<sup>2</sup>.

#### **4/ Immuno-histochimie**

La nature des cellules recrutées dans le derme des souris est définie par immunomarquage. Les cellules présentatrices d'antigènes cutanées sont reconnues par un anticorps monoclonal (Ac.m) anti-CMH II (Rat IgG<sub>2b</sub>, clone M5/114.15.2, BD Biosciences), et les LT sont reconnus par un Ac.m anti-CD4 (Rat IgG<sub>2a</sub>, clone RM4-5, BD Biosciences). La révélation se fait par un Ac de chèvre anti-IgG de rat biotinylé (Sigma, Saint Louis, USA). Les échantillons, fixés 4 jours à 4°C dans l'Immunohistofix (Intertile, Bruxelles, Belgique), sont déshydratés par 4 bains de concentrations croissantes en éthanol, puis sont inclus à 37°C dans la résine Immunohistowax (Intertile, Bruxelles, Belgique). Vingt-quatre heures plus tard, les échantillons sont placés à 4°C. Des coupes de 5 µm, effectuées grâce au microtome (Leica RM2265, Allemagne) sont déposées sur lames gélatinées. La résine d'inclusion est éliminée par un bain d'acétone de 3 minutes. Les peroxydases endogènes sont inhibées par une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma, Saint Louis, USA) à 3% dans du PBS pendant 30 minutes. Après saturation par Blocking Reagent (Boehringer, Mannheim, Allemagne) à 1% dans du PBS pendant 30 minutes, les coupes sont incubées avec l'Ac primaire sur 2h puis, durant 1h45 avec l'anticorps secondaire biotinylé et enfin avec la streptavidine peroxydase (Dako, Glostrup, Danemark) durant 30 minutes. La réaction est révélée, sous contrôle au microscope optique, par immersion dans une solution contenant 0,5 mg/mL de 3-amino-9-éthyl-carbazole (Janssen, Beerse, Belgique), 0,0475M de tampon acétate (pH = 4,9), 47,2 Mg/ml de N,N diméthylformamide et 0,015% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction est arrêtée par incubation dans l'eau pure. La contre coloration est faite par hématoxyline de Gill pure, appliquée 3 secondes, suivie d'un court rinçage à l'eau pure pour différenciation. Les lames sont montées avec un liquide de montage hydrophile (Immunomount, Shandon, Pittsburgh, USA). Entre chaque étape, les lames sont lavées par 1 bain de PBS.

## **5/ Dosage des Ig sériques par test ELISA**

Le sang prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire de chaque souris est centrifugé à 2 reprises. Le sérum obtenu est conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

A J1, l'Ac de capture anti-IgE dilué à 2 µg/mL dans du PBS (pour le dosage des IgE totales et anti-LACK) ou une solution de LACK 1% dans du PBS (PBS-LACK) (pour le dosage des IgG<sub>1</sub> et IgG<sub>2a</sub> anti-LACK) sont déposés dans les puits d'une plaque ELISA (Immulon II, Dynex Technologies, Chantilly, France) pendant 18 heures à 4°C. A J2, les puits sont saturés par une solution de BSA 1% dans du PBS (PBS-BSA) (Bovine Serum Albumin, Fraktion V, Roche, Mannheim, Germany). Le sérum de chaque souris dilué dans le PBS-BSA 0,1% est ensuite ajouté dans les puits, pour une incubation de 18 heures à 4°C pour l'IgE et pendant 1 heure à température ambiante pour les IgG. Pour les IgE totales, de l'IgE de souris anti-TNP (clone IgE-3, Pharmingen) est utilisé comme gamme étalon (6.25 à 400 ng/mL dans du PBS-BSA 0.1%). Les taux d'IgE, d'IgG1 et d'IgG2a anti- LACK sont évalués en titre. L'Ac de détection dilué dans le PBS-BSA 0,1% est déposé et incubé pendant 1 heure, à J2 pour les IgG, et à J3 pour les IgE. Après 30 minutes d'incubation avec 100 µL du complexe Streptavidine-HRP (Horseradish Peroxidase) dilué dans PBS-BSA 0,1%, la révélation est réalisée avec 100 µL de TMB (3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine) (Sigma) et arrêtée par 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>2N. Entre chaque étape, les plaques sont lavées 3 à 5 fois au PBS-Tween (Merck) 0,05%. La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde de 450 nm au spectrophotomètre.

Isotype	Ac de capture	Dilution du sérum	Détection
IgE totales	Ac anti-IgE mouse au 1/250 <sup>e</sup> (0.5 mg/ml, clone R35-72, Pharmingen)	1/50 <sup>e</sup>	Ac anti-mouse IgE biotinylé au 1/500 <sup>e</sup> (0.5mg/ml, clone R35-92, Pharmingen) + Streptavidine-HRP (R&D systems)
IgE anti-LACK	Ac anti-IgE mouse au 1/250 <sup>e</sup>	Du 1/25 <sup>e</sup> au 1/800 <sup>e</sup>	LACK biotinylé 4µg/ml + Streptavidine-HRP
IgG <sub>1</sub> anti-LACK	PBS-LACK 1% (Grade V, Sigma)	Du 1/500 <sup>e</sup> au 1/16000 <sup>e</sup>	Goat anti-mouse IgG1-HRP au 1/10000 <sup>e</sup> (Southern Biotech, USA)
IgG <sub>2a</sub> anti-LACK	PBS-LACK 1%	Du 1/125 <sup>e</sup> au 1/4000 <sup>e</sup>	Goat anti-mouse IgG2a-HRP au 1/5000 <sup>e</sup> (Southern Biotech, USA)

**Tableau 1 :** Ac de capture et réactifs de détection utilisés dans le dosage des Ig sériques par ELISA

## **6/ Extraction d'ARN et RT-PCR en temps réel**

- **Extraction d'ARN**

L'extraction de l'ARN total de peau et des ganglions est réalisée par la méthode au Guanidium-chlorure de Césium [70]. Solution de Guanidium : Guanidium Isothiocyanate (Q-Biogene), EDTA 0,5M pH 7,4, Acétate de sodium 0,5M pH 5,5, β-mercaptoéthanol et N-lauroylsarcosine (Sigma-Aldrich). Solution de chlorure de Césium (Q-Biogene), densité 1.77, EDTA 0,5M pH 7,4 et Acétate de sodium 0,5M pH 5,5.

Les échantillons sont broyés dans la solution de Guanidium à l'aide d'un Ultra-turax (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) puis placés 1 heure en incubation à 56°C. Ils sont ensuite déposés sur le gradient de chlorure de Césium dans les tubes Beckman (Palo Alto, CA, USA) puis soumis à l'ultracentrifugation (Beckman) à 28000 tr/min pendant 20 heures à 18°C. Le culot est ensuite repris dans 200µL d'eau ppi et lavé au phénol : chloroforme : isoamyl alcohol (25:24:1, v/v, Invitrogen) et au chloroforme. L'acétate de sodium 3M pH 5,2 et l'éthanol absolu à -20°C sont ajoutés au culot. Le tout est conservé pendant au moins une nuit à -20°C. Après centrifugation (13000 tr/min à 4°C pendant 30 minutes), le culot d'ARN est lavé 2 fois avec de l'éthanol à 70% puis repris dans 10 à 30 µL d'eau ppi et conservé à -20°C. Tous les produits utilisés sont sans ribonucléase. La quantification

de l'ARN s'effectue par la lecture de la densité optique au spectrophotomètre (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Il est considéré pur si le ratio 260/280 nm est proche de 2.

- **Rétro-transcription de l'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc)**

Le volume équivalent à 2 µg d'ARN dilué dans 9 µL d'eau ppi est mélangé avec 1 µL d'oligonucléotide-dT 0,5 µg/mL (Oligo (dT)<sub>12-18</sub> primer, Invitrogen), 0,1 µL d'inhibiteur de ribonucléase (RnaseOUT à 40 UI/µL, Invitrogen) et de l'eau ppi QSP 11 µL, puis incubé à 70°C pendant 5 minutes. Après retour à température ambiante, 0,1 µL d'inhibiteur de ribonucléase, 5 µL de tampon (250mM TrisHCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, Buffer 5X, Invitrogen), 1 µL de DTT à 0,1M, 5 µL de dNTP à 10mM, 1,5 µL de Transcriptase inverse (SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen), et de l'eau ppi QSP 14 µL sont ajoutés au premier mélange, suivi d'une incubation de 2 heures à 37°C puis de 4 minutes à 95°C (pour la désactivation de l'enzyme). Enfin, 25 µL d'eau ppi sont ajoutés au mélange et l'ADNc est conservé à -20°C.

- **PCR en temps réel**

Les amorces sont conçues par le logiciel PRIMERS EXPRESS (Applied Biosystems, Warrington, UK) puis commandés chez Eurogentec. Les séquences des amorces utilisées sont détaillées ci-dessous. Un mélange constitué de 2µL d'ADNc, de 3 µL d'amorce sens et 3 µL d'amorce anti-sens (à 2.5 pmol/µL), de 12,5 µL de SYBR<sup>®</sup> Green (PCR Master Mix, Applied Biosystems), et d'eau ppi QSP 25 µL, est déposé dans des puits de fond en V sur une même plaque, comprenant 96 puits au total (ABgene, UK). Après avoir été scellée par un adhésif (Optical Adhesive Covers, ABI PRISM, Applied Biosystems), la plaque est placée dans la machine de PCR en temps réel (ABI PRISM, Applied Biosystems). La dénaturation de l'ADNc se fait pendant 15 secondes à 95°C, l'hybridation des amorces et l'élongation se font pendant 1 minute à 60°C. Ces 3 étapes sont répétées 40 fois. L'amplification de la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase) est utilisée comme témoin. Les résultats sont exprimés selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [72].

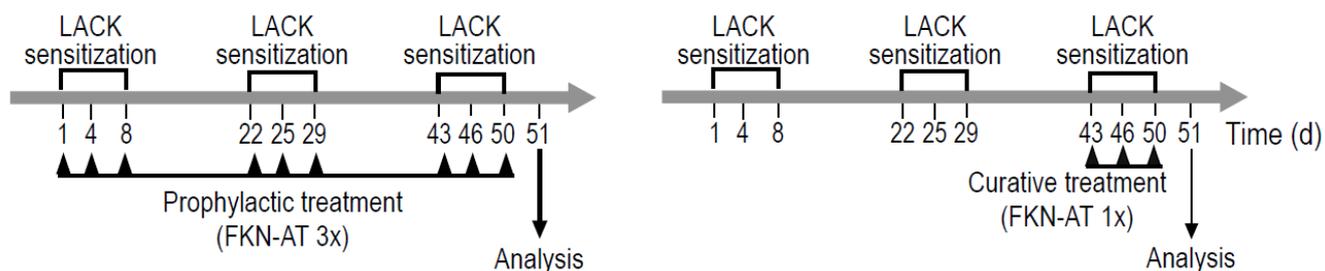
Gene	Primer	Size	Sequence
Mouse GAPDH	Forward	20	5' CGT CCC GTA GAC AAA ATG GT 3'
	Reverse	20	5' AGG TCA ATG AAG GGG TCG TT 3'
Mouse IL-4	Forward	22	5' GGT CTC AAC CCC CAG CTA GTT G 3'
	Reverse	20	5' ATG GCG TCC CTT CTC CTG TG 3'
Mouse IL-5	Forward	22	5' TGA CCG CCA AAA AGA GAA GTG T 3'
	Reverse	23	5' TTG CCC ATT CTG TAC TCA TCA CA 3'
Mouse IL-12p35	Forward	20	5' CCA AAC CAG CAC ATT GAA GA 3'
	Reverse	20	5' AGC TCC CTC TTG TTG TGG AA 3'
Mouse IL-13	Forward	20	5' TTG CAT GGC CTC TGT AAC CG 3'
	Reverse	20	5' CGT GGC GAA ACA GTT GCT TT 3'
Mouse IL-6	Forward	20	5' CCA CGG CCT TCC CTA CTT CA 3'
	Reverse	22	5' CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G 3'
Mouse IFN- $\gamma$	Forward	20	5' GCT TTG CAG CTC TTC CTC AT 3'
	Reverse	22	5' CCA GTT CCT CCA GAT ATC CAA G 3'
Mouse TNF- $\alpha$	Forward	21	5' GTC TAC TGA ACT TCG GGG TGA 3'
	Reverse	20	5' CTC CTC CAC TTG GTG GTT TG 3'
Mouse CCR4	Forward	20	5' CGG CAT TGC TTC ATA GAC TG 3'
	Reverse	20	5' GTT TCA TCC TGG GTG GTG TC 3'
Mouse CCR5	Forward	20	5' ATC CGT TCC CCC TAC AAG AG 3'
	Reverse	20	5' GCA GGG TGC TGA CAT ACC AT 3'
Mouse CXCR3	Forward	20	5' AGC CAA GCC ATG TAC CTT GA 3'
	Reverse	20	5' GAG TCA GAG AAG TCG CTC TC 3'
Mouse T-bet	Forward	20	5' CCA ACA ATG TGA CCC AGA TG 3'
	Reverse	21	5' AGC TGA GTG ATC TCT GCG TTC 3'
Mouse GATA-3	Forward	20	5' GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA 3'
	Reverse	20	5' CAT TAG CGT TCC TCC TCC AG 3'
Mouse STAT-4	Forward	20	5' CCT GGG TGG ACC AAT CTG AA 3'
	Reverse	19	5' CTC GCA GGA TGT CAG CGA A 3'
Mouse STAT-6	Forward	19	5' CAT GAA CAA CAC GGT GCC C 3'
	Reverse	22	5' GGT GAC AGA CTC TGT GCC CTT C 3'
Mouse IL-9	Forward	22	5' GAC CAG CTG CTT GTG TCT CTC C 3'
	Reverse	20	5' CCG ATG GAA AAC AGG CAA GA 3'
Mouse Foxp3	Forward	20	5' TCC TTC CCA GAG TTC TTC CA 3'
	Reverse	20	5' AGG CGA ACA TGC GAG TAA AC 3'

**Tableau 2 :** Séquence des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

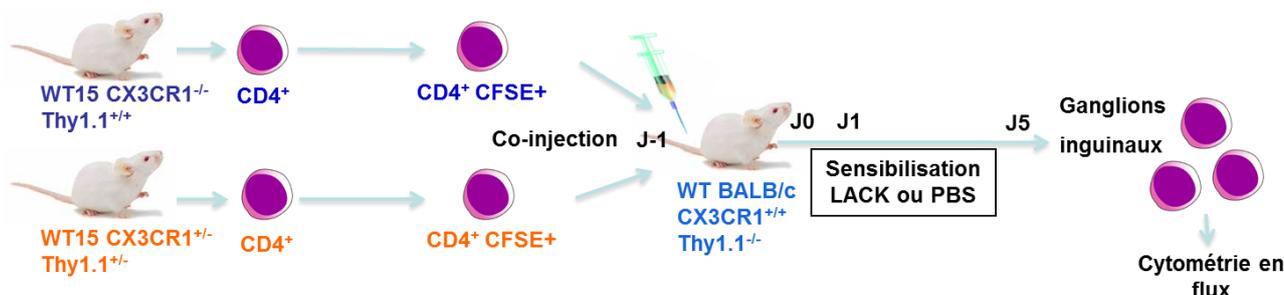
## **7/ Traitement avec un antagoniste de la Fractalkine (FKN-AT) dans le modèle de DA murine**

L'antagoniste de la Fractalkine est préparé comme décrit dans l'article récent de l'équipe niçoise [68]. Il est administré par injection intra-péritonéale 3 fois/semaine (à 50 $\mu$ g/souris) soit durant toutes les périodes de sensibilisation (protocole prophylactique) soit uniquement durant la

dernière semaine de sensibilisation (protocole thérapeutique). Les animaux sont ensuite analysés comme décrit précédemment.

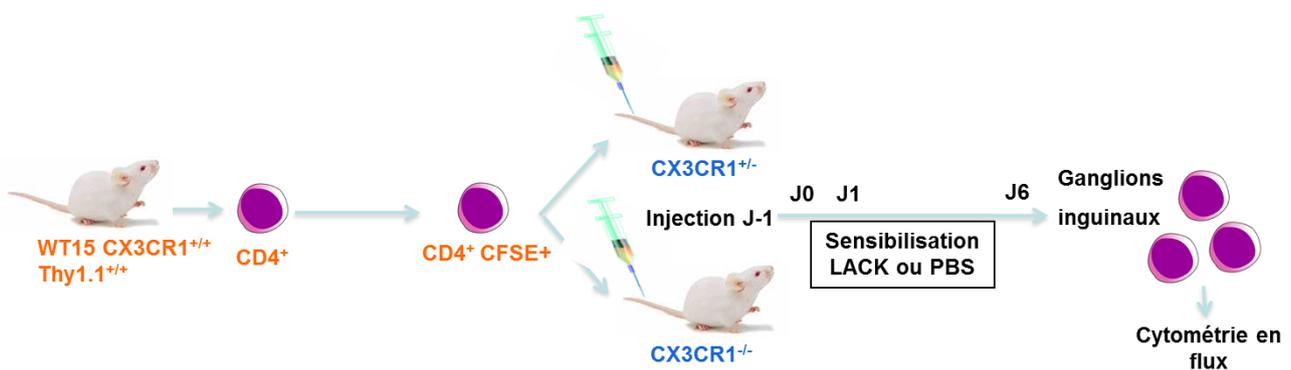


## 8/ Evaluation du rôle de CX<sub>3</sub>CR1 *in vivo* sur la prolifération des LT naïfs et la capacité de présentation antigénique



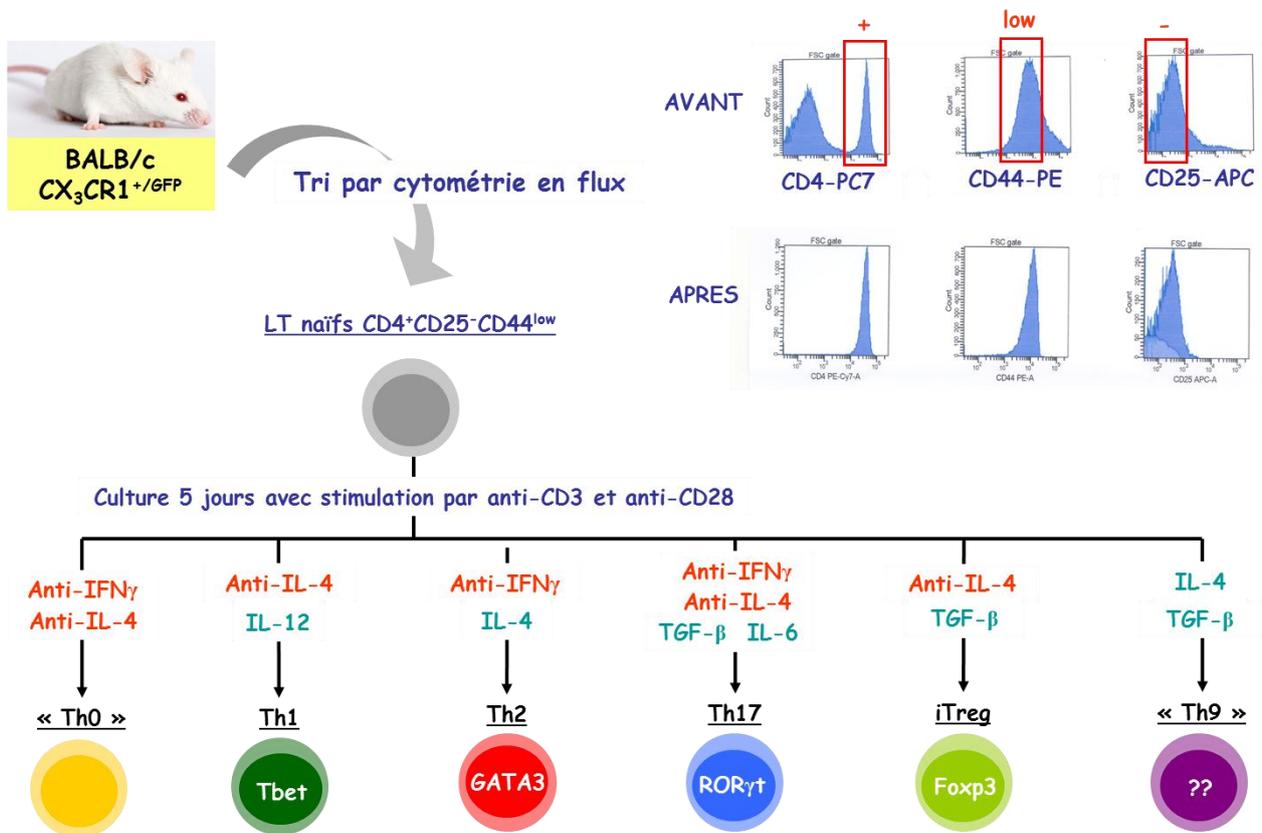
Pour quantifier la **prolifération** des LT CD4<sup>+</sup> en réponse à une sensibilisation épicutanée par LACK, les LT CD4<sup>+</sup> spléniques de souris transgéniques (exprimant un récepteur T spécifique de LACK) CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> WT15 Thy1.1<sup>+/+</sup> et de souris transgéniques CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> WT15 Thy1.1<sup>+/-</sup> ont été purifiés. Les cellules issues de souris Thy1.1<sup>+/+</sup> sont identifiées chez les souris receveuses par l'expression de Thy1.1 seul alors que les cellules issues de souris Thy1.1<sup>+/-</sup> expriment Thy1.1 et Thy1.2. Les LT des souris receveuses (souche sauvage) n'expriment ni Thy1.1, ni Thy1.2. A J0, les rates de 5 souris ont été homogénéisées. Après lyse des globules rouges (incubation dans un tampon de lyse pendant 5 minutes à 4°C), les cellules ont été resuspendues dans du tampon de lavage (PBS 0,1% BSA, 2mM EDTA). Les cellules ont été incubées 20 minutes à 4°C en présence d'anticorps de rat anti-CD45R, CD11b, Ter-119, CD16/32 et CD8 avec du sérum de veau fœtal décomplémenté. Les cellules ont été lavées, resuspendues dans le tampon de lavage puis mélangées aux billes de

dépletion (DYNAL<sup>®</sup>, Invitrogen). Ce mélange a été mis sous agitation douce pendant 15 minutes à température ambiante. Ensuite, du tampon de lavage a été rajouté et les cellules CD4<sup>+</sup> ont été purifiées par passage du mélange dans le champ d'un aimant. La pureté des cellules, mesurée en cytométrie de flux (FACS Calibur, Becton Dickinson), était  $\geq 96\%$ . Le marquage des cellules (50 millions/mL) a été réalisé dans une solution de CFSE 10 $\mu$ M pendant 10 minutes à 37°C, à l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et resuspendues à raison de 2 millions/200 $\mu$ L dans du PBS. Ces cellules ont ensuite été co-injectées à raison de 200 $\mu$ L de chaque population à des souris de souche sauvage CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> Thy1.1<sup>-/-</sup> la veille du début du protocole de sensibilisation par LACK. La prolifération est évaluée 4 jours plus tard dans les ganglions inguinaux par cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules s'étant divisées.



Pour évaluer la **capacité de présentation antigénique**, des LT CD4<sup>+</sup> spléniques de souris transgéniques (exprimant un récepteur T spécifique de LACK) CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> WT15 Thy1.1<sup>+/+</sup> ont été purifiés puis marqués au CFSE comme décrit ci-dessus. Selon le même protocole ils ont été concentrés à 2millions/200 $\mu$ L et injectés (200 $\mu$ L/souris) à des souris déficientes CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> et proficientes CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup> la veille du protocole de sensibilisation par LACK. La prolifération des cellules injectées dans les ganglions inguinaux a été évaluée 5 jours plus tard par cytométrie en flux.

## B/ POLARISATION LYMPHOCYTAIRE *IN VITRO*, ANALYSE DE L'EXPRESSION DE CX<sub>3</sub>CR1 ET DU CHIMIOTACTISME



### 1/ Animaux

Des souris femelles (âge 6 à 10 semaines, fond BALB/c ByJ), dont un allèle du gène codant pour CX<sub>3</sub>CR1 a été remplacé (par recombinaison homologue) par un gène codant pour la Green Fluorescent Protein (GFP) (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup>) ont été utilisées. Cela permet de garder la fonctionnalité du récepteur tout en pouvant évaluer son expression corrélée à l'expression de la GFP [71].

### 2/ Préparation des splénocytes

Après sacrifice des animaux par dislocation cervicale et prélèvement aseptique, la rate est placée, sur glace, dans du PBS (Gibco, Invitrogen, Santa Monica, USA) contenant 2% de SVF décomplémenté (origine Amérique du Sud, Lonza, Belgique). Après homogénéisation de la rate à l'aide d'un broyeur de type Potter (Dominique Dutscher, Brumath, France), la suspension cellulaire

est successivement filtrée sur nylon (pores 80µm puis 40µm) et centrifugée (1400 tr/min, 10 min). Les érythrocytes sont lysés à l'aide d'un tampon de lyse contenant 8.3 g/L de chlorure d'ammonium chloride dans un tampon de Tris-HCl à 0.01M (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Après 2 lavages, les splénocytes sont ensuite filtrés à nouveau puis comptés en présence de bleu Trypan (Gibco) sur cellule de Thoma (Poly Labo, Strasbourg, France) et resuspendus à  $3.10^7$  cellules/mL dans du PBS 2% SVF.

### **3/ Purification des lymphocytes T naïfs par cytométrie en flux**

Les splénocytes suspendus à  $3.10^7$  cellules/mL dans du PBS 2% SVF sont incubés 15min à 4°C en présence d'anticorps anti-CD16/CD32 (FcγRII et III) (clone 2.4G2, BD Pharmingen) à 10µg/mL permettant un blocage des récepteurs aux fractions constantes des immunoglobulines avant triple marquage membranaire pendant 30 minutes à 4°C à l'obscurité. Le tri cellulaire est réalisé par Madame J. Bertout (Institut Pasteur de Lille) à l'aide d'un cytomètre en flux (FACS Aria, Becton Dickinson) à la vitesse de 10000 à 15000 événements/seconde. Des cellules non marquées et des marquages simples (anticorps d'intérêt et isotypes contrôles) sont également préparés pour les réglages de l'appareil. Des lymphocytes T naïfs  $CD4^+CD25^-CD44^{low}$  (Veldhoen et al., 2008) sont ainsi purifiés à partir des splénocytes avec une pureté, après tri, supérieure à 98%. Le tableau 3 reprend les conditions du marquage.

Anticorps	Fluorochrome	Clone	Origine et Isotype	Marquage
anti-CD4	PC7	RM4-5	Rat IgG2a, κ	1,2 µg/mL
anti-CD44	PE	IM7	Rat IgG2b, κ	0,6 µg/mL
anti-CD25	APC	PC61	Rat IgG1, λ	4 µg/mL

**Tableau 3** : Anticorps utilisés pour le tri cellulaire

### **4/ Culture cellulaire et protocole de différenciation lymphocytaire**

Les lymphocytes T naïfs ( $CD4^+CD25^-CD44^{low}$ ) sont ensuite lavés 2 fois et resuspendus à une concentration de  $5.10^5$  cellules/mL dans du milieu de culture complet (Gibco) : RPMI 1640 contenant 25mM d'HEPES et supplémenté avec 10% de SVF (Lonza), 2mM de L-glutamine, 100UI/mL de

pénicilline, 100µg/mL de streptomycine, 50mM de 2-mercaptoéthanol, d'acides aminés non essentiels (10mM) et de pyruvate de sodium (0.5mM). Des plaques 24 puits stériles (Techno Plastic Products, Suisse) sont incubées à 37°C pendant 2 heures avec 500µL de PBS contenant 1µg/mL d'anticorps anti-CD3ε (purifié, sans azide, clone 145-2C11, BD Pharmingen) et 10µg/mL d'anticorps anti-CD28 (purifié, sans azide, clone 37.51, BD Pharmingen) puis rincées 2 fois avec du PBS juste avant de placer les cellules (1mL/puit) puis les différentes cytokines et anticorps neutralisants (Peprotech, Paris, France) selon la polarisation souhaitée [73] (tableau 4). Les plaques sont ensuite placées dans une étuve de culture (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) pendant 5 jours avant d'être lavées (avec recueil du surnageant de culture, conservé à -20°C) puis analysées.

	<b>Cytokines</b>	<b>Anticorps (5µg/mL)</b>
<b>Th0</b>	-	<b>anti-IL4 + anti-IFN<math>\gamma</math></b>
<b>Th1</b>	<b>IL-12 murine (3ng/mL)</b>	<b>anti-IL4</b>
<b>Th2</b>	<b>IL-4 murine (10ng/mL)</b>	<b>anti-IFN<math>\gamma</math></b>
<b>Th17</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1 humain (1ng/mL)</b> <b>IL-6 murine (20ng/mL)</b>	<b>anti-IL4 + anti-IFN<math>\gamma</math></b>
<b>iTregs</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1 humain (1ng/mL)</b>	<b>anti-IL4</b>
<b>« Th9 »</b>	<b>TGF-<math>\beta</math>1 humain (1ng/mL)</b> <b>IL-4 murine (10ng/mL)</b>	-

**Tableau 4 :** Cytokines et Anticorps utilisés pour la polarisation des lymphocytes T naïfs

## **5/ Contrôle de la polarisation**

### **Cytométrie intracellulaire : Cytokines**

Les lymphocytes polarisés sont lavés, comptés et resuspendus à 10<sup>6</sup> cellules/mL dans du milieu de culture complet et restimulés pendant 4 heures à 37°C avec 10ng/mL de PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acétate, Sigma-Aldrich) et 500ng/mL d'ionomycine (Sigma-Aldrich) en présence de bréfeldine A (Golgiplug, BD). Les cellules sont resuspendues à 5.10<sup>5</sup>/100µL dans des tubes 12x75mm (Sarstedt) pour être fixées et perméabilisées avec 250µL de solution contenant de la saponine et de la paraformaldéhyde à 4% (Cytofix/Cytoperm, BD Bioscience) pendant 20min à 4°C. Après lavage, les marquages sont réalisés avec les anticorps ci-dessous et l'analyse est réalisée par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson).

	Th1	Th2	Th17
<b>Ac d'intérêt</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (Clone XMG1.2, BD Pharmingen)	<b>IL-4 APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (Clone 11B11, BD Pharmingen)	<b>IL-17A APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (Clone eBio17B7, eBioscience)
<b>Isotype contrôle</b>	<b>Rat IgG1<math>\kappa</math>-APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (Clone R3-34, BD Pharmingen)	<b>Rat IgG1<math>\kappa</math>-APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (Clone R3-34, BD Pharmingen)	<b>Rat IgG2a-APC, 0.5<math>\mu</math>g</b> (eBioscience)

**Tableau 5 :** Anticorps et isotopes contrôles utilisés pour les marquages intra-cellulaires

### **Cytométrie intracellulaire : Foxp3**

Les lymphocytes polarisés en conditions T régulatrices sont lavés et resuspendus à  $10^6$  cellules/100 $\mu$ L dans des tubes 12x75mm (Sarstedt). Ils sont fixés et perméabilisés par une solution de fixation et de perméabilisation (Fix/Perm, Foxp3 staining kit, eBioscience) pendant 60 minutes à 4°C à l'obscurité. Après lavage, ils sont marqués soit avec l'isotype rat IgG2a APC (eBioscience) soit avec l'anticorps spécifique anti-Foxp3 APC (Clone FJK-16s, eBioscience) à l'obscurité pendant 30 minutes à 4°C.

### **Dosage des cytokines dans le surnageant de culture par méthode ELISA**

Les surnageants de culture sont recueillis après 5 jours de culture et conservés à -20°C jusqu'à analyse. Les anticorps de capture sont incubés dans des plaques Immulon II (Dynex Technologies, Chantilly, France) pendant 18 heures à 4°C ou à température ambiante puis les puits sont saturés par une solution de BSA 1% dans du PBS (PBS-BSA) (Bovine Serum Albumin, Fraktion V, Roche, Mannheim, Germany). Les surnageants (purs ou dilués dans du PBS-BSA 0,1% à des concentrations préalablement définies) sont ensuite ajoutés dans les puits, pour une incubation variable selon les cytokines. L'anticorps de détection biotinylé, dilué dans le PBS-BSA 0,1%, est déposé et incubé pendant 1 à 2 heures. Après 30 minutes d'incubation avec 100  $\mu$ l du complexe Streptavidine-HRP (Horse Radish Peroxidase, R&D systems) dilué dans du PBS-BSA 0,1%, la révélation est réalisée avec 100  $\mu$ l de TMB (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine, Uptima) et arrêtée par 50  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 2N. Entre chaque étape, les plaques sont lavées 3 à 5 fois au PBS-Tween (Merck) 0,05%. La lecture de l'absorbance est réalisée à une longueur d'onde de 450 nm au spectrophotomètre. Les taux de cytokines sont évalués par comparaison à une gamme étalon. Le tableau ci-dessous reprend les conditions des tests pour les différentes cytokines.

Cytokines	Fournisseur	Anticorps de capture	Anticorps de détection	Gamme étalon
IFN- $\gamma$	DUOSET, R&D Systems	4 $\mu\text{g/mL}$ , 20°C	0,8 $\mu\text{g/mL}$ , 2h	2000 à 31,3 pg/mL
IL-5	ELISA Kit, BD Pharmingen	0,5 $\mu\text{g/mL}$ , 4°C	0,5 $\mu\text{g/mL}$ , 1h	1000 à 15,63 pg/mL
IL-13	DUOSET, R&D Systems	4 $\mu\text{g/mL}$ , 20°C	0,2 $\mu\text{g/mL}$ , 2h	2500 à 39 pg/mL
IL-10	ELISA Kit, BD Pharmingen	2 $\mu\text{g/mL}$ , 4°C	1 $\mu\text{g/mL}$ , 1h	2000 à 31,3 pg/mL
IL-17	Ready Set Go, eBioscience	1/250, 4°C	1/250, 2h	500 à 7,8 pg/mL
IL-9	Ready Set Go, eBioscience	1/250, 4°C	1/250, 2h	500 à 7,8 pg/mL

**Tableau 6:** Réactifs utilisés pour les dosages par technique ELISA

## **6/ Evaluation de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 par cytométrie en flux**

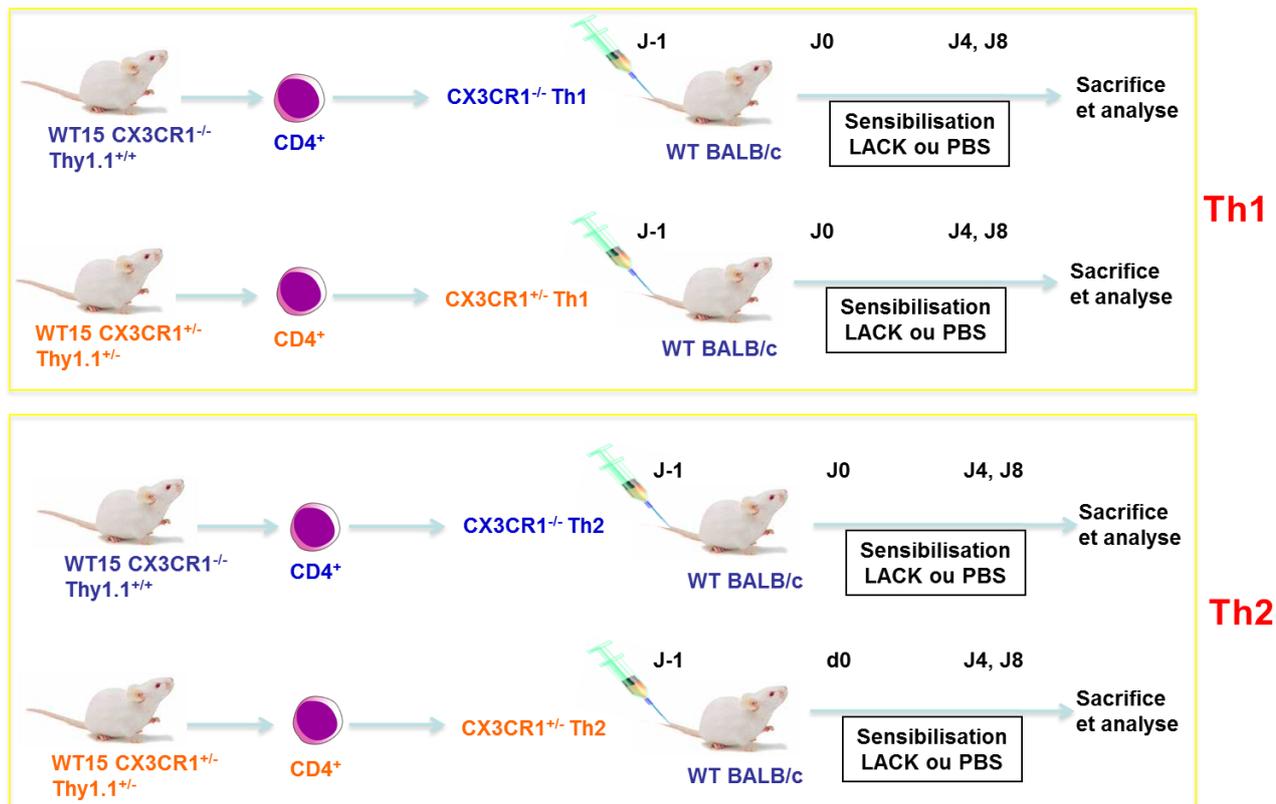
Chez les animaux CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>, l'expression de la GFP reflète l'expression physiologique de CX<sub>3</sub>CR1 [71]. La détection de la fluorescence de la GFP est donc utilisée comme marqueur de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1. Après 5 jours de culture, 10<sup>5</sup> cellules par puits sont prélevées, lavées et resuspendues dans 300 $\mu\text{L}$  de PBS SVF 2% avant d'être analysées par cytométrie. Le seuil de positivité est fixé par l'analyse des lymphocytes T naïfs avant leur mise en culture. Les cellules autofluorescentes (fluorescence détectée à une longueur d'onde ne correspondant pas à un anticorps utilisé, dans ce cas en FL-4) sont éliminées de l'analyse. Les cellules à la fois GFP positives (GFP<sup>+</sup>) et positives en FL-4 ne sont pas prises en compte. Le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> pour chaque polarisation est ainsi évalué.

## **7/ Chimiotactisme en Transwell**

Le chimiotactisme est évalué à l'aide d'un dispositif « Transwell » (membrane polycarbonate 5 $\mu\text{m}$ , insert de 6.5mm, Corning Costar) après 5 jours de culture et contrôle de la polarisation par cytométrie en flux d'une partie de la population. Les cellules sont lavées et resuspendues à 2.10<sup>6</sup>/mL dans le tampon de migration : HBSS (Gibco) contenant 1mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM de MgCl<sub>2</sub> et 0.1% de BSA. Une solution de tampon de migration contenant 0, 20 ou 100 ng/mL de Fractalkine recombinante murine (R&D Systems) est placée au fond des puits d'une plaque de culture 24 puits (600 $\mu\text{L}$ /puits). Les membranes Transwell sont ensuite ajoutées aux puits et 2.10<sup>5</sup> cellules (100 $\mu\text{L}$ ) y sont placées avant incubation 2 heures à 37°C. Après retrait du transwell et rinçage, les cellules

contenues dans le puit sont comptées en présence de bleu Trypan à 2 reprises. Un puit témoin contenant 500µL de tampon et 100µL de la suspension cellulaire (soit 200000 cellules) équivalent à une migration de 100% des cellules est également compté. Les analyses sont faites en triplicate.

**C/ ETUDE IN VIVO DANS LE MODELE MURIN DU ROLE DE L'EXPRESSION DE CX<sub>3</sub>CRC1 PAR LES LT EFFECTEURS**



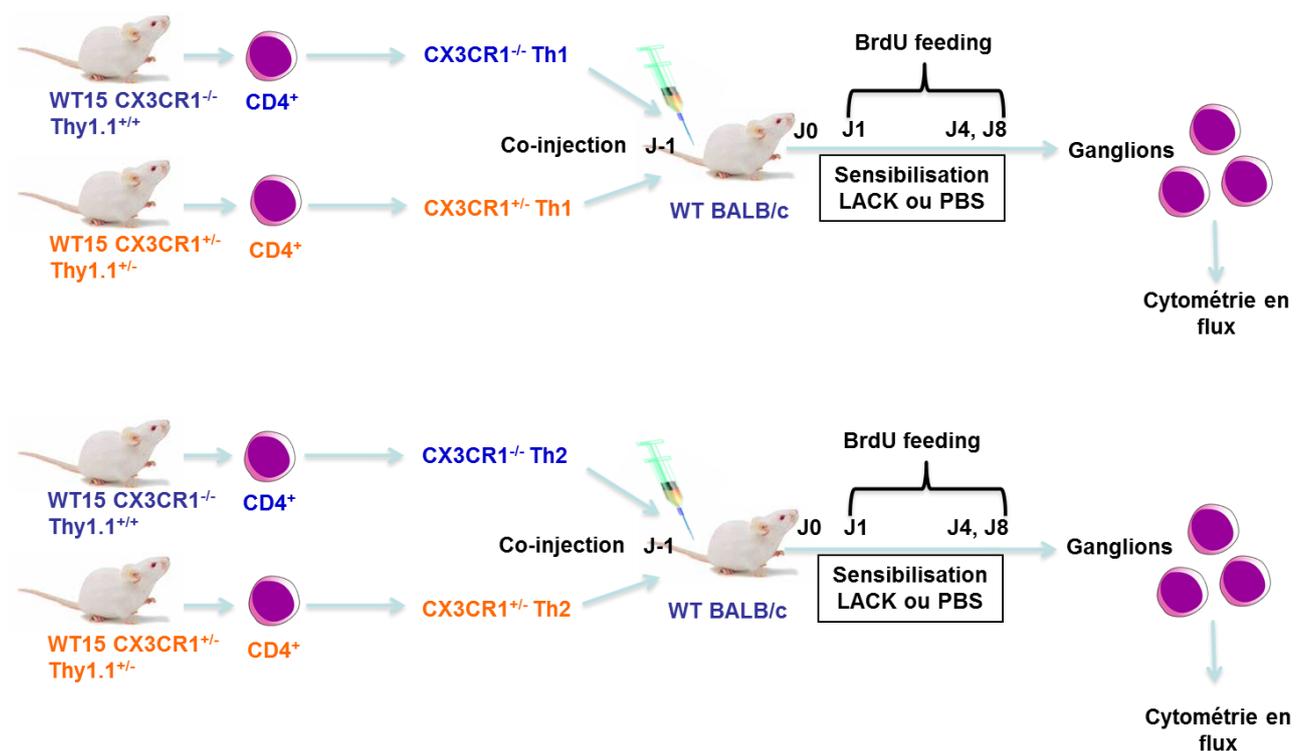
A partir de splénocytes provenant de souris transgéniques WT15 (exprimant un récepteur T spécifique de LACK) CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/-gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> (proficientes) et de souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/+</sup> (soit CX<sub>3</sub>CR1<sup>-/-</sup>, déficientes), les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs ont été isolés par tri à l'aide du cytomètre en flux comme décrit précédemment. Ces cellules ont été ensuite polarisées *in vitro* Th1 ou Th2 selon le protocole déjà décrit. Les cellules polarisés sont ensuite concentrées à 2millions/200µL et réinjectées (200µL) à des souris de souche sauvage (Thy1.1<sup>-/-</sup>) la veille d'un protocole court de sensibilisation par LACK décrit précédemment avec sensibilisation abdominale à J0 et à J4 et sacrifice à J8 avec

prélèvement cutané abdominal pour analyse histologique (épaisseur épidermique et cellularité dermique).

## D/ AUTRES EXPERIENCES IN VIVO DE TRANSFERT ADOPTIFS DE LYMPHOCYTES

### POLARISES

Dans les expériences *in vivo* décrites ci-dessous, le même nombre de lymphocytes polarisés Th1  $CX_3CR1^{+/gfp}$   $Thy1.1^{+/gfp}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$   $Thy1.1^{+/+}$  spécifiques de LACK ou de lymphocytes polarisés Th2  $CX_3CR1^{+/gfp}$   $Thy1.1^{+/gfp}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$   $Thy1.1^{+/+}$  spécifiques de LACK est co-injecté à des souris de souche sauvage ( $Thy1.1^{-/-}$ ) la veille du protocole de sensibilisation par LACK. Il s'agit du même protocole de sensibilisation court utilisé dans la partie C.



**Pour évaluer la prolifération cellulaire**, dans ce modèle expérimental, les souris receveuses de souche sauvage ont reçu une injection intra-péritonéale de 200µg de BrdU (BD Biosciences) lors des 18 dernières heures avant le sacrifice. L'incorporation respective de BrdU par les lymphocytes

injectés Th1 et Th2, CX<sub>3</sub>CR1-déficients ou CX<sub>3</sub>CR1-proficients, est ensuite évaluée par cytométrie en flux au sein des ganglions inguinaux après sacrifice à J3 (précoce) ou J7 (tardif).

**Dans le même modèle expérimental (sans le BrdU), la survie des lymphocytes injectés a été évaluée par marquage à l'Annexine-V et au 7-AAD (7 aminoactinomycin). Le pourcentage de LT injectés parmi les LT CD4<sup>+</sup> est évalué à J8 par cytométrie en flux à la fois dans la peau et les ganglions inguinaux.**

**Dans un second temps**, nous avons induit la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 par les cellules injectées. Un vecteur seul a été utilisé comme témoin négatif. Le pourcentage de LT injectés parmi les LT CD4<sup>+</sup> est toujours évalué à J8 par cytométrie en flux grâce à Thy1.1.

**Enfin, pour évaluer la rétention des LT injectés** aux sites inflammatoires, l'antagoniste de la Fractalkine (FKN-AT) a été appliqué localement simultanément à l'antigène LACK au moment des sensibilisations. Le pourcentage de LT injectés parmi les LT CD4<sup>+</sup> cutanés est évalué à J8 par cytométrie en flux grâce à Thy1.1.

## **E/ PARTIE HUMAINE**

### **1/Prélèvements humains (protocole accepté par le CPP de septembre 2010)**

Les prélèvements cutanés des malades atteints de dermatite atopique ont été réalisés dans le service de Dermatologie de l'hôpital Huriez (Pr Delaporte, Pr Thomas, Dr Staumont-Sallé, CHRU Lille). Les 7 malades recrutés sont âgés de 20 à 45 ans (moyenne 25,5 ans). Ils souffrent, depuis l'enfance, de DA (selon les critères de Hanifin et Rajka) de forme chronique, en poussée depuis 2 mois minimum. Selon l'index SCORAD, 4 malades présentaient une atteinte modérée (15-40) et 3 une atteinte sévère (supérieur à 40). Les patients traités ont arrêté tout traitement spécifique, au

minimum sur la zone de biopsie : dermocorticoïdes depuis 1 mois et immuno-suppresseurs (topiques ou systémiques) depuis 2 mois. Le traitement au moment du prélèvement reposait sur l'application d'émollients. Après recueil d'un consentement éclairé, une biopsie cutanée à l'emporte-pièce (diamètre 5mm) est réalisée en zone atteinte et conservée à -80°C jusqu'à extraction d'ARN.

Des prélèvements de 8 témoins sains ont été réalisés au cours d'actes de chirurgie plastique à la clinique Lille-Sud après explication du protocole et recueil d'un consentement éclairé la veille de l'opération. Ces témoins sains ne souffrent pas de pathologies allergiques (asthme, dermatite atopique, urticaire, rhino-conjonctivite), de dermatoses ou de maladies inflammatoires chroniques. Les témoins ainsi recrutés sont âgés de 18 à 45 ans (moyenne 28,8 ans).

## **2/ Extraction d'ARN et Rétro-transcription de l'ARN messenger en ADN complémentaire**

L'extraction de l'ARN total de peau humaine et la rétro-transcription sont réalisées selon la même méthode que celle décrite pour les prélèvements murins.

## **3/ PCR en temps réel**

La méthode est identique à celle utilisées pour les échantillons murins. Les primers utilisés sont listés ci-dessous. L'amplification de la GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogénase) est utilisée comme témoin. La seule différence est la vérification des résultats en utilisant la cyclophiline et RNA 28s comme témoin. Les résultats sont exprimés selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [72]. Le tableau 7 reprend la liste des amorces utilisées.

<b><u>GAPDH</u></b> (humain)	sens	5'- TGG AGT CCA CTG GCG TCT TC -3'
	antisens	5'- GTT CAC ACC CAT GAC GAA CAT G -3'
<b><u>CX3CL1</u></b> (humain)	sens	5'- CGA AAT GCA ACA TCA CGT GC -3'
	antisens	5'- GAT GAT TGC GCG TTT GCC -3'
<b><u>CX3CR1</u></b> (humain)	sens	5'- AGA AGC CCA AGA GTG TCA CCG -3'
	antisens	5'- GCA TTG TGG AGG CCC TTT TC -3'
<b><u>IFN<math>\gamma</math></u></b> (humain)	sens	5'- TTC AGC TCT GCA TCG TTT TG -3'
	antisens	5'- TCC GCT ACA TCT GAA TGA CCT -3'
<b><u>IL-4</u></b> (humain)	sens	5'- TTC CAC AGG CAC AAG CAG C -3'
	antisens	5'- TGG TTG GCT TCC TTC ACA GG -3'
<b><u>IL-17</u></b> (humain)	sens	5'- AAG AGA TCC TGG TCC TGC GC -3'
	antisens	5'- TCT TAG GCC ACA TGG TGG ACA -3'
<b><u>IL-10</u></b> (humain)	sens	5'- CTG TTG CCT GGT CCT CCT GA -3'
	antisens	5'- GCT GAA GGC ATC TCG GAG ATC -3'
<b><u>Foxp3</u></b> (humain)	sens	5'- GAT GAG CTG GAG TTC CGC AA -3'
	antisens	5'- TCG TCC ATC CTC CTT TCC TTG -3'
<b><u>IL-9</u></b> (humain)	sens	5'- CTT ACC TCT GCC CTG CTC CTG T-3'
	antisens	5'- CAG TGG CAC TTG GAA GCT GG -3'
<b><u>Cyclophiline</u></b> (humain)	sens	5'- GCA TAC GGG TCC TGG CAT CTT GTC C -3'
	antisens	5'- ATG GTG ATC TTC TTG CTG GTC TTG C -3'
<b><u>RNA 28s</u></b> (humain)	sens	5'- AAA CTC TGG TGG AGG TCC GT -3'
	antisens	5'- CTT ACC AAA AGT GGC CCA CTA -3'
<b><u>GAPDH</u></b> (murin)	sens	5'- TGC CCA GAA CAT CAT CCC TG -3'
	antisens	5'- TCA GAT CCA CGA CCG ACA CA -3'

**Tableau 7** : Liste des amorces utilisées pour l'analyse des échantillons humains

## **STATISTIQUES**

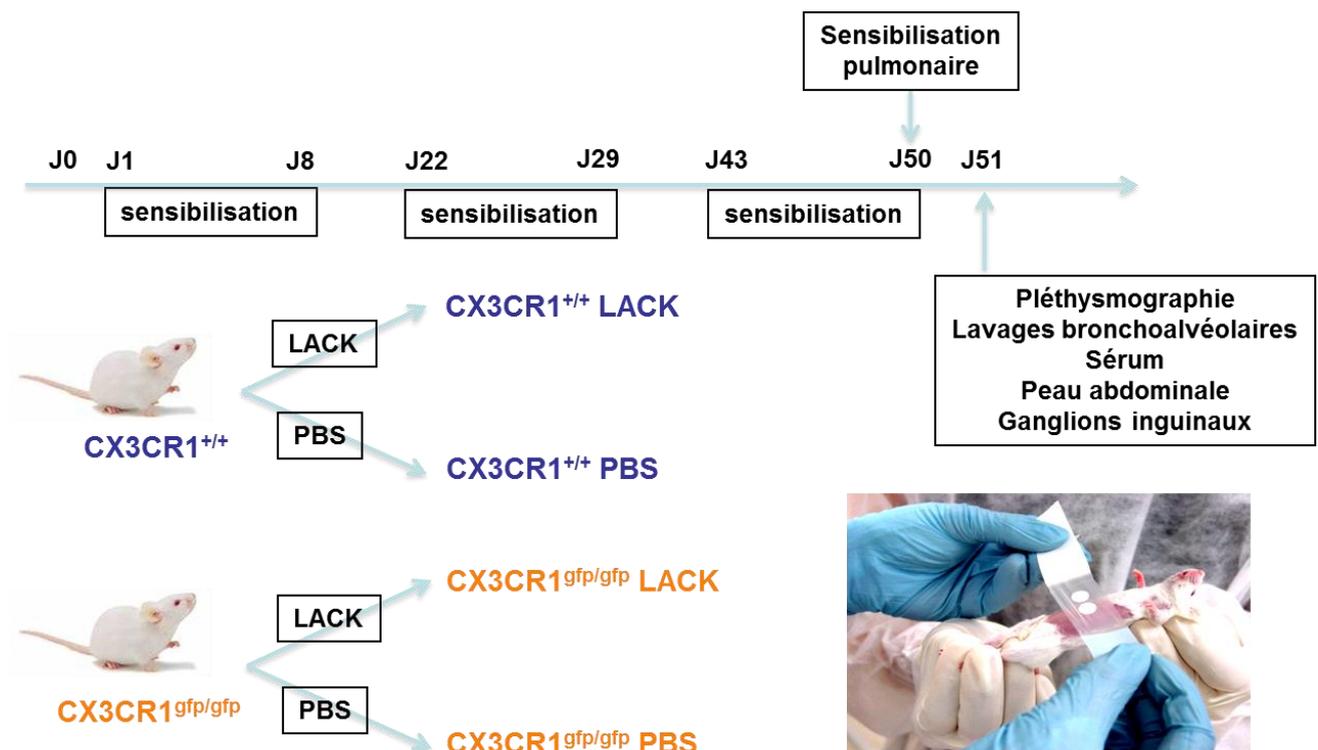
Les résultats des expériences sont analysés par le test du T de Student, en dehors des résultats de pléthysmographie pour lesquels le test ANOVA pour mesures répétées a été utilisé. Les logiciels Graphpad et STATview ont été respectivement utilisés.

Les résultats sont exprimés en moyennes +/- l'écart type. Une valeur de p inférieure à 0,05 est considéré comme significative. Pour les analyses par PCR en temps réel, nous considérons une variation inférieure à 2 fois comme non significative.

# Résultats

## ETUDE DE LA REPONSE DES SOURIS DEFICIENTES EN CX<sub>3</sub>CR1 DANS LE MODELE DE DERMATITE ATOPIQUE EXPERIMENTALE

Pour savoir si le couple Fractalkine/CX<sub>3</sub>CR1 joue un rôle dans la physiopathologie de la DA, nous avons utilisé un modèle murin de DA par sensibilisation épicutanée sans adjuvant en comparant les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>) et les souris de souche sauvage (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>). Nous avons évalué les réponses cutanées, ganglionnaires, sériques et pulmonaires.

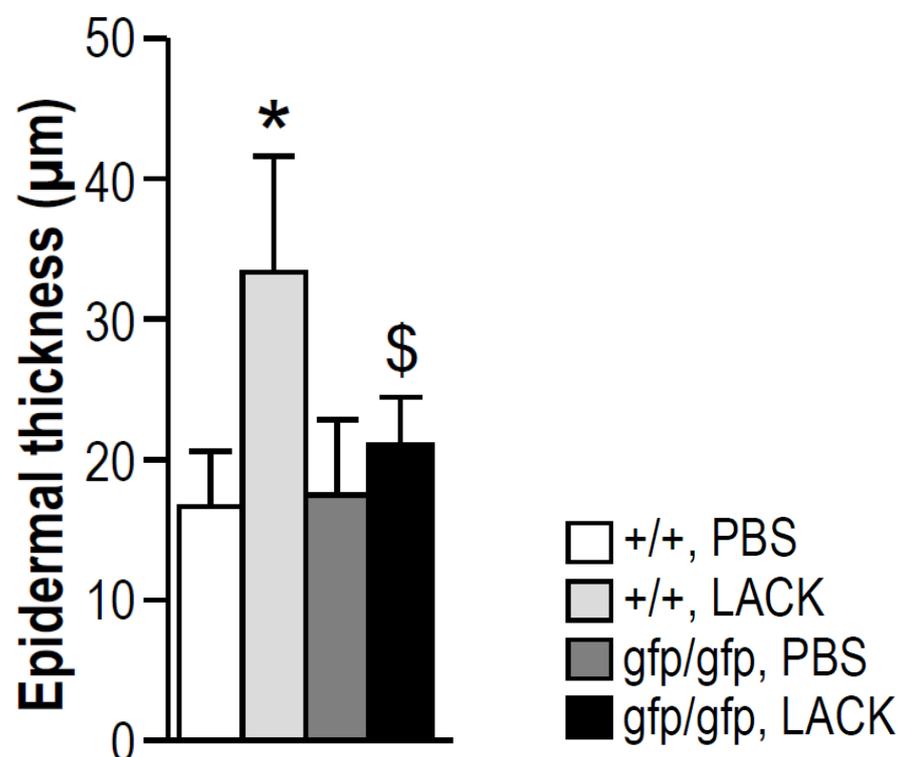


### Réponse cutanée

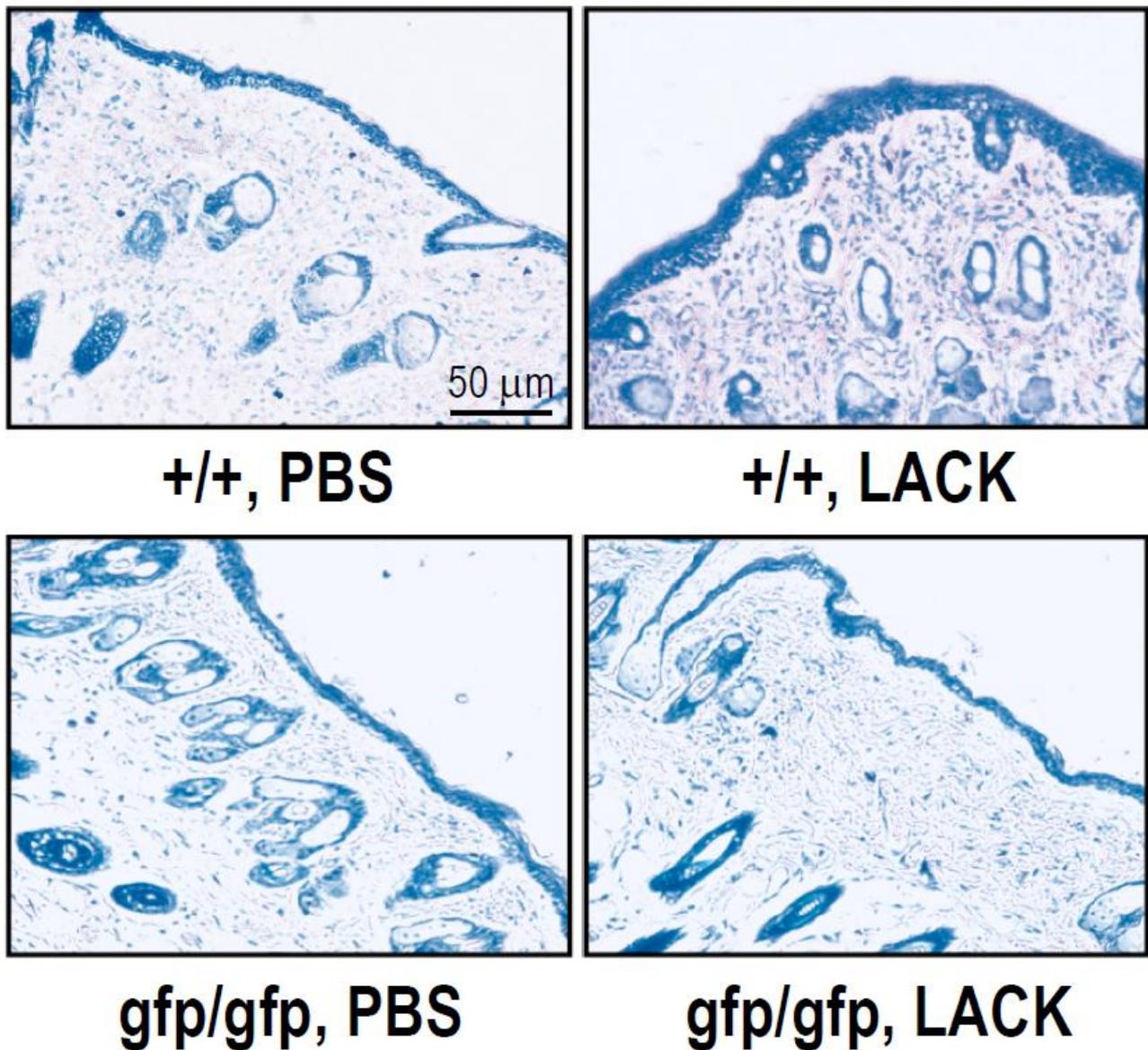
Nous avons tout d'abord analysé les aspects histologiques et cytologiques de l'inflammation cutanée induite par la sensibilisation épicutanée chez les souris de souche sauvage CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> et les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> (déficientes en CX<sub>3</sub>CR1). Nous avons ensuite quantifié l'expression des cytokines, chimiokines et facteurs inflammatoires associés par PCR en temps réel.

**L'épaississement épidermique est 2 fois plus important chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> sensibilisées au LACK (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK) que chez les souris non sensibilisées (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> PBS).**

Par contre, il n'existe pas de différence significative entre les groupes  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  non sensibilisés ( $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  PBS) et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  sensibilisés ( $CX_3CR1^{-/-}$  LACK). On note une diminution significative de 37% de l'épaisseur épidermique chez les souris déficientes  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  LACK par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  LACK (Figures 1 et 2).



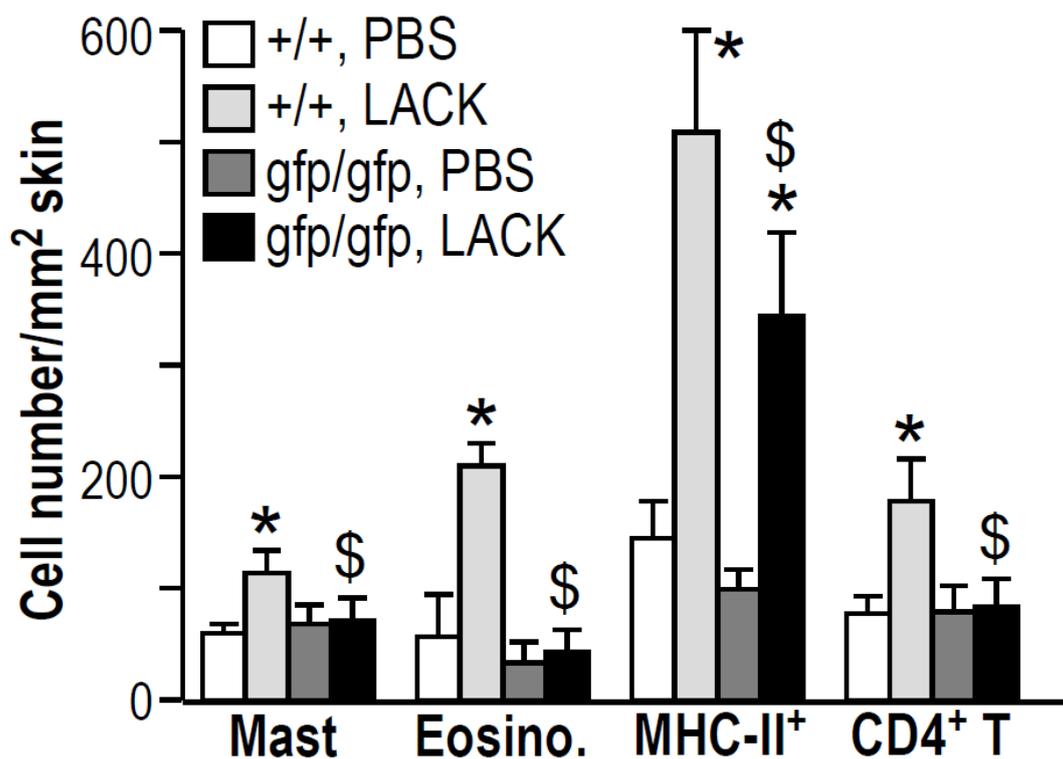
**Figure 1 :** Epaisseur de l'épiderme en  $\mu\text{m}$  chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ , sensibilisées (LACK) ou non (PBS). Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  (p inférieur à 0,05).



**Figure 2:** Analyse histologique des sections transversales de la peau des souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et des souris  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ , sensibilisées (LACK) ou non (PBS). Les coupes sont colorées au Giemsa et observées en microscopie optique à l'objectif X10.

Le recrutement dermique des mastocytes, éosinophiles, cellules CMH II<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> est **significativement plus élevé dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>** après sensibilisation par LACK, par rapport aux souris non sensibilisées. **A l'opposé, chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> PBS, le recrutement des mastocytes, éosinophiles et LT CD4<sup>+</sup> est comparable.** Une augmentation significative de 50% du nombre de cellules CMH II<sup>+</sup> (DC, monocytes, macrophages, lymphocytes B) reste présente chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> sensibilisées par LACK par rapport aux souris contrôles (PBS) (Figure 3).

**Ces résultats suggèrent une atténuation majeure de la réponse cutanée chez les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1.**



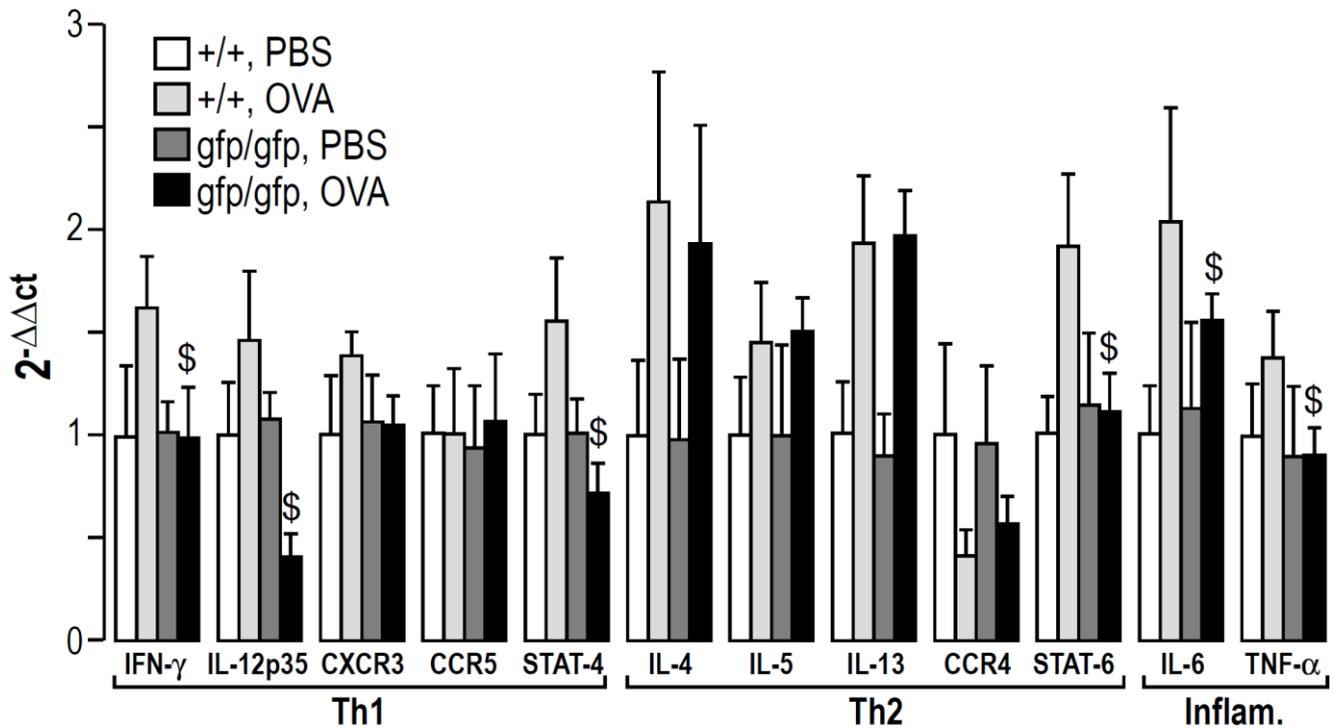
**Figure 3:** Nombre de mastocytes, d'éosinophiles, de cellules CMH II<sup>+</sup> et de LT CD4<sup>+</sup> dans le derme des souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> sensibilisées ou non au LACK. Le comptage est réalisé sur les coupes transversales de peau, après coloration au Giemsa, avec un objectif 100X et une grille quadrillée insérée dans l'oculaire. Moyenne ± écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> (p inférieur à 0,05).

**Chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> sensibilisées (LACK), une augmentation significative de l'expression des cytokines Th2, IL-4, IL-5 et IL-13, est observée par rapport aux animaux non sensibilisés. L'expression du récepteur de chimiokines CCR4, principalement par les LT Th2, est inhibée dans les deux groupes par rapport aux souris non sensibilisées. Enfin, l'expression du facteur de transcription Th2, STAT-6, est augmentée dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK par rapport au groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> PBS, alors qu'il n'existe pas de différence significative d'expression de STAT-6 entre les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> PBS (Figure 4).**

**L'expression des cytokines Th1, IFN- $\gamma$  et IL-12, du récepteur CXCR3 et du facteur de transcription STAT-4, est significativement plus importante dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> sensibilisé par LACK par rapport à tous les autres groupes. Concernant les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> sensibilisées par LACK, il n'existe pas de différence significative d'expression d'IFN- $\gamma$  et de CXCR3 avec le groupe PBS et on note une inhibition de l'expression d'IL-12 et de STAT-4. Par contre, l'expression de CCR5 est comparable chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>, sensibilisées ou non (Figure 4).**

**L'expression de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire globale de la DA chez la souris, est significativement plus importante dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK. Chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>, il n'existe pas de différence significative entre groupe PBS et groupe LACK (Figure 4).**

**Dans notre modèle expérimental de DA, la réponse Th1 cutanée est inhibée chez les souris déficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>), tout comme la réponse inflammatoire générale. La réponse Th2 paraît, par contre, préservée.**



**Figure 4 :** Analyse par PCR en temps réel de l'expression cutanée des facteurs associés à un profil Th2, Th1 et de l'IL-6 et TNF- $\alpha$  chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>, sensibilisées (LACK) ou non (PBS). Le niveau d'expression est calculé en utilisant comme référence interne la GAPDH. L'expression des divers facteurs chez les animaux CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> non sensibilisés est arbitrairement choisie égale à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> (p inférieur à 0,05).

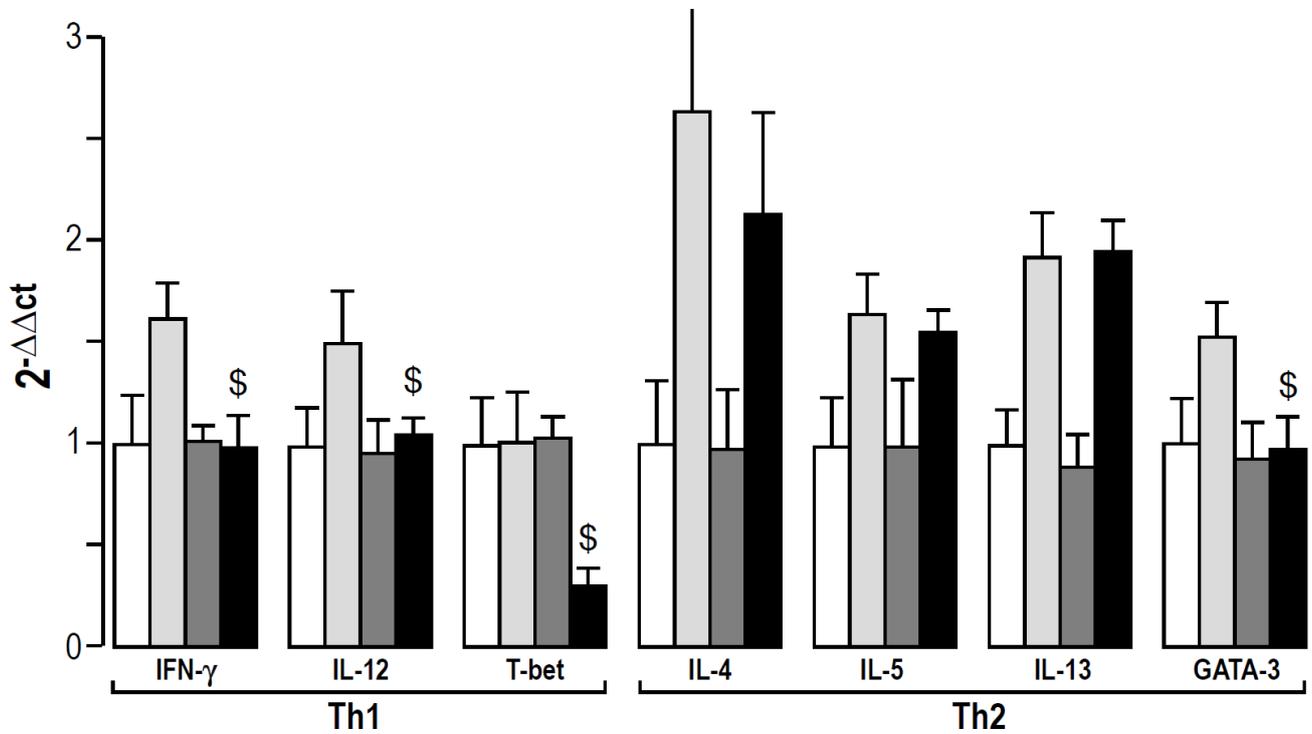
## **Réponse ganglionnaire**

Nous avons ensuite analysé la réponse ganglionnaire en évaluant par PCR en temps réel l'expression des cytokines, chimiokines et facteurs inflammatoires associés.

**L'expression des cytokines Th1, IFN- $\gamma$  et IL-12, est stimulée chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> sensibilisées par LACK par rapport aux souris contrôles (PBS) mais pas chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> sensibilisées.** L'expression de T-bet (facteur de transcription Th1) est comparable dans les groupes CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> PBS et CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> PBS, mais elle est inhibée chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK (Figure 5).

**L'expression des cytokines Th2 comme l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et du facteur de transcription GATA-3 est augmentée de façon significative dans les ganglions de drainage des souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> sensibilisées par LACK.** Dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK, l'expression d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 est également significativement supérieure à celle des souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> PBS mais l'expression de GATA-3 (facteur de transcription Th2) est comparable dans les deux groupes (Figure 5).

**Au niveau ganglionnaire, la réponse Th1 est inhibée chez les souris déficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>). La réponse Th2 paraît préservée chez ce souris en dehors d'une atténuation du facteur de transcription GATA-3. Ces résultats sont en accord avec les résultats cutanés.**



**Figure 5 :** Analyse par PCR en temps réel de l'expression ganglionnaire des facteurs associés à un profil Th1 et Th2 chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ , sensibilisées ou non par LACK. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  (p inférieur à 0,05).

## **Réponse sérique**

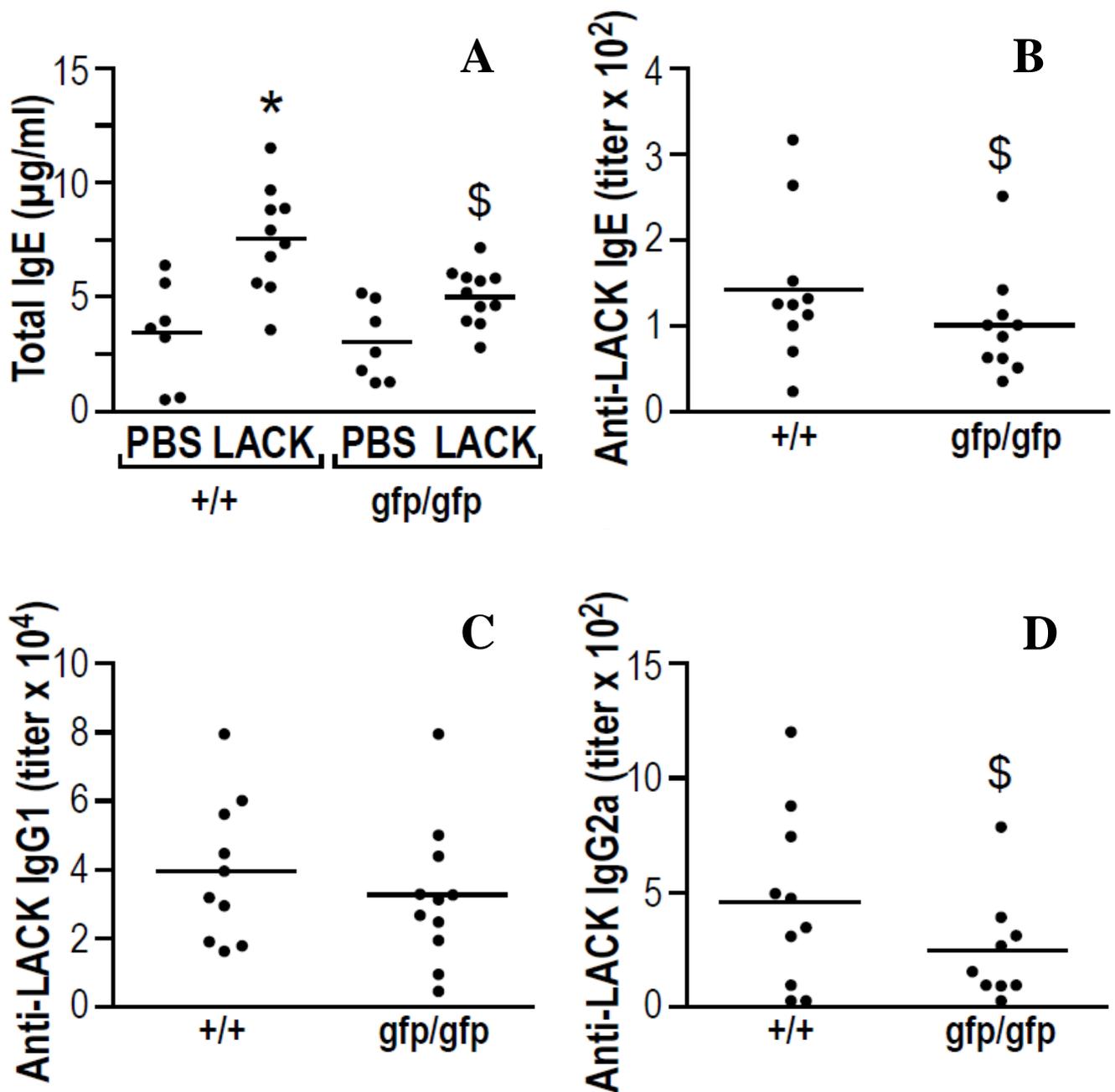
Nous avons ensuite analysé la réponse sérique en évaluant les taux des différentes immunoglobulines (Ig) impliquées dans notre modèle murin de DA.

**Les taux d'IgE totales et d'IgE spécifiques de l'antigène (IgE anti-LACK) sont significativement plus faibles dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK par rapport au groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK.** La production d'IgE totales semble plus importante dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK par rapport au groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> PBS mais la différence n'est pas significative (Figure 6).

**Le taux d'IgG1 anti-LACK n'est pas statistiquement différent chez les souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK par rapport aux souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK.** Les IgG<sub>1</sub> sont, chez la souris, caractéristiques tout comme les IgE, d'une réponse polarisée Th2 (Figure 6).

**Le taux d'IgG<sub>2a</sub> anti-LACK est significativement plus élevé dans le groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> LACK par rapport au groupe CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK.** Les IgG<sub>2a</sub> sont caractéristiques d'une réponse polarisée Th1 (Figure 6).

**La réponse sérique est atténuée chez les souris déficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>). De plus, la diminution des IgG<sub>2a</sub> chez ces souris, est un argument supplémentaire en faveur d'une atténuation de la réponse Th1.**

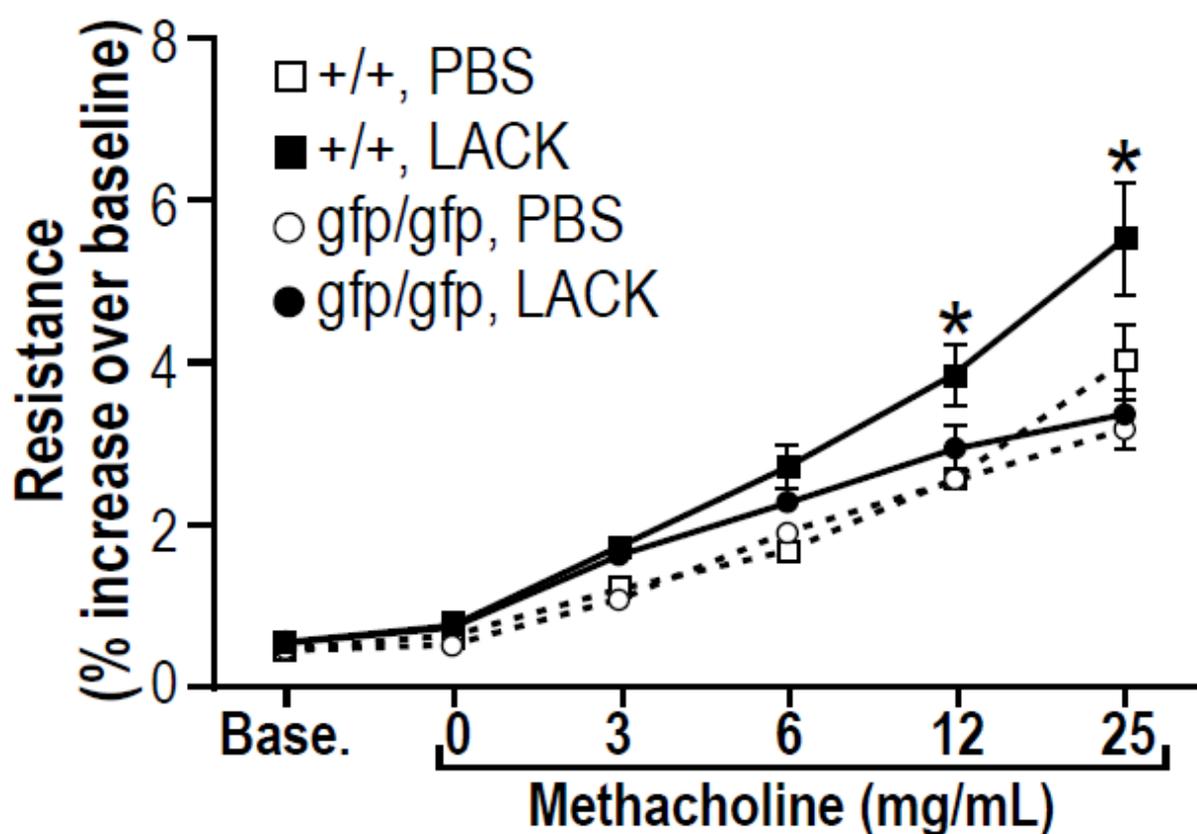


**Figure 6 :** Réponse humorale chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  suite à l'induction d'une dermatite atopique. Quantification des IgE totales (A) et titre des IgE anti-LACK (B), des IgG1 anti-LACK (C) et des IgG2a anti-LACK (D), mesurées par ELISA dans le sérum. \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  (p inférieur à 0,05).

## Réponse pulmonaire

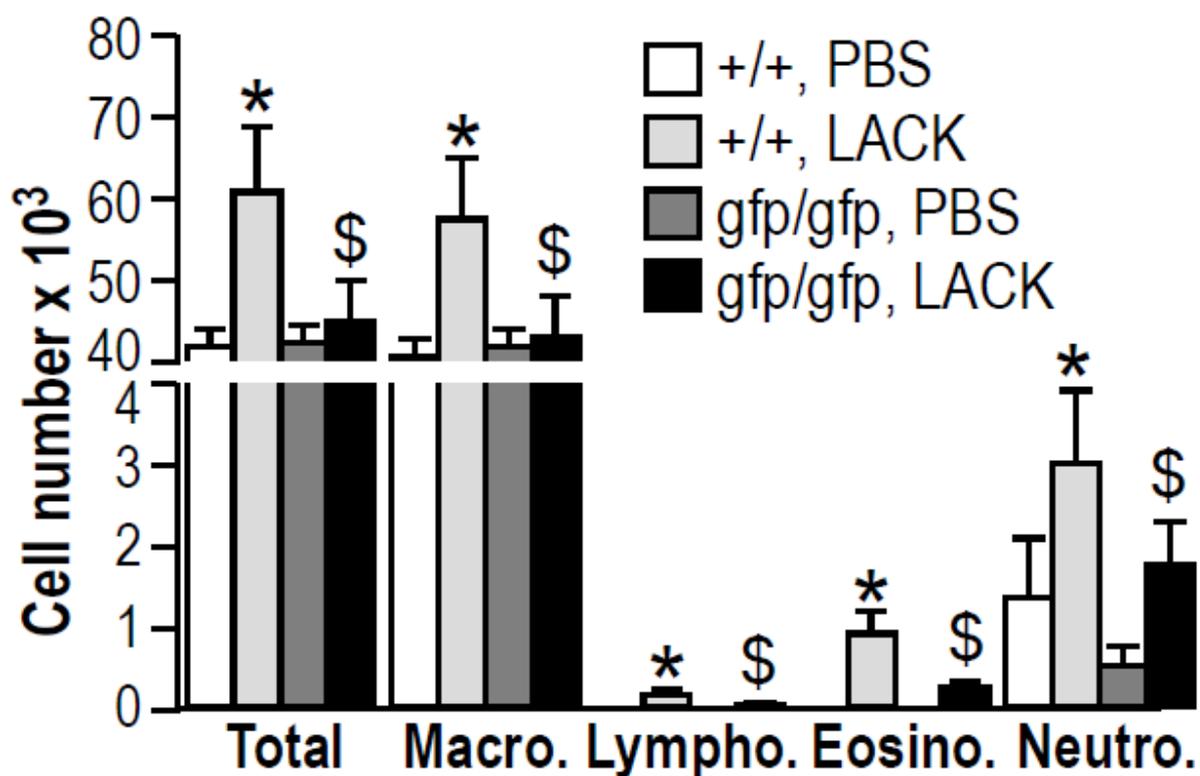
Enfin, nous avons étudié la réponse pulmonaire d'un point de vue fonctionnel et par analyse de la cellularité des lavages broncho-alvéolaires témoignant du recrutement cellulaire.

L'hyperréactivité bronchique mesurée en pléthysmographie barométrique est significativement plus importante chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  LACK par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  PBS, et ceci dès administration de méthacholine à 3 mg/mL. Les souris déficientes  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  LACK ont une Penh significativement plus faible par rapport aux souris proficientes  $CX_3CR1^{+/+}$  LACK à partir d'une concentration en méthacholine de 12 mg/mL (Figure 7).



**Figure 7 :** Analyse de l'hyperréactivité bronchique par pléthysmographie chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  sensibilisées (LACK) ou non (PBS) après inhalation de doses croissantes de méthacholine. Les résultats sont exprimés en valeurs de Penh. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05).

Le recrutement de lymphocytes, éosinophiles, neutrophiles et macrophages est significativement plus élevé dans le groupe  $CX_3CR1^{+/+}$  LACK par rapport au groupe  $CX_3CR1^{+/+}$  PBS. Par contre, chez les souris déficientes ( $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ ), il n'existe pas de différence significative entre groupe PBS et groupe LACK. On constate une diminution de plus de 70% du nombre de lymphocytes et d'éosinophiles, de 40% du nombre de neutrophiles et de 32% du nombre de macrophages entre groupes  $CX_3CR1^{+/+}$  LACK et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  LACK (Figure 8).

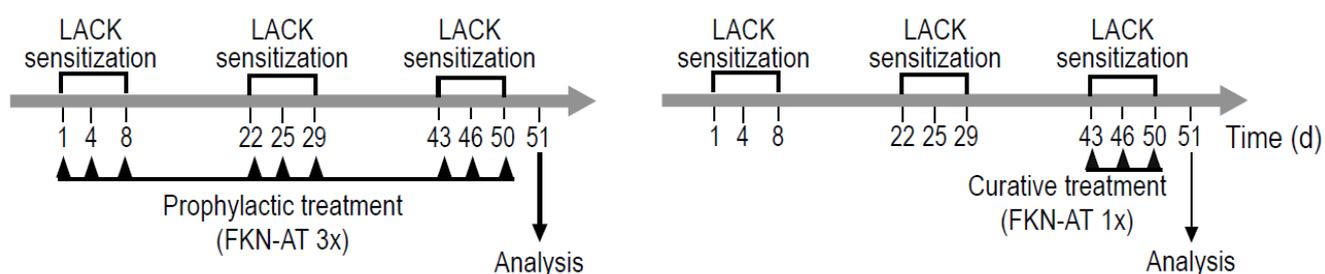


**Figure 8:** Cellularité du LBA chez les souris  $CX_3CR1^{+/+}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  sensibilisées (LACK) ou non (PBS). Les cellules sont étalées sur lame par cryocentrifugation puis colorées par le kit RAL555, permettant le comptage différentiel. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris  $CX_3CR1^{+/+}$  (p inférieur à 0,05).

**La réponse pulmonaire des souris déficientes,  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  sensibilisées, est donc nettement inférieure à celle des souris sensibilisées  $CX_3CR1^{+/+}$  avec hyperréactivité bronchique et recrutement cellulaire inhibés.**

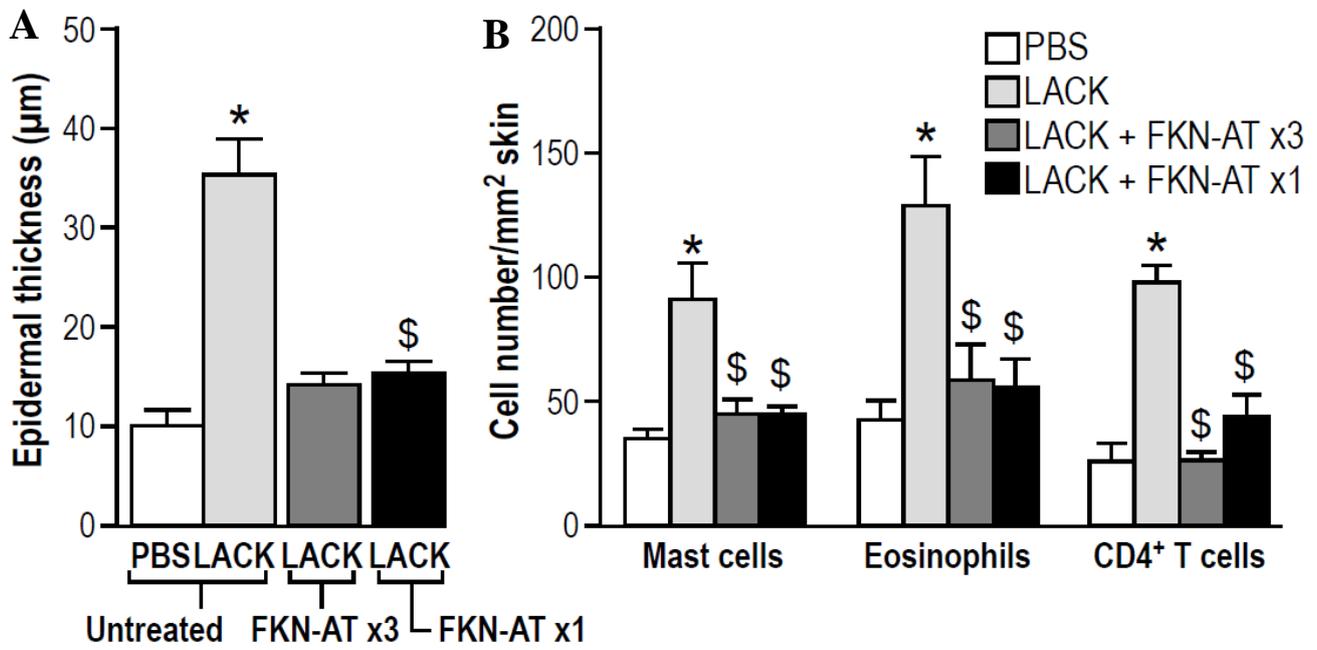
## ETUDE DE LA REPONSE A UN ANTAGONISTE DE LA FRACTALKINE DANS LE MODELE DE DERMATITE ATOPIQUE EXPERIMENTALE MURINE

Après avoir constaté l'atténuation de l'expression de la DA chez les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>), nous avons évalué la réponse à un antagoniste de la Fractalkine (FKN-AT) administré par voie intra-péritonéale selon 2 protocoles différents (thérapeutique ou prophylactique) à des souris de souche sauvage (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>) dans notre modèle expérimental. L'évaluation est faite sur l'épaississement épidermique, le recrutement cellulaire dermique et la réponse pulmonaire.



**L'épaississement cutané induit par l'antigène est complètement inhibé** dans les 2 protocoles, thérapeutique (LACK FKN-AT x1) et prophylactique (LACK FKN-AT x3), d'administration de l'antagoniste de la Fractalkine (Figure 9A).

**Le recrutement de mastocytes, d'éosinophiles et de lymphocytes CD4<sup>+</sup> est également fortement réduit** dans les groupes traités (Figure 9B).



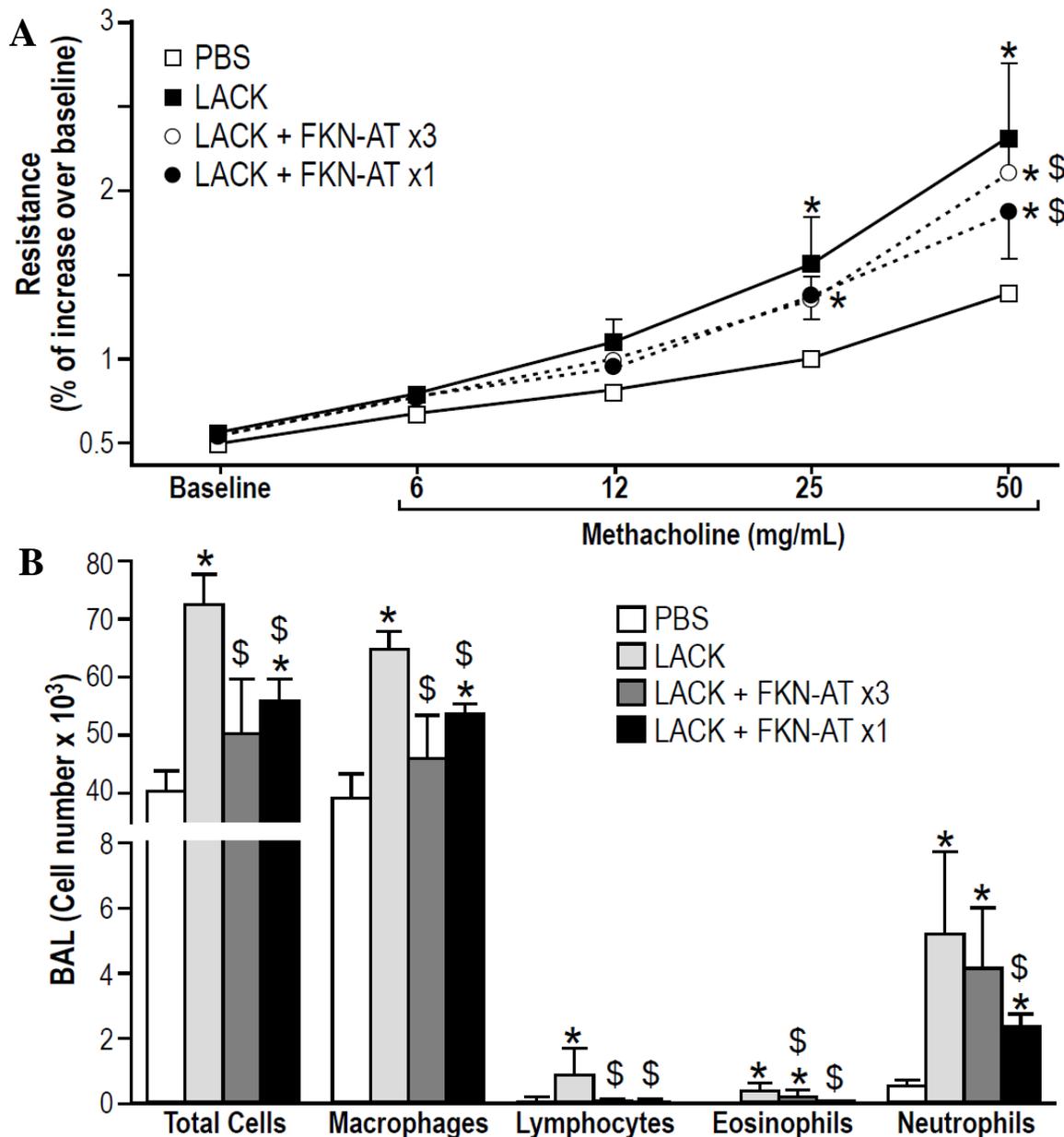
**Figures 9 :** Etude comparative des souris CX3CR1<sup>+/+</sup> non traitées sensibilisées (LACK) ou non (PBS) avec les souris traitées selon le protocole prophylactique (FKN-AT x3) ou thérapeutique (FKN-AT 1x).

**A :** Epaisseur de l'épiderme en µm

**B :** Nombre de mastocytes, d'éosinophiles, et de LT CD4<sup>+</sup> dans le derme. Le comptage est réalisé sur les coupes transversales de peau, après coloration au Giemsa, avec un objectif 100X et une grille quadrillée insérée dans l'oculaire.

Moyenne ± écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris non traitées (p inférieur à 0,05).

L'hyperréactivité bronchique et le recrutement cellulaire pulmonaire sont significativement réduits dans les groupes traités (LACK FKN-AT x3 et LACK FKN-AT x1) par rapport au groupe non traité (LACK) (Figures 10 A et B).



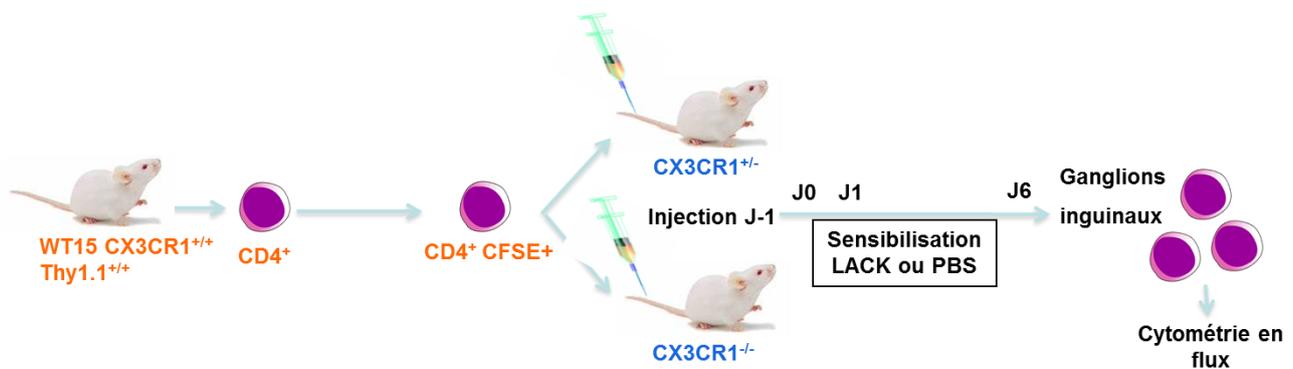
**Figures 10:** Réponse pulmonaire. **A** : Analyse de l'hyperréactivité bronchique en pléthysmographie après inhalation de doses croissantes de méthacholine. Les résultats sont exprimés en valeurs de Penh. **B** : Cellularité du LBA. Les cellules sont étalées sur lame par cryocentrifugation puis colorées par le kit RAL555, permettant le comptage différentiel. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux souris non traitées (p inférieur à 0,05).

## ETUDE DU ROLE DU COUPLE FRACTALKINE/CX<sub>3</sub>CR1 DANS LA PROLIFERATION DES LT NAIFS ET LA PRESENTATION D'ANTIGENE *IN VIVO*

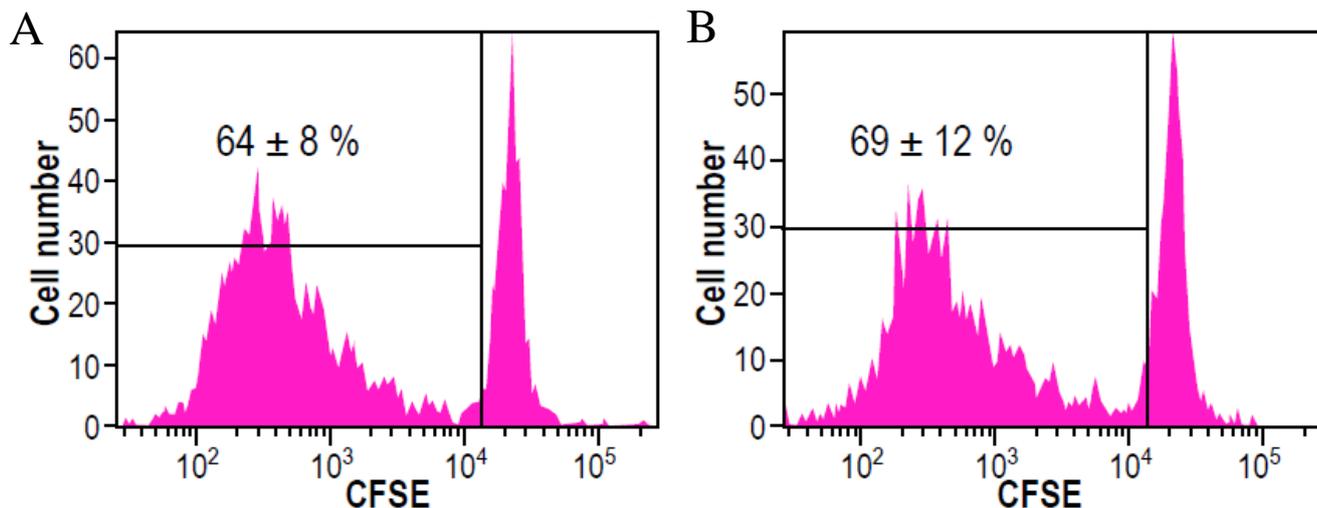
Nous avons constaté le rôle du couple CX<sub>3</sub>CR1/Fractalkine dans notre modèle expérimental murin par la diminution de l'expression de la DA chez les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 mais aussi lors de l'administration d'un antagoniste de la Fractalkine chez des souris de souche sauvage (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>). Le mécanisme d'action reste désormais à déterminer. L'influence de l'interaction CX<sub>3</sub>CR1/Fractalkine sur la présentation antigénique et sur la prolifération cellulaire des LT naïfs en réponse à la stimulation antigénique a tout d'abord été évaluée.

### Influence sur la présentation antigénique

CX<sub>3</sub>CR1 est exprimé par de nombreux types cellulaires, (notamment les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages), nous avons donc voulu savoir si la présentation antigénique était perturbée en son absence. Pour cela, des LT CD4<sup>+</sup> de souris transgéniques (WT15) exprimant un récepteur spécifique de LACK ont été marqués au CFSE et injectés à des souris proficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup>) et déficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>) sensibilisées par voie épicutanée selon un protocole de sensibilisation court d'une semaine par du LACK. Le pourcentage de cellules divisées est évalué à J6 au niveau des ganglions inguinaux.



Le pourcentage de cellules s'étant divisées est comparable dans les 2 groupes sensibilisés, souris  $CX_3CR1^{+/gfp}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ , suggérant que, par une voie de sensibilisation cutanée, le déficit en  $CX_3CR1$  n'affecte pas la présentation antigénique (Figure 11).



**Figure 11** : Cytométrie en flux représentative. A chaque division, le marquage en CFSE est diminué ce qui permet d'évaluer le pourcentage de cellules s'étant divisées parmi les cellules injectées. Pourcentage indiquant la moyenne  $\pm$  écart-type (n=6 souris par groupe).

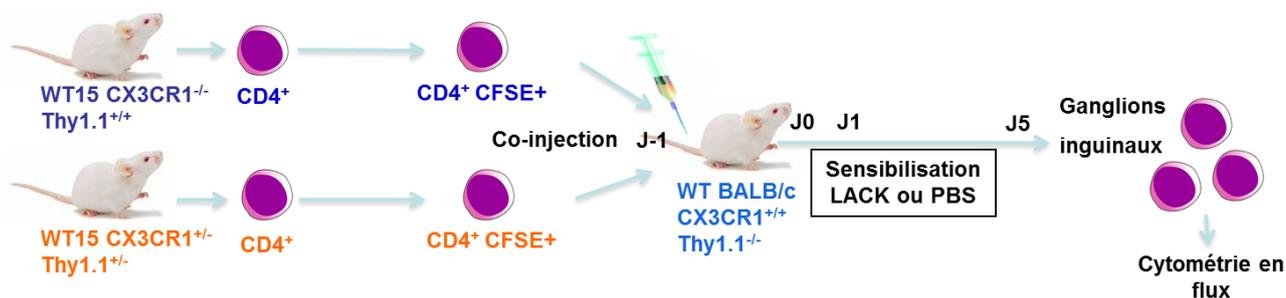
**A** : LT injectés aux souris WT15  $CX_3CR1^{+/gfp}$ , proficientes

**B** : LT injectés aux souris WT15  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ , déficientes

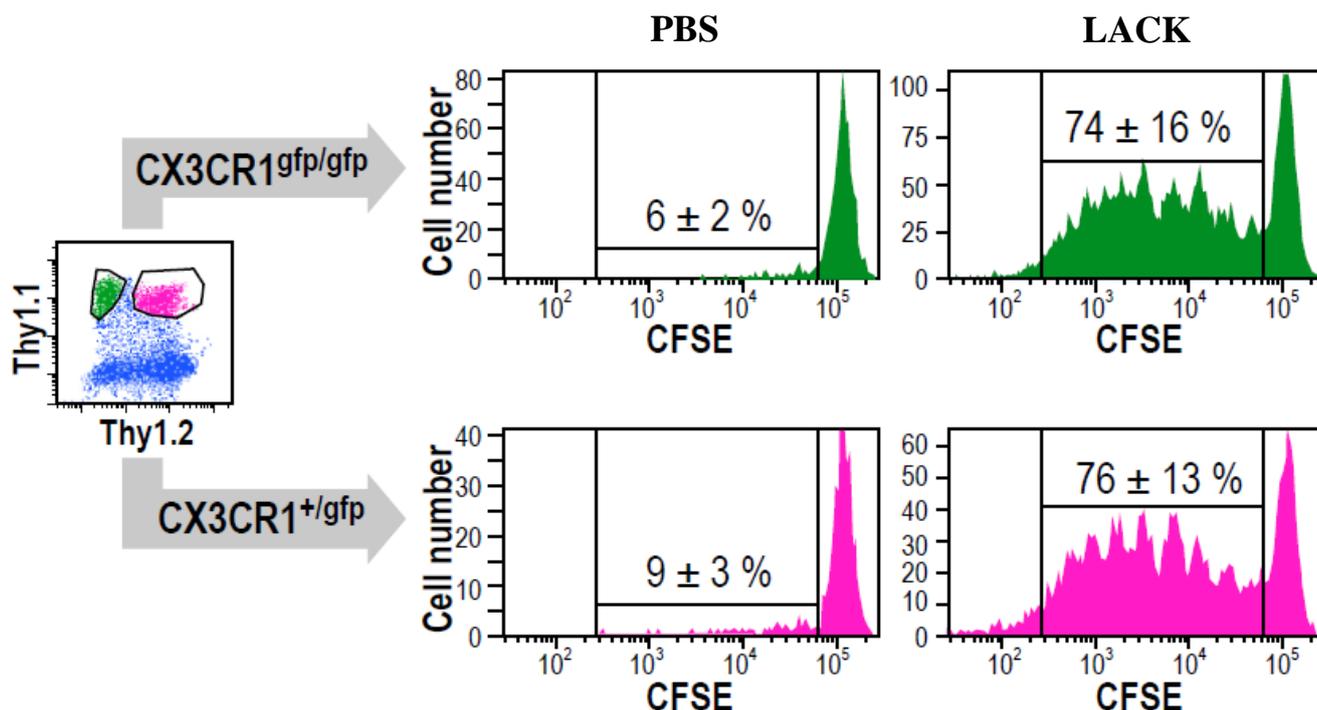
### Influence sur la prolifération des LT naïfs en réponse à l'antigène

Nous avons ensuite voulu savoir si l'absence de  $CX_3CR1$  affecte la prolifération cellulaire T induite par la sensibilisation antigénique épicutanée. Les souris donneuses transgéniques WT15, dont les LT  $CD4^+$  expriment un récepteur spécifique de LACK, sont soit  $CX_3CR1^{+/gfp}$  (proficientes) exprimant les antigènes Thy1.1 et Thy1.2 ( $Thy1.1^{+/-}$ ), soit  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  (déficientes) exprimant uniquement l'antigène Thy1.1 ( $Thy1.1^{+/+}$ ). Les LT  $CD4^+$  de ces souris, marquées au CFSE, sont co-

injectés à des souris de souche sauvage ( $CX_3CR1^{+/+}$   $Thy1.1^{-/-}$ ) qui subissent un protocole court de sensibilisation épicutanée par LACK.



Il n'y a pas de différence concernant le pourcentage de cellules s'étant divisées entre les 2 populations cellulaires injectées  $CX_3CR1^{+/gfp}$  et  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  suggérant que par une voie de sensibilisation épicutanée, le déficit en  $CX_3CR1$  n'affecte pas non plus la prolifération des LT naïfs (Figure 12).



**Figure 12** : Cytométrie en flux représentative. A chaque division, le marquage en CFSE est diminué ce qui permet d'évaluer le pourcentage de cellules s'étant divisées. Les cellules issues des souris  $CX_3CR1^{gfp/gfp}$  sont identifiées par leur expression de Thy1.1 seul (en vert) alors que celles issues des souris  $CX_3CR1^{+/gfp}$  expriment Thy1.1 et Thy1.2 (en rose). Pourcentage indiquant la moyenne ± écart-type (n=5 souris par groupe).

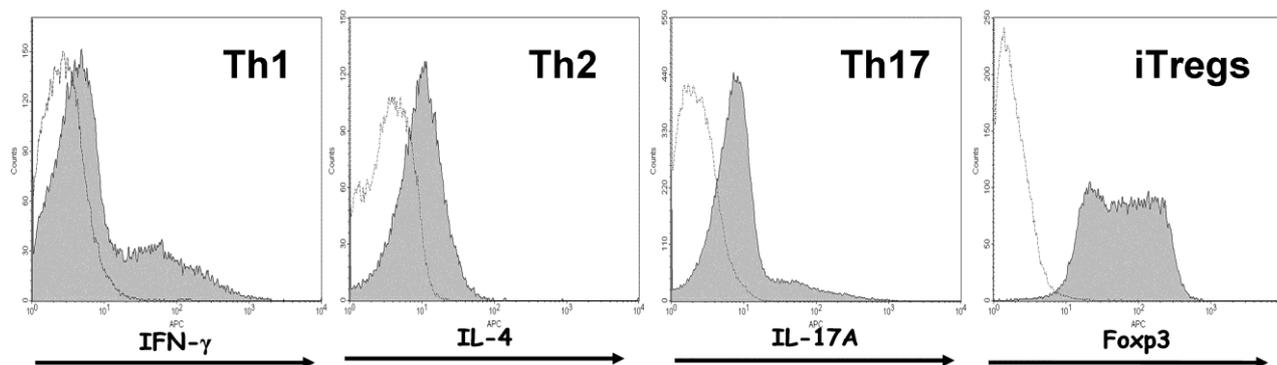
## ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE LA FONCTION DE CX<sub>3</sub>CR1 EN FONCTION DE LA POLARISATION LYMPHOCYTAIRE

Compte tenu des effets observés de la délétion de CX<sub>3</sub>CR1 dans le modèle de dermatite atopique murine, montrant une atténuation de la dermatite atopique avec une diminution préférentielle de la réponse Th1, nous avons évalué l'influence de la polarisation lymphocytaire T sur l'expression et la fonction de CX<sub>3</sub>CR1.

### Polarisation lymphocytaire *in vitro*

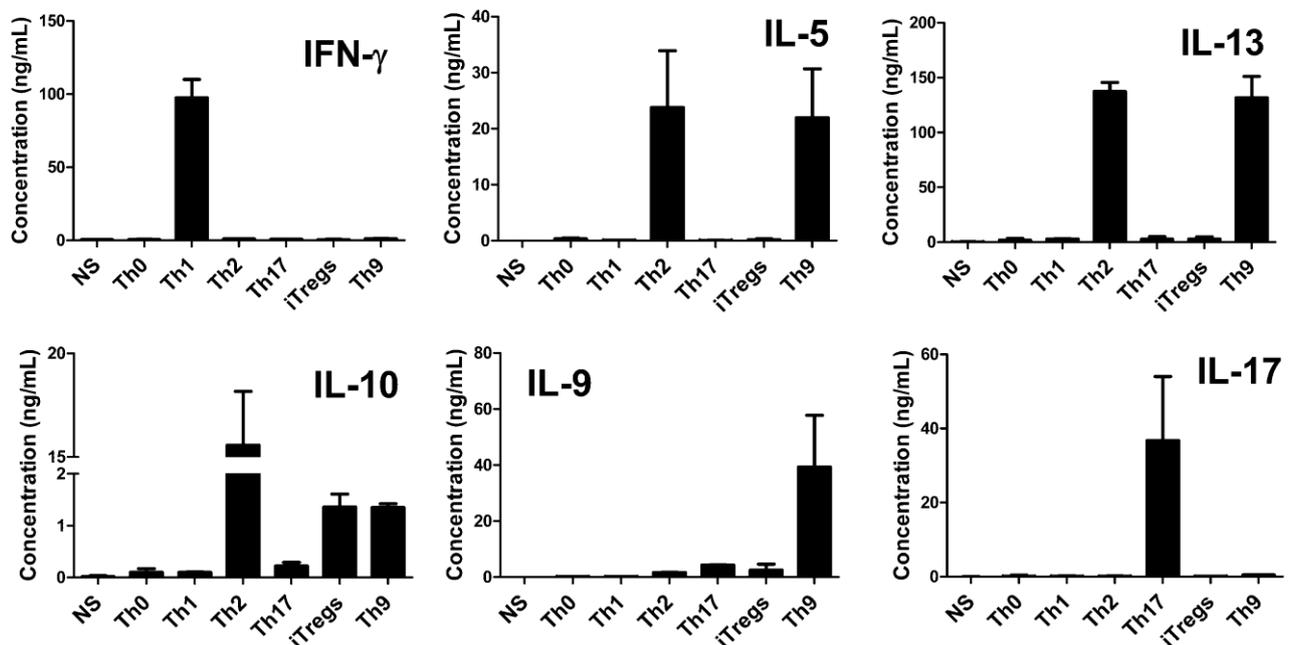
Nous avons voulu étendre l'analyse au-delà de la dichotomie classique Th1/Th2 en incluant d'autres populations lymphocytaires polarisées récemment décrites : Th17, T régulateurs induits (iTregs) et la nouvelle population récemment décrite que constituent les lymphocytes T sécréteurs d'IL-9, « Th9 », dont la relevance *in vivo* n'est pas encore connue. Les résultats ci-dessous représentent le contrôle de la polarisation validant le protocole de polarisation choisi.

**Le marquage intracellulaire montre que les cytokines caractéristiques de chaque polarisation sont exprimées fortement.** Ainsi, l'IFN $\gamma$  est exprimé par les LT Th1, l'IL-4 par les LT Th2 et IL-17A par les LT Th17. Les LT régulateurs induits expriment fortement leur facteur de transcription spécifique : Foxp3 (Figure 13).



**Figure 13:** Contrôle de la polarisation de chaque sous-population : Th1, Th2, Th17 et iTregs par cytométrie en flux. Pour chaque figure, l'isotype contrôle est représenté en pointillé et l'anticorps d'intérêt en gris plein.

**Dans les surnageants de culture**, le taux d'IFN $\gamma$  est particulièrement élevé dans les surnageants de la population Th1 contrairement aux autres populations pour lesquelles les différences avec les populations « Th0 » (LT stimulés mais non polarisés) et non stimulés (NS) n'étaient pas significatives. De même, l'IL-17A n'est retrouvée de façon significative que dans les surnageants de la population Th17. Les lymphocytes Th2 mais aussi « Th9 » sécrètent les cytokines classiquement associées à un profil Th2 (IL-5 et l'IL-13) à des taux similaires. L'IL-4, autre cytokines associée à un profil Th2, n'a pas été dosée car elle est utilisée pour la différenciation de certaines populations (Th2 et « Th9 »). L'IL-10 était retrouvée à des taux presque similaires chez les lymphocytes T « Th9 » et les iTregs et à taux plus élevés chez les lymphocytes T Th2. L'IL-9 était retrouvée dans les populations Th2 mais dans une moindre mesure par rapport à la condition « Th9 » (Figure 14).



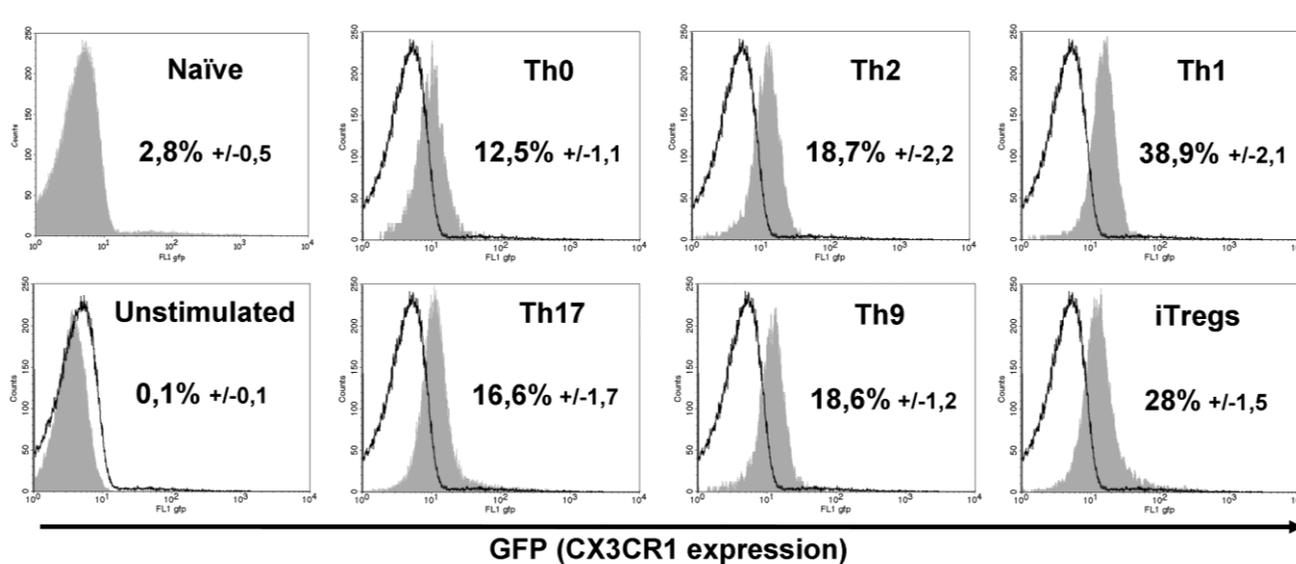
**Figure 14:** Dosage par ELISA des cytokines IFN $\gamma$ , IL-5, IL-13, IL-17, IL-10 et d'IL-9 dans les surnageants de culture des différentes populations de lymphocytes T polarisés. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  l'écart type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate.

## Expression de CX<sub>3</sub>CR1 selon la polarisation lymphocytaire *in vitro*

Ayant obtenu de manière reproductible les différentes polarisations lymphocytaires *in vitro*, l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 au niveau de chaque population polarisée a été évaluée par cytométrie en flux via la GFP. Les lymphocytes T naïfs polarisés sont issus de souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> conservant un allèle de CX<sub>3</sub>CR1 fonctionnel et permettant de quantifier, sans modification artificielle, l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 qui est corrélée à celle de la GFP.

**Les lymphocytes T naïfs utilisés comme référence expriment peu CX<sub>3</sub>CR1.** Après les 5 jours de culture *in vitro* nécessaire à la polarisation, cette expression disparaît en l'absence de stimulation. Elle est augmentée dans la population « Th0 » stimulée mais non polarisée. **Les LT Th2, Th9 et Th17 ont une expression comparable, supérieure aux LT Th0 mais inférieure aux LT Th1 et aux iTregs** (figure 15).

**La stimulation via le TCR est donc nécessaire à l'expression de CX<sub>3</sub>CR1. Les LT polarisés Th1 sont ceux qui expriment le plus fortement CX<sub>3</sub>CR1.**



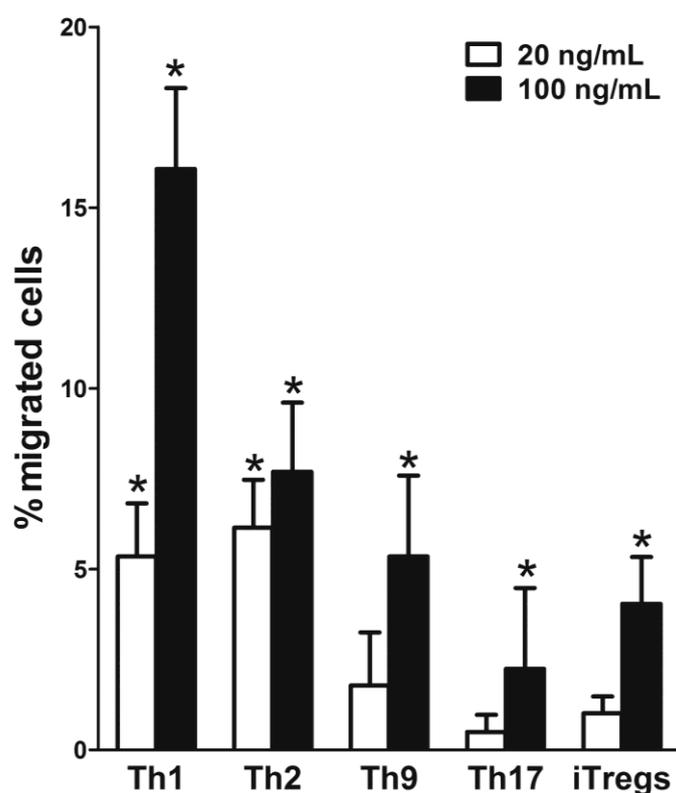
**Figure 15:** Expression de GFP représentative de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 dans notre modèle par les différentes populations lymphocytaires polarisées (en gris plein) en comparaison aux lymphocytes T naïfs. Cytométrie en flux représentative. Le pourcentage indiqué représente la moyenne  $\pm$  l'écart type de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicate.

## Chimiotactisme *in vitro* en réponse à la Fractalkine des différentes populations polarisées

Après avoir relevé l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 par les différentes populations de LT polarisés, nous avons voulu savoir si ces différences avaient un retentissement fonctionnel sur la migration en réponse à son ligand, la Fractalkine. Des tests de chimiotactisme en Transwell ont donc été réalisés.

**A la concentration de 20ng/mL, seules les populations Th1 et Th2 migrent de façon significative** (Figure 16).

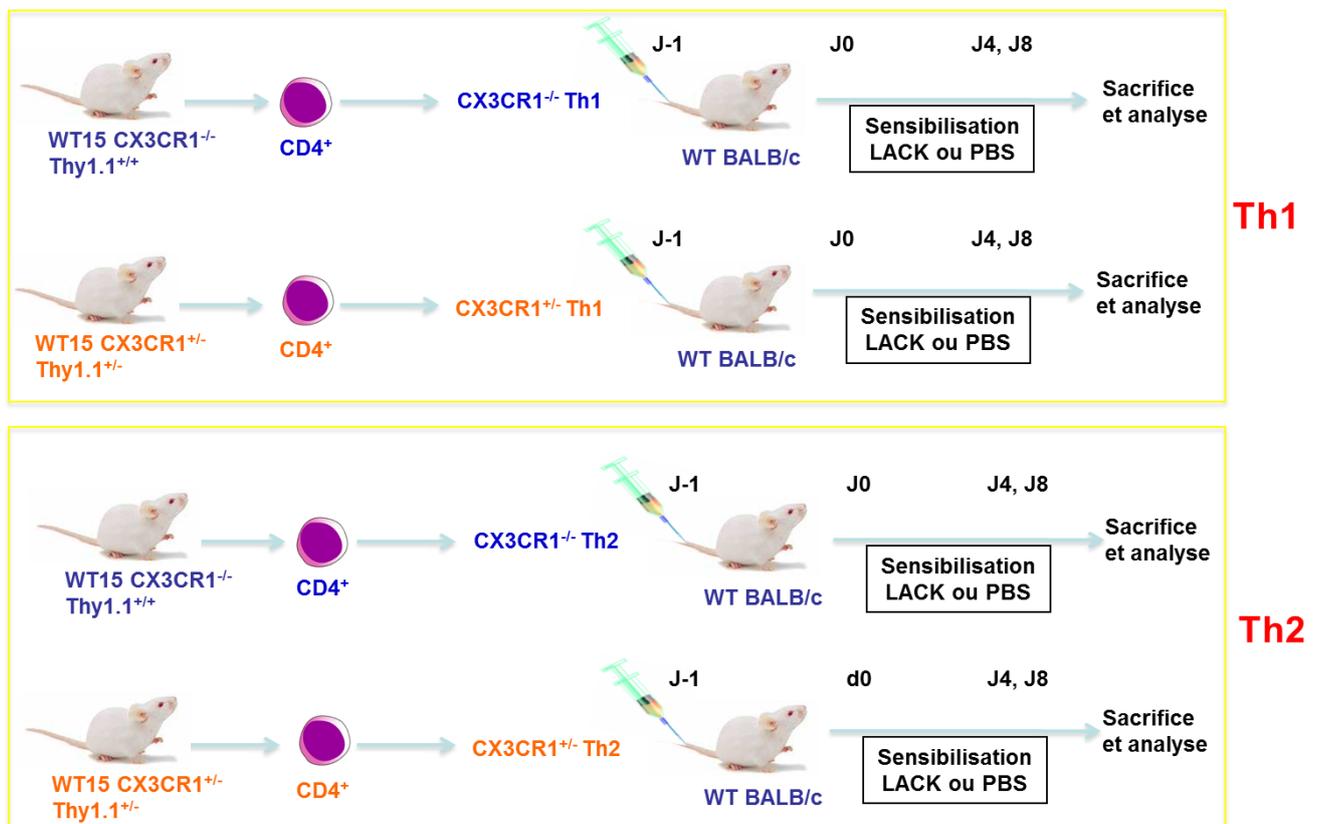
**A la concentration de 100ng/mL, toutes les populations de LT polarisés migrent significativement avec la migration la plus importante constatée pour les LT polarisés Th1.** On distingue 3 groupes : les LT Th17 migrant assez peu, les LT Th2, Th9 et iTregs migrant significativement plus et les LT Th1 migrant au minimum 2 fois plus que toutes les autres conditions de polarisation et de façon significative (Figure 16).



**Figure 16:** Chimiotactisme en Transwell des différentes populations polarisées en réponse à 20 ou 100ng/mL de Fractalkine recombinante. Résultats exprimés en pourcentage de migration nette  $\pm$  l'écart type; une condition avec du milieu seul servant à soustraire la migration basale non spécifique, équivalente dans toutes les conditions. (n=3, triplicate pour chaque condition).

## Rôle *in vivo* de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 sur l'inflammation cutanée induite par les LT polarisés

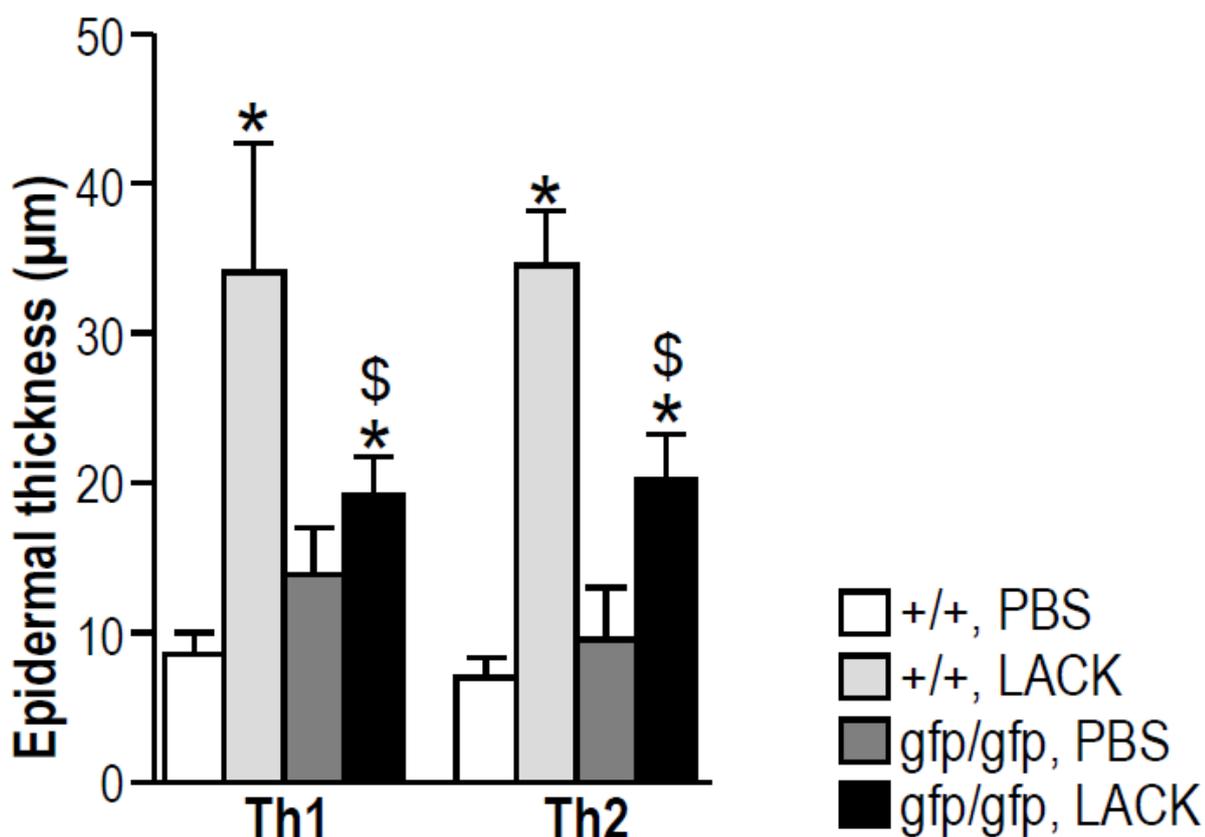
Après avoir constaté, *in vitro*, une expression de CX<sub>3</sub>CR1 et une migration plus importante après stimulation et polarisation, notamment pour les LT polarisés Th1, nous avons voulu évaluer la relevance *in vivo* de ses observations. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle des LT Th2 et Th1, impliqués dans la physiopathologie de la DA humaine et dans notre modèle murin, associés respectivement aux phases aiguë et chronique de la maladie. Des LT issus de souris transgéniques (WT 15), dont le TCR est spécifique de LACK, proficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>) ou déficientes (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>), ont été polarisés *in vitro* Th1 ou Th2 puis injectés à des souris de souche sauvage (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup>). Ces souris ont ensuite été sensibilisées par voie épicutanée par LACK (protocole court d'une semaine) ou PBS (contrôle négatif). La réponse est évaluée par l'épaississement épidermique et l'infiltrat cellulaire dermique à J8.



L'épaississement épidermique est induit de manière **significativement plus importante** par les LT polarisés Th1 et Th2 proficients ( $CX_3CR1^{+/gfp}$ ) chez les souris sensibilisées, 4 à 5 fois supérieur aux groupes PBS (Figure 17).

L'épaississement épidermique induit par les LT Th2 déficients ( $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ ) est **moindre**, seulement 2 fois supérieur au groupe PBS (Figure 17).

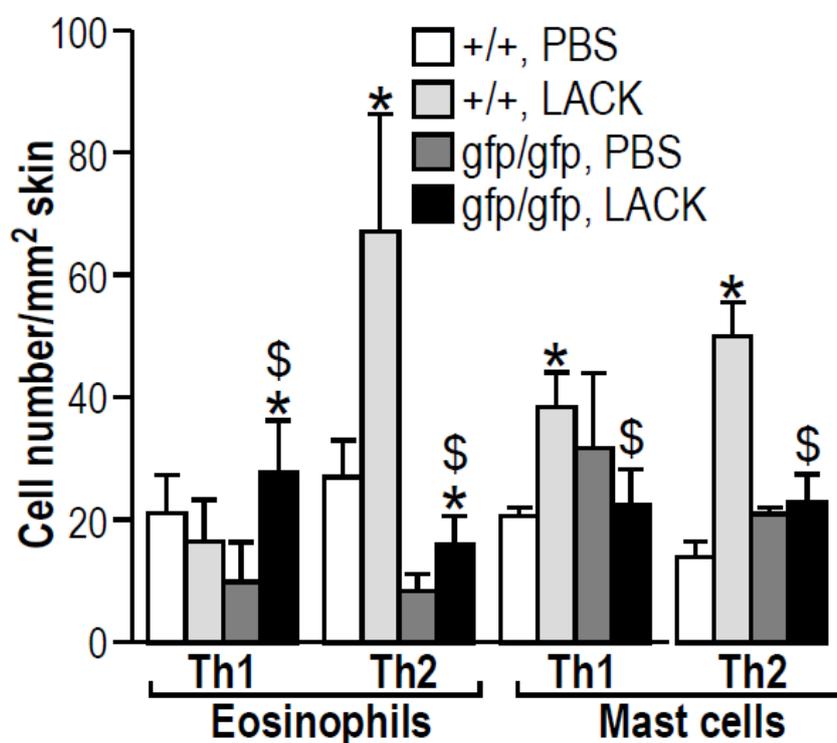
Concernant les LT Th1 déficients ( $CX_3CR1^{gfp/gfp}$ ), l'épaississement épidermique induit est **minime** avec une différence très faible entre les groupes sensibilisés ou non (Figure 17).



**Figure 17:** Epaisseur de l'épiderme en  $\mu\text{m}$  à J8. Moyenne  $\pm$  écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux cellules proficientes (p inférieur à 0,05).

**L'infiltration dermique mastocytaire n'est induite que par les LT Th1 et Th2 proficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>).** Les LT Th1 et Th2 déficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>) n'induisent aucun infiltrat supplémentaire par rapport aux groupes contrôles (Figure 18).

**L'infiltration dermique éosinophilique n'est induite que par les LT Th2 proficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>).** Les LT Th1 proficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>) et les LT Th1 et Th2 déficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>) n'induisent aucun infiltrat supplémentaire par rapport aux groupes contrôles (Figure 18).

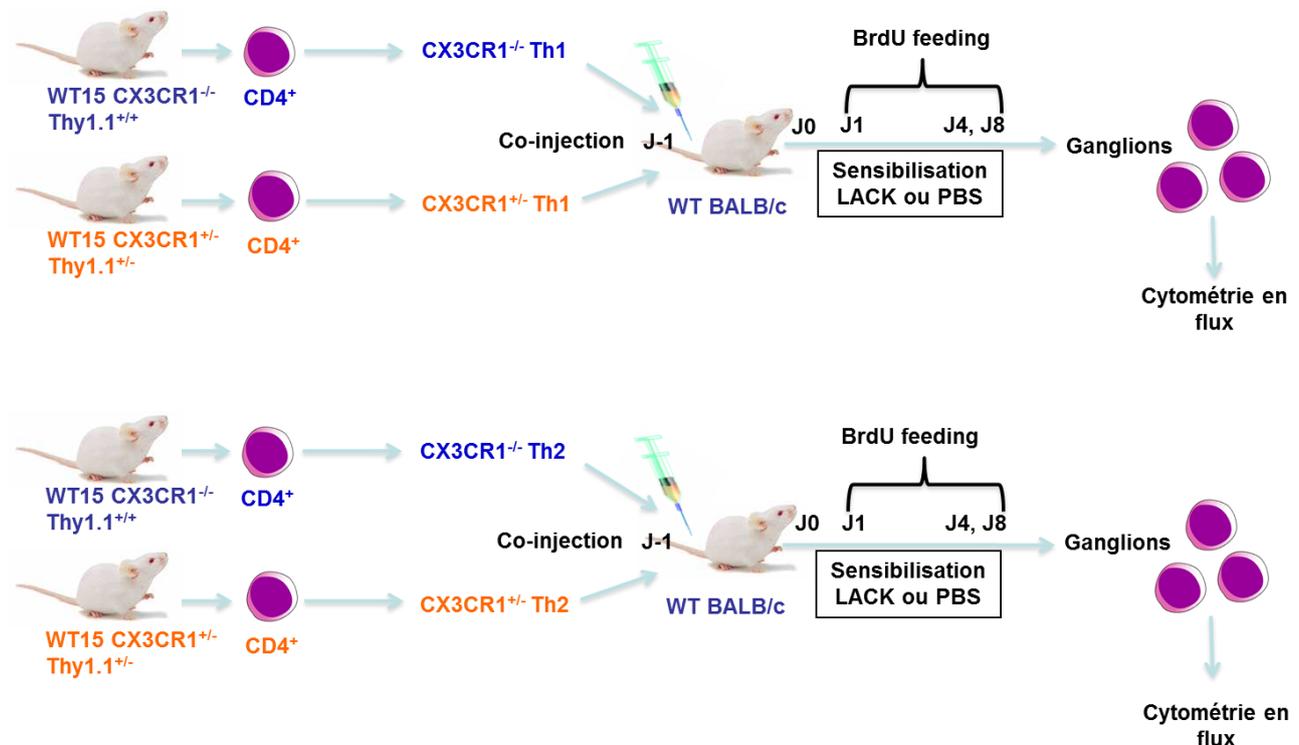


**Figure 18:** Nombre de mastocytes et d'éosinophiles dans le derme. Le comptage est réalisé sur les coupes transversales de peau, après coloration au Giemsa, avec un objectif 100X et une grille quadrillée insérée dans l'oculaire. Moyenne ± écart-type (n=6-10 animaux par groupe). \* : statistiquement significatif par rapport aux souris PBS (p inférieur à 0,05). \$ : statistiquement significatif par rapport aux cellules proficientes (p inférieur à 0,05).

**Ces résultats suggèrent que l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 par les LT Th1 et Th2 régule l'expression de la dermatite atopique dans le modèle murin.**

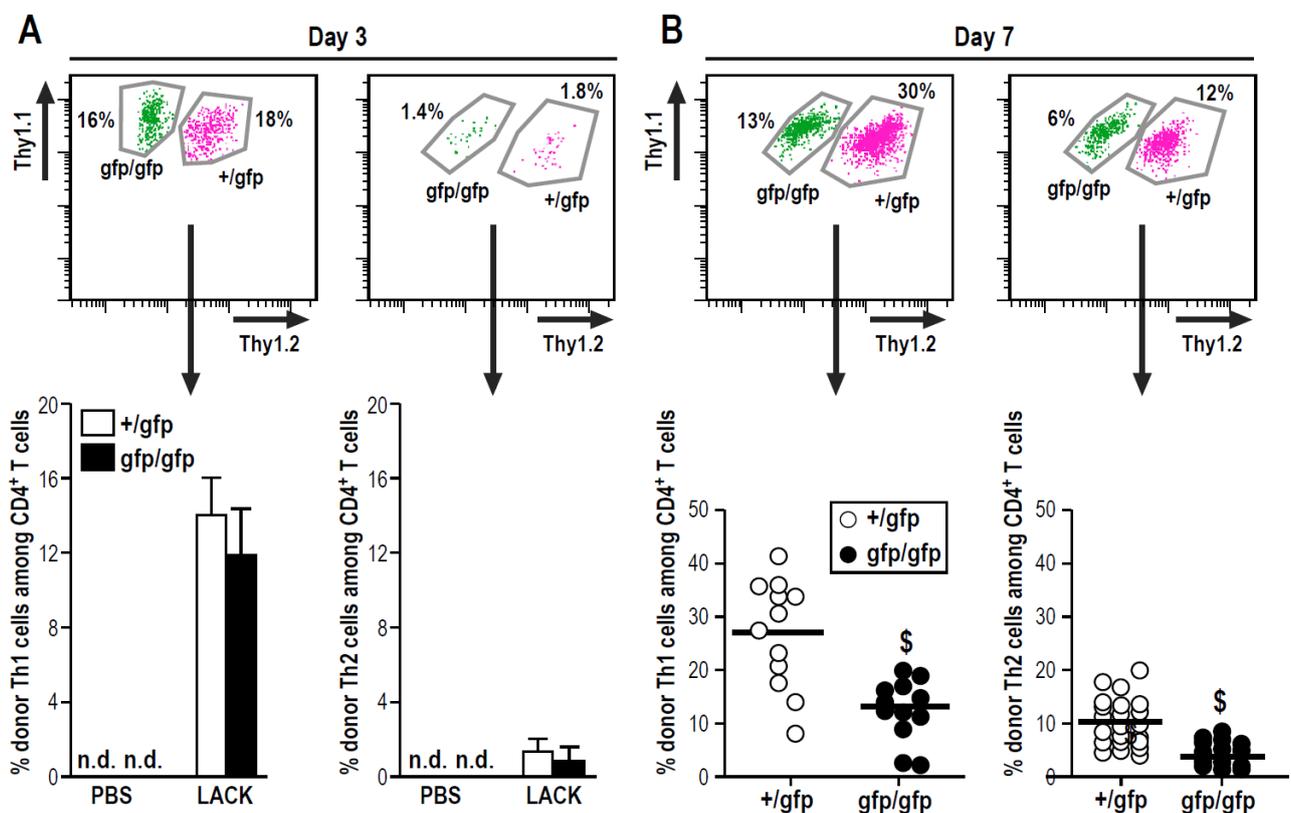
## ETUDE DU RÔLE DE CX3CR1 DANS LE RECRUTEMENT CUTANÉ ET LA PROLIFÉRATION DES LT POLARISÉS

Afin de connaître plus précisément les mécanismes impliquant le rôle de l'expression de CX<sub>3</sub>CR1 par les LT effecteurs dans notre modèle, nous avons évalué le recrutement et les capacités de prolifération de LT Th1 et Th2, spécifiques de LACK (issus de souris transgéniques WT15), proficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>) ou déficients (CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>) co-injectés à des souris de souche sauvage. Le recrutement cutané des cellules est évalué grâce à l'expression de Thy1.1 seul par les cellules déficientes et à l'expression double de Thy1.1 et Thy1.2 par les cellules proficientes. On peut ainsi évaluer le pourcentage de cellules injectées parmi les cellules totales chez les souris receveuses. L'utilisation du BrdU permet d'évaluer la prolifération des cellules injectées. Les analyses sont faites à J3 (recrutement précoce) ou à J8 (recrutement tardif).



A J3, les LT injectés Th1 et Th2, proficients et déficients, sont détectés au niveau cutané à la même fréquence. Cela peut suggérer que la migration cutanée précoce des LT effecteurs ne nécessite pas l'expression de CX<sub>3</sub>CR1. Il faut également noter que **le recrutement de LT Th1 est bien plus important que celui de LT Th2 (Figure 19A). CX<sub>3</sub>CR1 n'est pas requis pour le recrutement lymphocytaire précoce.**

Par contre, à J7, les LT injectés proficients, Th1 et Th2, sont détectés à un niveau plus important que les LT déficients et le recrutement de LT Th1 reste plus marqué que celui de LT Th2 (Figure 19B).

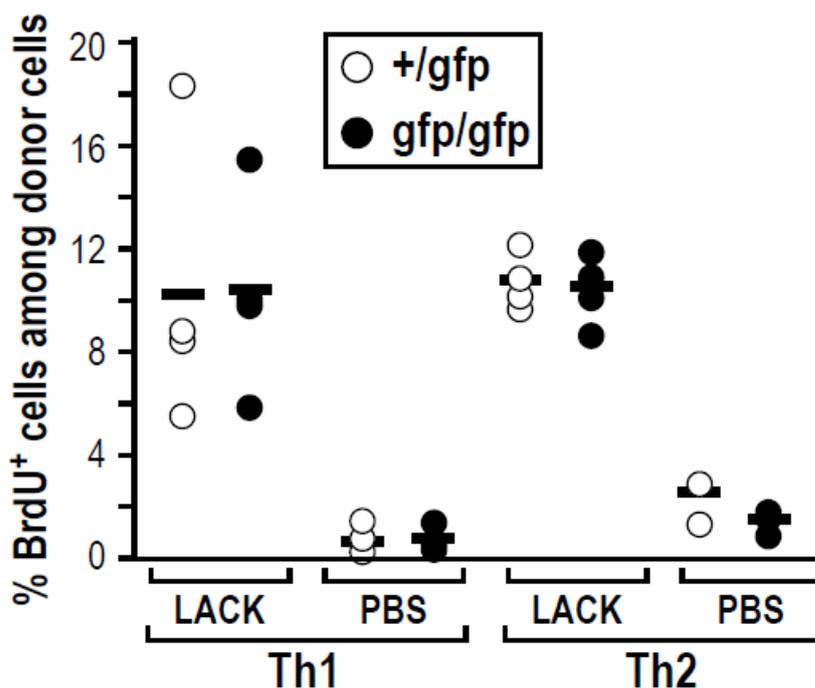


**Figures 19 :** Pourcentage des LT injectés Th1 et Th2, proficients ou déficients parmi les LT CD4<sup>+</sup> cutanés. Evaluation par cytométrie en flux. Les LT issus de souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup> expriment Thy1.1 et Thy1.2 alors que les LT issus de souris CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> n'expriment que Thy1.1, ce qui permet de les différencier chez les souris receveuses dont les LT n'expriment ni Thy1.1, ni Thy1.2.

**A :** Résultats à J3. Moyenne ± écart-type (n=6 souris par groupe).

**B :** Résultats à J7. Barre horizontale représentant la moyenne (n=16 souris par groupe). \$ : statistiquement significatif par rapport aux cellules proficientes.

**La prolifération est similaire dans tous les groupes**, déficients ou proficients, Th1 ou Th2, avec des taux d'incorporation de BrdU strictement identiques dans les groupes sensibilisés. **CX<sub>3</sub>CR1 n'est pas requis pour la prolifération des LT effecteurs polarisés** (Figure 20).



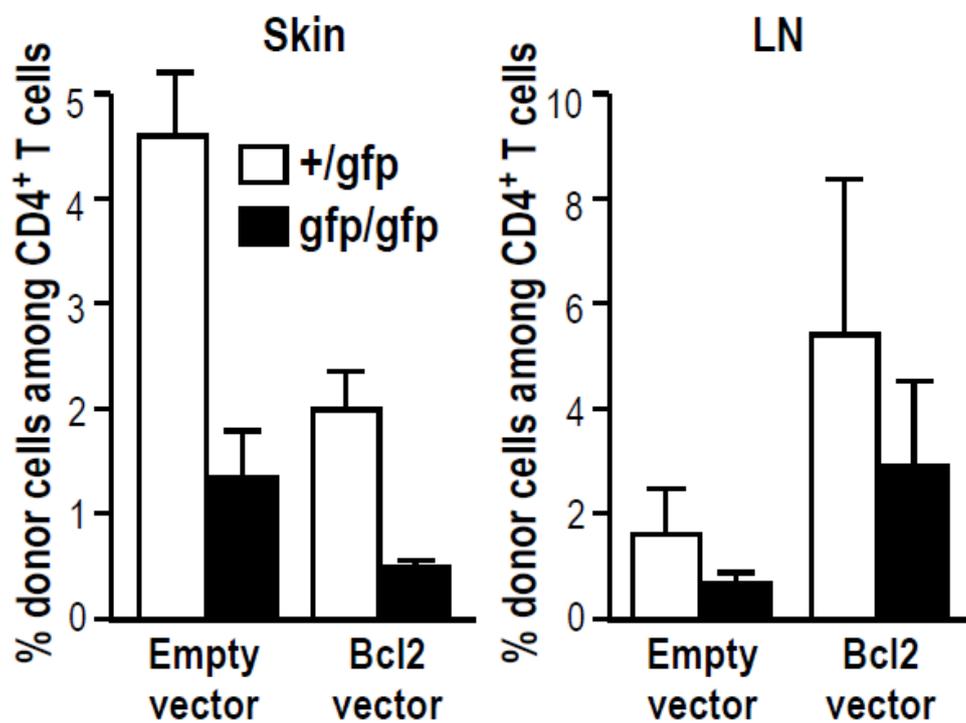
**Figure 20:** Pourcentage de cellules ayant incorporé le BrdU parmi les LT injectés Th1 et Th2, proficients ou déficients. Evaluation par cytométrie en flux après marquage anti-BrdU. Barre horizontale indiquant la moyenne  $\pm$  écart-type (n=4 souris par groupe LACK et 2 souris par groupe PBS).

Nous avons ensuite voulu savoir si cette fréquence plus élevée de LT effecteurs proficients (Th1 et Th2) au niveau cutané à J7 était liée à un recrutement tardif préférentiel, à une rétention plus importante aux sites inflammatoires ou à une survie prolongée. Le rôle de CX<sub>3</sub>CR1 dans la survie cellulaire est déjà démontré pour les LT dans l'allergie pulmonaire, pour la microglie cérébrale et pour les monocytes. L'expérience précédente a donc été répétée avec cette fois une évaluation de la fréquence des cellules apoptotiques et/ou nécrotiques parmi les cellules injectées retrouvées dans la peau et les ganglions inguinaux.



Pour approfondir l'analyse du rôle de CX<sub>3</sub>CR1 sur la survie cellulaire, nous avons induit la surexpression de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique) chez les LT spécifiques de LACK, proficients ou déficients, polarisés Th2 et injectés aux souris de souche sauvage sensibilisées secondairement par LACK (protocole court).

La surexpression de Bcl2 n'affecte pas les différences constatées précédemment entre les LT proficients et déficients (Figure 22).

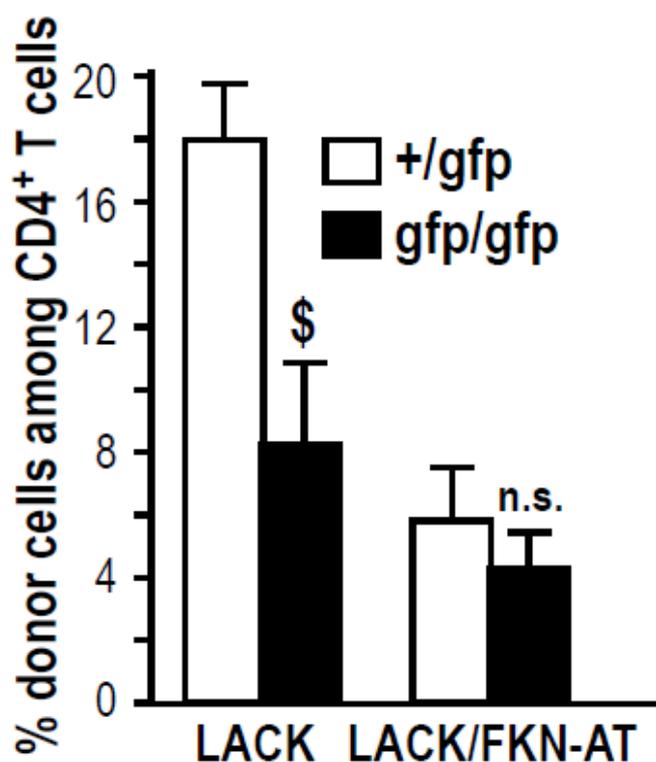


**Figure 22:** Pourcentage de LT Th2 injectés, proficients ou déficients, surexprimant Bcl2 ou non (groupe contrôle avec vecteur seul) parmi les LT CD4<sup>+</sup> à J8. Figure de gauche : peau. Figure de droite : ganglions inguinaux. Moyenne ± écart-type (n= 5 souris par groupe).

**CX<sub>3</sub>CR1 ne paraît donc pas impliqué dans la survie des LT polarisés dans notre modèle de DA.**

Enfin, pour savoir si CX<sub>3</sub>CR1 intervient dans la rétention des LT aux sites inflammatoires, nous avons co-injecté des LT spécifiques de LACK, proficients et déficients, à des souris de souche sauvage sensibilisées par LACK (protocole court) et traitées localement par application cutanée d'un antagoniste de la Fractalkine (FKN-AT).

**Ches les souris traitées, la fréquence des cellules proficientes diminue fortement et rejoint la fréquence obtenue pour les cellules déficientes (Figure 23).**



**Figure 23:** Pourcentage à J8 de LT injectés, proficients ou déficients, parmi les LT CD4<sup>+</sup> cutanés des souris de souche sauvage traitées localement ou non par un antagoniste de la Fractalkine (FKN-AT). Moyenne ± écart-type (n= 5 souris par groupe). \$ : statistiquement significatif par rapport aux cellules proficientes (p inférieur à 0,05).

**Ces données suggèrent que CX<sub>3</sub>CR1 est impliqué dans la rétention des LT effecteurs dans la peau inflammatoire.**

## **ETUDE DE PRELEVEMENTS CUTANES DE MALADES SUIVIS POUR DERMATITE ATOPIQUE CHRONIQUE**

Enfin, nous avons souhaité déterminer si les résultats obtenus sur le modèle murin de DA pouvaient avoir une relevance en pathologie humaine. Dans ce but, l'ARN de biopsies de peau totale de malades atteints de DA de forme chronique a été extrait et comparé à des échantillons cutanés provenant de témoins sains ne souffrant d'aucune pathologie inflammatoire et allergique, que ce soit cutanée ou générale.

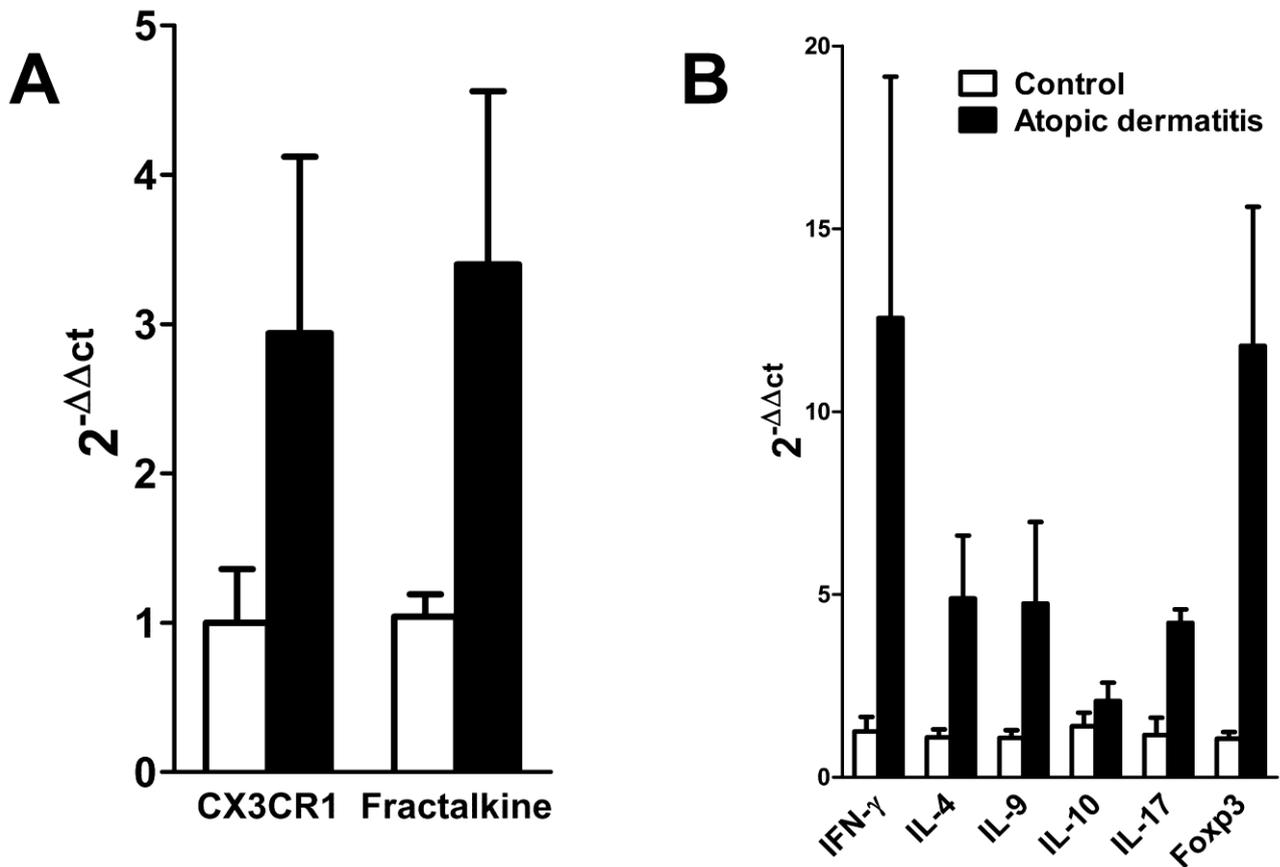
**L'expression de la Fractalkine et de CX<sub>3</sub>CR1 est significativement augmentée chez les patients souffrant de DA par rapport aux sujets sains** (Figure 24A).

Dans notre modèle murin, l'effet du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 paraît être plutôt promoteur d'une réponse Th1. Nous voulions donc également vérifier la polarisation au sein des lésions cutanées analysées.

**L'IFN $\gamma$  est nettement exprimé au sein des lésions de DA chroniques par rapport aux témoins, tout comme l'IL-4 dans une moindre mesure.** De façon intéressante, l'IL-9 semblant proche de la polarisation Th2 *in vitro* est surexprimé à un niveau similaire à l'IL-4 (Figure 24B). S'agissant de lésions chroniques de DA, cette prédominance Th1 n'est pas surprenante.

**L'IL-17 est nettement surexprimée au sein des lésions cutanées des malades tout comme, de façon majeure, le facteur de transcription Foxp3.** Par contre, nous n'avons pas retrouvé de différence significative concernant l'expression de la cytokine immuno-modulatrice, IL-10 (Figure 24B).

**Un profil mixte de polarisation est observé avec une prédominance Th1.**



**Figures 24 :**

Analyse par PCR en temps réel de l'expression cutanée chez des patients atteints de dermatite atopique chronique (n=7) en comparaison à des témoins sains (n=8). L'expression des divers facteurs chez les témoins sains est arbitrairement choisie égale à 1. Le niveau d'expression est calculé par la méthode du  $2^{\Delta\Delta Ct}$  en utilisant comme référence interne la GAPDH.

**A :** Expression cutanée de la Fractalkine et de CX<sub>3</sub>CR1

**B :** Expression cutanée de l'IFN $\gamma$  de l'IL-4, de l'IL-9, de l'IL-17, de l'IL-10 et de Foxp3

Les différences entre les malades et les témoins sont significatives (p inférieur à 0,05) sauf pour l'IL-10.

# Discussion

Notre étude met en évidence un rôle majeur du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 dans le développement de la réponse inflammatoire cutanée et systémique dans un modèle murin de dermatite atopique. Après sensibilisation, les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 présentent une atténuation importante de la réponse inflammatoire à tous les niveaux : cutané, ganglionnaire, sérique et pulmonaire. La réponse cutanée est presque complètement inhibée. Dans le même modèle, ce rôle clef est confirmé par l'inhibition de la réponse inflammatoire cutanée et pulmonaire après administration intra-péritonéale d'un antagoniste de la FKN à des souris de souche sauvage. Cette dernière expérience chez des souris non modifiées génétiquement est particulièrement intéressante car elle suggère que le blocage pharmacologique de l'interaction FKN/CX<sub>3</sub>CR1 a un impact important sur le développement de maladie et qu'il pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique.

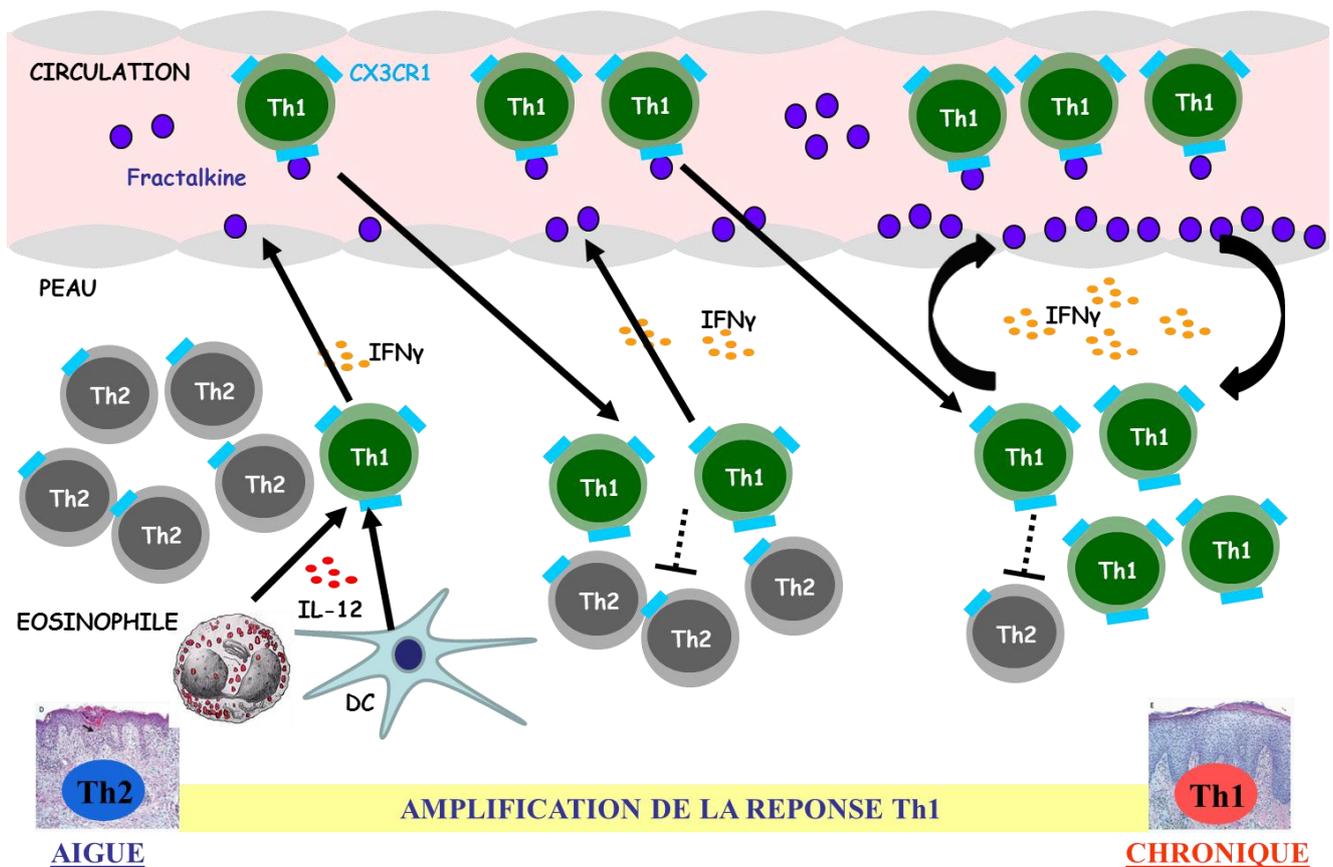
Le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 ne semble pas jouer de rôle dans la présentation d'antigène et dans la prolifération cellulaire en réponse à la sensibilisation épicutanée pour les LT naïfs et pour les LT effecteurs polarisés. La FKN a un rôle anti-apoptotique démontré sur les neurones [28], les cellules épithéliales intestinales [74], mais aussi sur les monocytes macrophages permettant ainsi leur survie au sein des plaques athéromateuses [75]. Ce rôle est également décrit dans l'asthme allergique où CX<sub>3</sub>CR1 facilite la survie des LT Th2 aux sites inflammatoires [68]. Dans notre modèle murin, nous n'avons retrouvé aucun effet sur la survie lymphocytaire. Par contre, les expériences de transfert adoptif mettent en évidence un rôle dans la rétention cutanée des LT effecteurs polarisés. Ce rôle est original car la plupart des chimiokines impliqués dans la DA ont plutôt un rôle d'aide à la migration cellulaire. Un exemple récent, dans le même modèle murin, est la chimiokine CCL8 qui est impliquée dans le recrutement des LT Th2 exprimant CCR8 [76]. De la même manière, des injections intradermiques de CCL27 attirent les LT *in vivo* et à l'inverse le blocage de l'interaction entre CCL27 et son récepteur CCR10 diminue le recrutement lymphocytaire et supprime l'inflammation cutanée dans un modèle murin d'allergie de contact [77].

Chez l'homme et dans notre modèle murin, les LT Th2 sont associés à la phase aiguë de la maladie alors que les LT Th1 sont plutôt associés à la phase chronique. Les mécanismes impliqués dans la transition entre les 2 phases restent mal compris. Dans notre modèle murin, la réponse Th1 est particulièrement altérée chez les souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1. L'équipe de Fraticelli a démontré que, chez l'homme, CX<sub>3</sub>CR1 est préférentiellement exprimé *in vitro* par les LT Th1 comparativement aux LT Th2 exprimant peu l'ARN et pas la protéine [20]. Notre étude met en évidence des résultats similaires chez la souris avec une expression préférentielle de CX<sub>3</sub>CR1 par les LT Th1 ainsi qu'une migration préférentielle en réponse à la FKN des LT Th1. Les différences constatées par rapport aux travaux de Fraticelli concernent la population Th2 pour laquelle nous mettons en évidence une expression, plus faible mais néanmoins significative, de CX<sub>3</sub>CR1 ainsi qu'une migration nette en réponse à la FKN. Ces différences peuvent être liées aux protocoles de différenciation utilisés, aux techniques différentes pour évaluer l'expression voire à une spécificité d'espèce pour les populations Th2 humaines et murines. De plus, nos expériences de transfert adoptif mettent en évidence un rôle de CX<sub>3</sub>CR1 dans l'inflammation cutanée induite à la fois par les LT Th2 et par les LT Th1. L'impact d'une déficience en CX<sub>3</sub>CR1 est plus marqué concernant les LT Th1 avec une absence complète de différence avec le groupe contrôle PBS en terme d'épaississement épidermique alors qu'il s'agit d'une simple atténuation de la réponse pour les LT Th2. L'expression de CX<sub>3</sub>CR1 paraît jouer un rôle majeur dans la participation des LT à la pathologie, particulièrement pour la population Th1.

Dans la dermatite atopique, il est possible que le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 participe à une boucle d'amplification de la réponse Th1. L'expression de la FKN par les kératinocytes et l'endothélium cutané permettrait le recrutement cutané de LT Th1 exprimant fortement CX<sub>3</sub>CR1 ce qui augmenterait localement l'expression de la FKN via l'IFN $\gamma$  sécrété et amplifierait encore leur propre recrutement (cf schéma page suivante). Par ailleurs, le rôle de CX<sub>3</sub>CR1 sur la rétention privilégierait

les LT Th1 par rapport aux LT Th2 en raison de leur plus forte affinité pour la FKN. Ainsi dans notre modèle animal, l'atténuation de la réponse polarisée Th1 chez les animaux déficients pourrait résulter de l'atténuation de ce phénomène d'amplification de la réponse Th1. Ce mécanisme pourrait participer à la transition Th2 vers Th1 dans la dermatite atopique chez l'homme. L'analyse des lésions humaines, polarisées Th1, permet de confirmer l'existence potentielle d'un tel mécanisme. Nos données humaines confirment les études les plus récentes d'Echigo [68] et de Nakayama [12] avec une expression cutanée forte de CX3CR1 et de FKN chez les patients souffrant de formes chroniques sévères.

Le blocage de l'interaction FKN/CX<sub>3</sub>CR1 pourrait être une voie thérapeutique à explorer pour les malades souffrant de formes chroniques particulièrement difficiles à prendre en charge. Un traitement bloquant CX<sub>3</sub>CR1 aurait un double intérêt en empêchant non seulement le recrutement cellulaire mais aussi la rétention préférentielle des LT Th1 responsables de la chronicité des lésions. Toutefois, le développement de tels traitements, notamment en cas d'administration systémique, devra être particulièrement prudent en raison des rôles multiples de la FKN physiologiques et pathologiques.



**Représentation schématique du rôle potentiel du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 dans la physiopathologie de la dermatite atopique**

En phase aiguë, les LT Th2 prédominent. Les cellules dendritiques et les éosinophiles recrutés induisent la différenciation Th1 de quelques LT effecteurs. La sécrétion d'IFN $\gamma$  par ces quelques LT Th1 stimule l'expression de la FKN par les cellules endothéliales (et par les kératinocytes, non montrés) ce qui permet le recrutement préférentiel de LT Th1 sécréteurs d'IFN $\gamma$  augmentant encore l'expression locale de la FKN et leur recrutement. La FKN pourrait ainsi participer à la transition Th2/Th1 dans la DA. L'effet constaté de CX<sub>3</sub>CR1 sur la rétention cutanée des LT polarisés amplifierait également ce phénomène.

# **Bibliographie**

1. Bieber T. 2008. Atopic dermatitis. *N Engl J Med*, 358:1483-1494.
2. Mahe E. 2005. Atopic dermatitis : epidemiology in France, definition, natural history, association with others atopic manifestations, severity score and quality of life. *Ann Dermatol Venereol*, 132: S131-50.
3. Leung DY, Boguniewicz M, Howell MD, Nomura I and Hamid QA. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, 113:651-657.
4. Nicolas JF, Rozières A and Castelain M. 2005. Pathogenesis of atopic dermatitis. *Ann Dermatol Venereol*, 132:S44-52.
5. Hauser C, Wuethrich B, Matter L, Wilhelm JA and Schopfer K. 1985. Immune response to staphylococcus aureus in atopic dermatitis. *Dermatologica* 170:114-20.
6. Bach JF. 2002. The Effect of Infections on Susceptibility of Autoimmune and Allergic Diseases. *N Engl J Med*, 347:911-920.
7. Rodriguez E, Baurecht H, Herberich E, Wagenpfeil S, Brown SJ, Cordell HJ, Irvine AD, and Weidinger S. 2009. Meta-analysis of filaggrin polymorphisms in eczema and asthma: robust risk factors in atopic disease. *J Allergy Clin Immunol*, 123:1361-1370.
8. Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, and Leung DY. 2006. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 118:178-189.
9. Spergel JM. 2008. Immunology and treatment of atopic dermatitis. *Am J Clin Dermatol*, 9:233-244.
10. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, and Schall TJ. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*, 385:640-644.
11. Rossi DL, Hardiman G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins N, Zlotnik A, and Bazan JF. 1998. Cloning and characterization of a new type of mouse chemokine. *Genomics*, 47:163-170.
12. Nakayama T, Watanabe Y, Oiso N, Higuchi T, Shigeta A , Mizuguchi N, Katou F, Hashimoto N, Kawada A and Yoshie O. 2010. Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol*, 185:6472-6479.
13. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ and Yoshie O. 1997. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, 91:521-530.
14. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, and Patel DD. 1998. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med*, 188:1413-1419.
15. Jones BA, Beamer M, Ahmed S. 2010. Fractalkine/CX3CL1 : a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*, 10(5):263-70.

16. Sugaya M, Nakamura K, Mitsui H, Takekoshi T, Saeki H and Tamaki K. 2003. Human keratinocytes express fractalkine/CX3CL1. *J Dermatol Sci*, 31:179-187.
17. Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB and Feng L. 1998. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18):10896-901.
18. Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, Yamada N, Kawamura T, Fitzhugh DJ, Saraf MA, Schall T, Blauvelt A, Rosen SD, Hwang ST. 1999. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol*, 29(8):2551-9.
19. Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. 2002. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN-gamma and TNF-alpha and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol*, 168(2):604-12.
20. Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, Chieppa M, Allavena P, Ruco L, Girolomoni G et al. 2001. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest*, 107:1173-1181.
21. Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V et al. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102:1186-1195.
22. Dichmann S, Herouy Y, Purlis D, Rheinen H, Gebicke-Härter P and Norgauer J. 2001. Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. *Inflamm Res*, 50(11):529-33.
23. Apostolakis S, Amanatidou V, Papadakis EG, and Spandidos DA. 2009. Genetic diversity of CX3CR1 gene and coronary artery disease: New insights through a meta-analysis. *Atherosclerosis*, 207(1):8-15.
24. McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, and Murphy PM. 2003. Chemokine receptor mutant CX3CR1-M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest*, 111:1241-1250
25. Lesnik P, Haskell CA, and Charo IF. 2003. Decreased atherosclerosis in CX3CR1<sup>-/-</sup> mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J Clin Invest*, 111:333-340
26. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC et al. 2002. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 165:1419-1425.
27. Patel A, Jagadesham VP, Porter KE, Scott DJ, and Carding SR. 2008. Characterisation of fractalkine/CX3CL1 and fractalkine receptor (CX3CR1) expression in abdominal aortic aneurysm disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 36:20-27.

28. Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, and Conlon PJ. 2000. The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol*, 165:397-403.
29. Kim TS, Lim HK, Lee JY, Kim DJ, Park S, Lee C, and Lee CU. 2008. Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 436:196-200.
30. Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA et al. 2006. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *Faseb J*, 20:896-905.
31. Soriano SG, Amaravadi LS, Wang YF, Zhou H, Yu GX, Tonra JR, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Dunmore JH, Huszar D and Pan Y. 2002. Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Neuroimmunol*, 125:59-65.
32. Zhuang ZY, Kawasaki Y, Tan PH, Wen YR, Huang J, and Ji RR. 2007. Role of the CX3CR1/p38 MAPK pathway in spinal microglia for the development of neuropathic pain following nerve injury-induced cleavage of fractalkine. *Brain Behav Immun*, 21:642-651.
33. D'Haese JG, Demir IE, Friess H, Ceyhan GO. 2010. Fractalkine/CX3CR1 : why a single chemokine-receptor duo bears a major and unique therapeutic potential. *Expert Opin Ther Targets*, 14(2):207-19.
34. Xin H, Kikuchi T, Andarini S, Ohkouchi S, Suzuki T, Nukiwa T, Huqun, Hagiwara K, Honjo T, and Saijo Y. 2005. Antitumor immune response by CX3CL1 fractalkine gene transfer depends on both NK and T cells. *Eur J Immunol*, 35:1371-1380
35. Tang L, Hu HD, Hu P, Lan YH, Peng ML, Chen M, and Ren H. 2007. Gene therapy with CX3CL1/Fractalkine induces antitumor immunity to regress effectively mouse hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*, 14:1226-1234.
36. Yu YR, Fong AM, Combadiere C, Gao JL, Murphy PM, and Patel DD. 2007. Defective antitumor responses in CX3CR1-deficient mice. *Int J Cancer*, 121:316-322
37. Lavergne E, Combadiere B, Bonduelle O, Iga M, Gao JL, Maho M, Boissonnas A, Murphy PM, Debre P and Combadiere C. 2003. Fractalkine mediates natural killer-dependent antitumor responses in vivo. *Cancer Res*, 63:7468-7474.
38. Ohta M, Tanaka F, Yamaguchi H, Sadanaga N, Inoue H and Mori M. 2005. The high expression of Fractalkine results in a better prognosis for colorectal cancer patients. *Int J Oncol*, 26:41-47.
39. Jamieson WL, Shimizu S, D'Ambrosio JA, Meucci O, and Fatatis A. 2008. CX3CR1 is expressed by prostate epithelial cells and androgens regulate the levels of CX3CL1/fractalkine in the bone marrow: potential role in prostate cancer bone tropism. *Cancer Res*, 68:1715-1722.
40. Shulby SA, Dolloff NG, Stearns ME, Meucci O, and Fatatis A. 2004. CX3CR1-fractalkine expression regulates cellular mechanisms involved in adhesion, migration, and survival of human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 64:4693-4698.

41. Valdivia-Silva JE, Franco-Barraza J, Silva AL, Pont GD, Soldevila G, Meza I, García-Zepeda EA. 2009. Effect of pro-inflammatory cytokine stimulation on human breast cancer: implications of chemokine receptor expression in cancer metastasis. *Cancer Lett*, 283(2):176-85.
42. Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albarello L, Doglioni C, Anselmo A, Doni A, Bianchi P, et al. 2008. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 68:9060-9069.
43. Ueno T, Tanaka K, Jurewicz M, Murayama T, Guleria I, Fiorina P, Paez JC, Augello A, Vergani A, Wong M, et al. 2009. Divergent role of donor dendritic cells in rejection versus tolerance of allografts. *J Am Soc Nephrol*, 20:535-544
44. Peng W, Chen J, Jiang Y, Wu J, Shou Z, He Q, Wang Y, Chen Y and Wang H. 2008. Urinary fractalkine is a marker of acute rejection. *Kidney Int*, 74:1454-1460.
45. Robinson LA, Nataraj C, Thomas DW, Howell DN, Griffiths R, Bautch V, Patel DD, Feng L, and Coffman TM. 2000. A role for fractalkine and its receptor (CX3CR1) in cardiac allograft rejection. *J Immunol*, 165:6067-6072.
46. Kledal TN, Rosenkilde MM and Schwartz TW. 1998. Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28. *FEBS Lett*, 441:209-214.
47. Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM and Anderson LJ. 2001. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol*, 2(8): 732-738.
48. Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P et al. 2000. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science*, 287:2274-2277.
49. Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW and Miller RJ. 1998. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:14500-14505.
50. Ishida Y, Hayashi T, Goto T, Kimura A, Akimoto S, Mukaida N and Kondo T. 2008. Essential involvement of CX3CR1-mediated signals in the bactericidal host defense during septic peritonitis. *J Immunol*, 181:4208-4218
51. Kikuchi T, Andarini S, Xin H, Gomi K, Tokue Y, Saijo Y, Honjo T, Watanabe A and Nukiwa T. 2005. Involvement of fractalkine/CX3CL1 expression by dendritic cells in the enhancement of host immunity against *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*, 73:5350-5357.
52. Gangemi S, Cannavo SP, Guarneri F, Merendino RA, Sturniolo GC, Minciullo PL, Di Pasquale G, Valenzise M, Drago F and Rebora A. 2006. The CX3C-chemokine fractalkine (CX3CL1) is detectable in serum of patients affected by active pityriasis rosea. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 20:1366-1367.
53. Hatabu T, Kawazu S, Aikawa M, and Kano S. 2003. Binding of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to the membrane-bound form of Fractalkine/CX3CL1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15942-15946.

54. Sans M, Danese S, de la Motte C, de Souza HS, Rivera-Reyes BM, West GA, Phillips M, Katz JA and Fiocchi C. 2007. Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 132:139-153.
55. Sabate JM, Ameziane N, Lamoril J, Jouet P, Farmachidi JP, Soule JC, Harnois F, Sobhani I, Jian R, Deybach JC et al. 2008. The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20:748-755.
56. Ruth JH, Volin MV, Haines GK, Woodruff DC, Katschke KJ, Woods JM, Park CC, Morel JC and Koch AE. 2001. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 44:1568-1581.
57. Nanki T, Urasaki Y, Imai T, Nishimura M, Muramoto K, Kubota T and Miyasaka N. 2004. Inhibition of fractalkine ameliorates murine collagen-induced arthritis. *J Immunol*, 173:7010-7016.
58. Odai T, Matsunawa M, Takahashi R, Wakabayashi K, Isozaki T, Yajima N, Miwa Y, Kasama T. 2009. Correlation of CX3CL1 and CX3CR1 levels with response to infliximab therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 36(6):1158-65.
59. Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, Mack M, Goodpaster T and Alpers CE. 2002. Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int*, 62:488-495.
60. Tsubota K, Nishiyama T, Mishima K, Inoue H, Doi T, Hattori Y, Kodama T, Higuchi A, Hayashi Y, and Saito I. 2009. The role of fractalkine as accelerating factor on the autoimmune exocrinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(10):4753-60.
61. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S and Wadenvik H. 2008. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood*, 112:1078-1084.
62. Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M, and Fujita S. 2005. Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum*, 52:1522-1533.
63. Suzuki F, Nanki T, Imai T, Kikuchi H, Hirohata S, Kohsaka H and Miyasaka N. 2005. Inhibition of CX3CL1 (fractalkine) improves experimental autoimmune myositis in SJL/J mice. *J Immunol*, 175:6987-6996.
64. Tremblay K, Lemire M, Provost V, Pastinen T, Renaud Y, Sandford AJ, Laviolette M, Hudson TJ and Laprise C. 2006. Association study between the CX3CR1 gene and asthma. *Genes Immun*, 7:632-639.
65. Rimaniol AC, Till SJ, Garcia G, Capel F, Godot V, Balabanian K, Durand-Gasselien I, Varga EM, Simonneau G, Emilie D, et al. 2003. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*, 112:1139-1146.
66. El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, and Tunon-de-Lara JM. 2006. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to mast cell recruitment in asthma. *J Immunol*, 176:1860-1868.

67. Mionnet C, Buatois V, Kanda A, Milcent V, Fleury S, Lair D, Langelot M, Lacoeyille Y, Hessel E, Coffman R, Magnan A, Dombrowicz D, Glaichenhaus N and Julia V. 2010. CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med*, 16:1305-1312.
68. Echigo T, Hasegawa M, Shimada Y, Takehara K and Sato S. 2004. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 113:940-948.
69. Spergel JM, Mizoguchi E, Brewer JP, Martin TR, Bhan AK and Geha RS. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest*, 101:1614-1622.
70. Staumont-Salle D, Abboud G, Brenuchon C, Kanda A, Roumier T, Lavogiez C, Fleury S, Remy P, Papin JP, Bertrand-Michel J et al. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 121:962-968.
71. Geissmann F, Jung S and Littman DR. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19:71-82.
72. Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*, 25, 402-408.
73. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, Martin B, Wilhelm C and Stockinger B. 2008. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9:1341-1346.
74. Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP and Reinecker HC. 2002. Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 122:166-177.
75. Landsman L, Bar-On L, Zerneck A, Kim KW, Krauthgamer R, Shagdarsuren E, Lira SA, Weissman IL, Weber C and Jung S. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood*, 113:963-972.
76. Islam SA, Chang DS, Colvin RA, Byrne MH, McCully ML, Moser B, Lira SA, Charo IF, and Luster DA. 2011. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nat Immunol*, 12:167-177.
77. Homey B, Alenius H, Muller A, Soto H, Bowman EP, Yuan X, McEvoy L, Lauerma AI et al.. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med*, 8:157-165.

# **Annexe**

## **Article soumis**

**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**

**Delphine Staumont-Sallé<sup>1,2,3,4\*</sup>, Nicolas Hornez<sup>3,4\*</sup>, Céline Lavogiez<sup>3,4</sup>, Akira Kanda<sup>1,2,3</sup>, Anne Lazzari<sup>5,6</sup>, Anissa Fries<sup>5,6</sup>, Cyrille Mionnet<sup>5,6</sup>, Janne Prawitt<sup>1,2,3</sup>, Sébastien Fleury<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Bouchaert<sup>1,2,3</sup>, Emmanuel Delaporte<sup>4</sup>, Nicolas Glaichenhaus<sup>5,6</sup>, Bart Staels<sup>1,2,3</sup>, Valérie Julia<sup>5,6</sup>, and David Dombrowicz<sup>1,2,3</sup>.**

<sup>1</sup> Inserm U1011 ; <sup>2</sup> Institut Pasteur de Lille ; <sup>3</sup> USDL, Université Lille - Nord de France. Lille, France.

<sup>4</sup> Department of Dermatology, Claude Huriez Hospital. Lille, France.

<sup>5</sup> CNRS UMR7275 - <sup>6</sup> Université Nice - Sophia Antipolis, France <sup>7</sup>

\* DSS and NH contributed equally to this work

**Corresponding authors:**

David Dombrowicz, Inserm U1011, Institut Pasteur de Lille. 1, rue Prof. Calmette BP245. 59019 Lille Cedex. France. E-mail : [david.dombrowicz@pasteur-lille.fr](mailto:david.dombrowicz@pasteur-lille.fr).

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

Valérie Julia, CNRS UMR7275, Université Nice-Sophia Antipolis. 660 route des Lucioles. 06560 Valbonne. France. E-mail: [vjulia@ipmc.cnrs.fr](mailto:vjulia@ipmc.cnrs.fr)

Phone: +33 4 93 95 77 82 Fax: +33 4 93 95 77 08.

**Source of funding:** This study was in part funded by grants from the Agence Nationale de la recherche (ANR), from Institut Thématique Multiorganisme (ITMO) Immunology and from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

The authors declare no financial conflict of interest.

**Abbreviations used:**

AD: Atopic dermatitis

AHR: Airway hyperresponsiveness

BAL: Bronchoalveolar lavage

LACK: Leishmania homolog of receptors for activated C kinase

WT: wild-type

## ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic allergic dermatosis characterized by epidermal thickening and dermal inflammatory infiltrates with mixed polarization of the immune response. Th2 profile is dominant during acute phase, while Th1 profile is characteristic of the chronic stage. Among chemokines and chemokine receptors associated to inflammation, increased levels of CX<sub>3</sub>CL1/fractalkine and its unique receptor, CX<sub>3</sub>CR1, have been observed in human AD. We have thus investigated their role and action mechanism in an AD model. Pathology and immune response were profoundly decreased in CX<sub>3</sub>CR1-deficient mice as well as upon blocking CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 interactions in wild type mice. CX<sub>3</sub>CR1 deficiency neither affected antigen presentation nor T cell proliferation *in vivo* upon skin sensitization, but CX<sub>3</sub>CR1 expression by both Th2 and Th1 cells was absolutely required to induce AD. Surprisingly, unlike in allergic asthma, where CX<sub>3</sub>CL1 and CX<sub>3</sub>CR1 regulate the pathology by controlling Th2 lymphocyte survival within inflamed tissues, adoptive transfer studies established that CX<sub>3</sub>CR1 was a key regulator of CD4<sup>+</sup> T cell retention in inflamed skin, a new function for chemokine receptors. Therefore, while CX<sub>3</sub>CR1 and CX<sub>3</sub>CL1 act through distinct mechanisms in different pathologies, our results further evidence their interest as promising therapeutic targets in allergic diseases.

## INTRODUCTION

Atopic dermatitis (AD) is a common, chronic inflammatory dermatosis frequently occurring in individuals with a personal or family history of atopic diseases. AD pathophysiology is complex and results from skin barrier dysfunction and dysregulated immune response, influenced by genetic and environmental factors (1, 2). Indeed, most patients with AD have increased serum IgE levels, with specific IgE directed against allergens or microbial proteins such as *Staphylococcus aureus* (3). Lesions in AD are characterized by increased epidermal thickness and a dermal inflammatory cell infiltrate, consisting of mast cells, eosinophils and T lymphocytes. In acute AD lesions, a preferential recruitment of Th2 cells occurs, whereas in the chronic lesions a Th1 profile is predominant (4), while allergic asthma or allergic rhinitis are more exclusively Th2-dominated diseases.

Chemokines and their receptors play a key role in leukocyte recruitment to inflamed skin (5). Eotaxins 1, 2 and 3 (CCL11, 24, 26) bind to CCR3 and attract eosinophils, and CCL26 appears to be particularly involved in AD (6, 7). CCL27 together with CCR10 and CCR4 expression insure T cell skin domiciliation (8, 9). More recently, CCR8 and CCL8 have been elegantly demonstrated to direct Th2 cell recruitment into allergen-inflamed skin and draining lymph nodes in a murine model of AD (10).

Besides chemoattraction, chemokine - chemokine receptor interactions also regulate other functions. Indeed, we have recently demonstrated that CX<sub>3</sub>CR1, the receptor for CX<sub>3</sub>CL1 (fractalkine -FKN-), identified as a receptor for CCL26 (11), controls the development of allergic asthma by providing a survival signal to the CD4<sup>+</sup> effector T lymphocytes in the inflammatory airways (12). In AD patients, CX<sub>3</sub>CL1 is upregulated in both endothelial cells and skin lesions and serum CX<sub>3</sub>CL1 levels are positively associated with disease severity (13). Another study reported that, while CX<sub>3</sub>CR1 mRNA expression is consistently upregulated in AD skin, CX<sub>3</sub>CL1 mRNA levels are only increased in some patients with a significant correlation to the disease severity (11), a result likely to explain the earlier failure to detect CX<sub>3</sub>CL1 in skin lesions (14). Furthermore, two CX<sub>3</sub>CR1 single nucleotide

polymorphisms have been associated with asthma and atopy in French-Canadian populations (15) and German children (16).

Thus, in order to functionally delineate the role of CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 in AD, we used a mouse model of epicutaneous sensitization, by a protein antigen in the absence of adjuvant, faithfully mimicking features of human AD. Unexpectedly, we found that CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 controlled atopic dermatitis to an extent greater than allergic asthma through a new and distinct mechanism.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup>, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup>, and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> WT15 TCR transgenic mice were generated in a Balb/c ByJ background as previously described (12). Eight- to 12-week-old female mice were used for all experiments. Animals were housed within the specific pathogen-free facility from the Institut Pasteur de Lille or from the Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire in Sophia-Antipolis. Experiments were performed after approval by the Ethics Committee for Animal Experimentation from Lille and Nice.

### **Experimental atopic dermatitis**

As previously described, AD was induced by epicutaneous sensitization (26) with LACK antigen. Briefly Patches soaked with 25 µL of 0.2% LACK solution in PBS or with vehicle were applied on abdominal skin 24 hours after shaving and were left on for three 1-week periods (with patch renewal at midweek), with a 2-week interval between applications. At the time of the last patch removal (day 49), animals were challenged for 20 minutes by means of aerosol nebulization with LACK (0.2% in PBS) by using an ultrasonic nebulizer (System, Villeneuve sur Lot, France), and serum was collected. On the next day, airway hyperresponsiveness (AHR) to increasing concentrations of methacholine was measured by means of invasive plethysmography using a FlexiVent and expressed by dynamic lung resistance (SCIREQ) (27). Animals were sacrificed by cervical dislocation. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected and analyzed on cytospin preparations after RAL 555 staining. Skin and inguinal lymph nodes were collected for histologic analyses and real-time PCR after RNA extraction. LACK was produced and detoxified using Endotrap columns (Profos). Endotoxin levels assessed by LAL assay (Pierce) were below 5 ng/mg of protein.

### **Treatment with a CX3CL1 antagonist FKN-AT in a model of AD**

FKN-AT blocking reagent was prepared as described (12) and administered by 3 weekly intraperitoneal injections (50 µg/mouse) either during the 3 sensitization periods (prophylactic protocol) or only during the last week of sensitization (therapeutic protocol) and animals were analyzed as described above.

### **Histology and immunohistochemistry**

Tissue biopsy specimens were processed as previously described (26). Briefly, samples were fixed in ImmunoHistoFix (Interstiles, Brussels, Belgium) and embedded in ImmunoHistoWax (Interstiles) at 37°C. Five µm sections were stained with May Grünwald Giemsa for measurement of epidermal thickness and eosinophil and mast cells counts (26) by using a microscope with Arcturus XT software. Epidermal thickness was determined at 250-fold magnification; an average of 10 measures was calculated for each sample. Eosinophils and mast cells were enumerated by examining 20 random fields at 400-fold magnification; cell frequency was converted to cells per square millimeter and results were expressed as mean ± SD. For immunohistochemical analysis, sections embedded in ImmunoHistoWax were immunostained with anti-I-A<sup>d</sup>/I-E<sup>d</sup> (MHC II) mAb (clone M5/114, rat IgG2b, BD Biosciences) and cryopreserved sections were stained with anti-CD4 mAb (clone RM4-5, rat IgG2a, BD Biosciences) as previously described (28). For each section, 10 random fields were examined at x400.

### **Immunoglobulin concentrations**

Immunoglobulin (IgE, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2a</sub>) concentrations in serum were measured as previously described by ELISA (26). Two-fold serial dilutions were prepared for each serum (starting dilution 1:25 for IgE, 1:5000 for IgG<sub>1</sub>, 1:1000 for IgG<sub>2a</sub>). Antibody titers were calculated as the dilution corresponding to twice the mean absorbance value obtained for non-sensitized mouse sera.

## Quantitative RT-PCR

mRNA steady-state levels were analyzed by quantitative RT-PCR as previously described. Oligonucleotide primers specific for mouse cytokines, chemokines, and their receptors and nuclear transcription factors are listed in Table S1. Primers were used for amplification in triplicate assays. PCR amplification of GAPDH was performed to control for sample loading and to allow normalization between samples. Relative gene expression was calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (29). Results were expressed as the mean fold induction compared with the mean expression level in PBS-treated WT mice.

## Cell purification and *in vivo* assays

For antigen-presenting capacity assay, splenic CD4<sup>+</sup> T cells were purified from CX3CR1<sup>+/+</sup> WT15 Thy1.1<sup>+/+</sup> Rag-2<sup>-/-</sup> TCR transgenic mice, encoding a LACK specific TCR, by positive selection using anti-CD4 beads (MACS, Miltenyi) (purity >95%), stained with CFSE (Sigma) and further injected (2 X 10<sup>6</sup> cells) via the lateral tail vein into CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> recipient mice, 1 day before epicutaneous LACK sensitization. Proliferation of donor cells in the inguinal LN was assessed by flow cytometry 5 days later.

For analysis of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> T cell proliferation, splenic CD4<sup>+</sup> T cells were purified from CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/+</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> WT15 donor mice, stained with CFSE, and co-injected (2 X 10<sup>6</sup> of each population) into Thy1.1<sup>-/-</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> wild-type mice, one day before epicutaneous LACK sensitization. Proliferation was assessed in the inguinal LN 4 days later by flow cytometry.

For preparing Th1 and Th2 cells, CD4<sup>+</sup> T cells from TCR transgenic mice were purified by negative selection and 1.5 X 10<sup>6</sup> cells were incubated for 3 days with 0.75 X 10<sup>6</sup> T cell-depleted splenocytes in complete RPMI with 50 nM LACK<sub>156-173</sub> peptide and (i) 10 ng/ml r-IL-4 and 10 µg/ml antibody to IFN $\gamma$  (R4-6A2) for Th2 cells or (ii) 10 ng/ml r-IL-12 and 10 µg/ml antibody to IL-4 (11B11) for

Th1 cells. In some experiments, Thy1.1<sup>-/-</sup> Thy1.2<sup>+/+</sup> WT mice received by intravenous injection either CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> or CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> LACK-specific Th1 or Th2 cells (2 X 10<sup>6</sup> cells per mouse), and then underwent one single round of LACK epicutaneous sensitization. Animals were sacrificed at day 7 and skin samples were collected for histological analysis of AD characteristics as previously described. In other experiments, the same number of both CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> LACK-specific Th1 or CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> LACK-specific Th2 cells were co-injected in Thy1.1<sup>-/-</sup> Thy1.2<sup>+/+</sup> WT mice (1.5 X 10<sup>6</sup> of each genotype per mouse), one day before LACK epicutaneous sensitization. When indicated, recipient mice treated as described above, were injected i.p. with BrdU (BD Biosciences) (200 µg) for the last 18 hrs. BrdU incorporation of CX<sub>3</sub>CR1-proficient and -deficient Th1 and Th2 donor cells was studied by flow cytometry in inguinal LN. Survival of Th1 and Th2 donor cells was analyzed by Annexin-V and 7-aminoactinomycin D (7-AAD) staining in both skin and inguinal LN.

### **Retroviral transduction**

The human Bcl2 cDNA was cloned into the mouse bi-cistronic retroviral expression vector MIGR. Th2 differentiated cells were incubated with viral supernatant containing 5 µg/ml Polybrene (Sigma) and spun at 32°C for 8 h as described (12). Viral supernatant was replaced with fresh medium. GFP-expressing T cells were sorted 3 d later.

### **Statistical analysis**

Statistical significance was determined by Student T test, except for plethysmographic data, for which ANOVA for repeated measures was used. Graphpad and STATview softwares were respectively used. Results were expressed as means ± SEMs. A *P* value <0.05 was considered significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Upon skin sensitization, CX<sub>3</sub>CR1-deficient mice develop neither AD nor subsequent lung inflammation

To assess the contribution of CX<sub>3</sub>CR1 to AD development, we used a previously described model of AD based on repeated epicutaneous sensitizations (17) and *Leishmania major* activated cKinase (LACK) as antigen and compared the response of CX<sub>3</sub>CR1-deficient (<sup>gfp/gfp</sup>) mice, in which CX<sub>3</sub>CR1 gene has been replaced by the *gfp* (18), to that from their proficient (<sup>+/+</sup>) WT counterparts. Neither strain exhibited an inflammatory phenotype in the absence of LACK sensitization (**Fig. 1A**). Compared to vehicle (i.e. PBS)-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice, LACK-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice exhibited a significant skin inflammatory response, characterized by a 50% increase in epidermal thickening (**Fig. 1B**) associated with more pronounced hyperkeratosis, spongiosis and dermal cellular infiltrates including mast cells, eosinophils, MHC-II<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells (**Fig. 1C**) as well as increased skin and inguinal lymph node expression of inflammatory, and Th1- and Th2-associated cytokines, chemokine and chemokine receptors (**Fig. S1A**). In sharp contrast, CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice did not develop skin inflammatory response upon LACK sensitization (**Fig. 1A-B**). Compared with PBS-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice, only MHC-II<sup>+</sup> cell number was increased, but to a lesser extent than in LACK-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> animals (**Fig. 1C**). Furthermore, expression of Th1-associated and inflammatory response genes was also significantly decreased, while, among Th2-associated response genes, only skin STAT-6 and lymph node GATA-3 expression were affected (**Fig. S1A-B**). Humoral response was also altered in CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice, compared to CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice, with decreased total and antigen-specific Th2-associated IgE concentrations (but not IgG<sub>1</sub> titers), as well as decreased Th1-associated antigen-specific IgG<sub>2a</sub> titers (**Fig. 1D**).

As in the human pathology, epicutaneous sensitization also induced lung inflammation and airway hyperreactivity (AHR) following a single antigenic airway challenge. Airway resistance was significantly lower in LACK-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice, compared to CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> animals (**Fig.**

**1E).** Furthermore, cellular inflammatory infiltrate in the broncho-alveolar fluid (BALF) of LACK-sensitized CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice was decreased by 32% for macrophages, 70% for lymphocytes and eosinophils, and 40% for neutrophils compared to BALF from CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice (**Fig. 1F**). Therefore, in this AD model, CX<sub>3</sub>CR1 deficiency almost fully prevents skin inflammatory response, severely reduced lung inflammation and humoral response, with, paradoxically for an allergic disease, and unlike asthma, the most pronounced inhibitory effects observed on Th1-associated response, rather than on Th2-associated molecules.

### **A CX<sub>3</sub>CL1 antagonist strongly reduces features of AD**

To further confirm the key role of CX<sub>3</sub>CR1 in AD development, we next investigated whether inhibition of CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 interactions would inhibit the pathology in WT animals. We investigated the efficacy of a FKN antagonist (FKN-AT), whose potency was already validated in an allergic asthma model (12), using prophylactic or therapeutic administration protocols (**Fig. 2A**). Both administration schedules fully inhibited antigen-induced epidermal thickening (**Fig. 2B**), as well as mastocytosis, eosinophilia and dermal CD4<sup>+</sup> T cell infiltration (**Fig. 2C**). Upon LACK aerosol challenge, AHR and inflammatory cell infiltrate in the airways were also significantly decreased upon both prophylactic and therapeutic treatments (**Fig. 2C-D**). Taken together, these results confirm the key role of CX<sub>3</sub>CR1/CX<sub>3</sub>CL1 in AD in non-genetically manipulated mice and further demonstrate that pharmacological inhibition of CX<sub>3</sub>CL1/CX<sub>3</sub>CR1 interactions is sufficient to abrogate skin and lung features of AD.

### **CX<sub>3</sub>CR1-deficiency neither affects antigen presentation nor naïve T cell proliferation *in vivo*.**

As CX<sub>3</sub>CR1 is expressed by various myeloid cell types, such as blood monocytes, dendritic cell (DC) progenitors, plasmacytoid DC, and macrophages (19-21), we next assessed whether antigen presentation was affected in the absence of CX<sub>3</sub>CR1. To this aim, CD4<sup>+</sup> T cells expressing a LACK-

specific TCR for WT15 peptide (22), were labeled with CFSE and injected to both CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice that were further sensitized via epicutaneous LACK administration. Frequencies of divided antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the draining LN were comparable in both CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice (**Fig. S2A**), suggesting that, upon epicutaneous sensitization, CX<sub>3</sub>CR1 deficiency does not affect antigen presentation. We next investigated whether CX<sub>3</sub>CR1 deficiency affected T cell proliferation induced upon epicutaneous antigen sensitization. To address this issue, we generated Thy1<sup>+/-</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and Thy1<sup>+/+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK-specific TCR transgenic mice that respectively expressed the Thy1.1 and Thy1.2 antigens or the Thy1.1 antigen only. CD4<sup>+</sup> T cells from both genotypes were prepared, stained with CFSE, and co-injected into WT Thy1.1<sup>-/-</sup> Thy1.2<sup>+/+</sup> mice. Upon epicutaneous sensitization with LACK, frequencies of dividing CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> WT15 cells were comparable (**Fig. S2B**). Altogether these results suggest that CX<sub>3</sub>CR1 deficiency does not alter naïve T cell proliferation.

### **CX<sub>3</sub>CR1 expression regulates both Th1- and Th2- induced skin inflammation**

As both Th2 and Th1 cells are associated to the acute and chronic phases of AD respectively (23), we investigated whether CX<sub>3</sub>CR1 expression was required by Th1, Th2 cells or both to induce skin inflammation. LACK-specific CD4<sup>+</sup> T cells were prepared from either Thy1<sup>+/-</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> or Thy1<sup>+/+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> WT15 mice, differentiated *in vitro* into Th1 or Th2 cells and injected into WT mice that were further sensitized to LACK. While both CX<sub>3</sub>CR1-proficient Th1 and Th2 cells were alone able to induce a 4 to 5-fold epidermal thickening upon a single round of epicutaneous antigen exposure, CX<sub>3</sub>CR1-deficient Th2 only induced a less than 2- fold increase in epidermal thickness and injection of CX<sub>3</sub>CR1-deficient Th1 cells barely led to epidermal thickening compared to PBS-treated animals (**Fig. 3A**). Likewise, dermal mastocytosis was also induced by both CX<sub>3</sub>CR1-proficient Th1 and Th2 cells, but not upon injection of CX<sub>3</sub>CR1-deficient effector T cells (**Fig. 3B**). Eosinophilia was only induced upon transfer of CX<sub>3</sub>CR1-proficient Th2 cells and strongly reduced

when CX<sub>3</sub>CR1-deficient Th2 cells were injected (**Fig. 3B**). Taken together, these results suggest that CX<sub>3</sub>CR1 expression by Th2- and Th1-cells regulates the key features of AD. These findings also further underline the major role exerted by CX<sub>3</sub>CR1 on Th1 cells, prominently associated to the chronic phase of the disease, which contrasts with its key effect on Th2 cells in asthma (12).

### **CX<sub>3</sub>CR1-deficiency impairs effector T cell retention into inflamed skin**

To decipher the mechanisms accounting for the role of CX<sub>3</sub>CR1 expression by T helper cells in skin inflammation, we have monitored the recruitment and proliferative capacities of both CX<sub>3</sub>CR1-proficient and CX<sub>3</sub>CR1-deficient LACK-specific Th1 and Th2 cells upon co-injection into WT mice that were exposed to LACK and further fed with BrdU. Three days following antigen exposure, while Th1 and Th2 donor cells of both genotypes had not yet incorporated BrdU (data not shown), CX<sub>3</sub>CR1-proficient and CX<sub>3</sub>CR1-deficient LACK-specific donor cells were detected at the same frequency in skin, suggesting that early migration of effector T cells into the skin did not require CX<sub>3</sub>CR1 (**Fig. 4A**). It is worth noting that antigen-induced recruitment of LACK-specific Th1 cells was more pronounced than recruitment of Th2 cells as early as 3 days after antigen exposure. In sharp contrast, frequencies of CX<sub>3</sub>CR1-proficient donor cells outnumbered CX<sub>3</sub>CR1-deficient ones 4 days later (**Fig. 4B**). However, donor cells of both genotypes proliferated at the same rate (**Fig. 4C**). Therefore, as observed for naïve T cells, CX<sub>3</sub>CR1 deficiency neither affects the early recruitment, nor the proliferation of Th1- and Th2- effector cells.

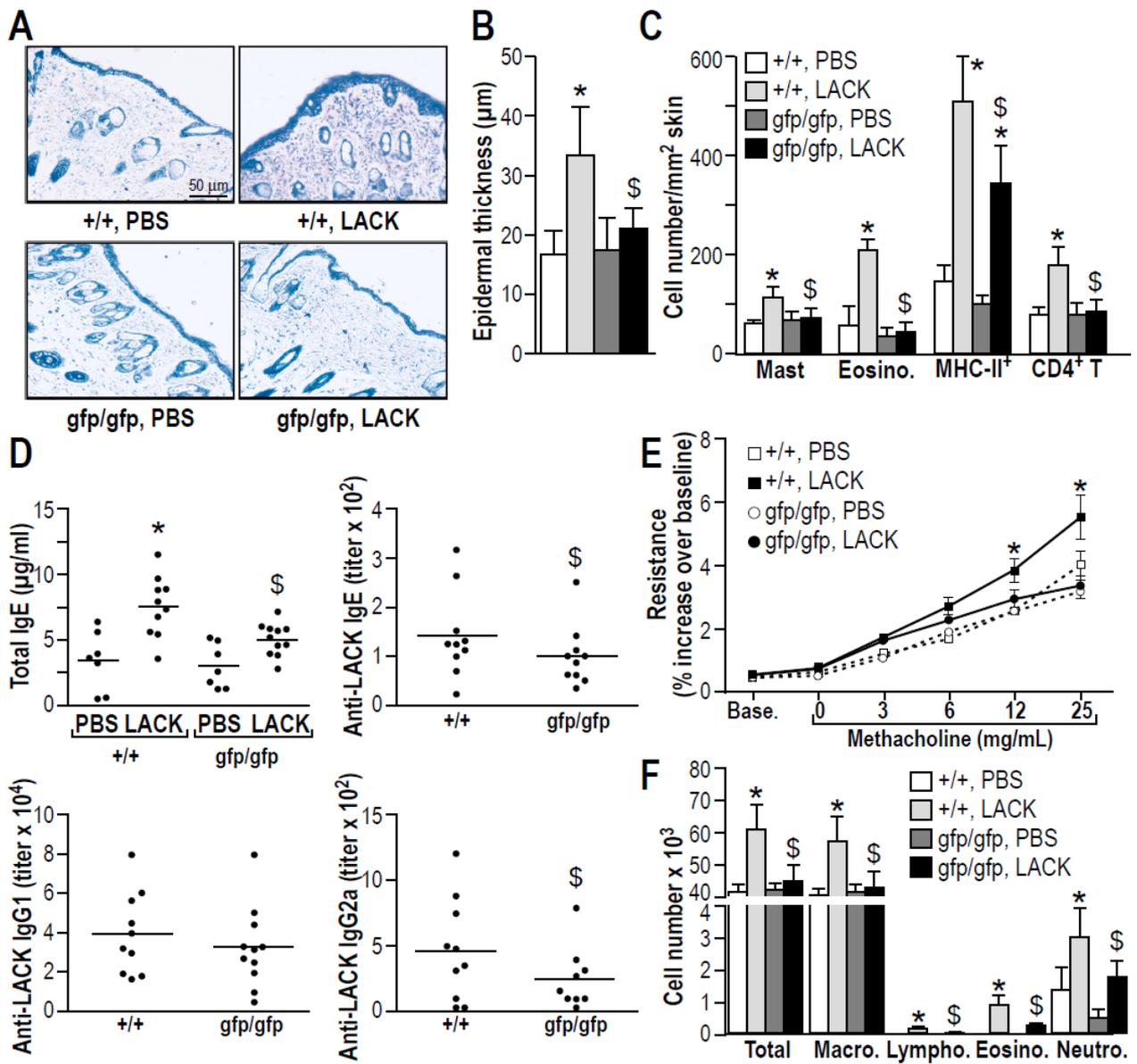
The higher frequency of CX<sub>3</sub>CR1-proficient CD4<sup>+</sup> effector cells in the skin could be explained by several hypotheses. First, it could reflect the preferential late recruitment of CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> effector T cells into the skin, their prolonged survival, or their selective advantage for residence in the inflamed skin. As CX<sub>3</sub>CR1 is involved in effector T cell survival in allergic lung inflammation (12), and as the role of CX<sub>3</sub>CR1/CX<sub>3</sub>CL1 in microglial cell (24) and monocyte survival (25) has also been reported, we next assessed whether this was also the case in inflamed skin. WT mice were co-injected with

CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK-specific Th1- or Th2- donor cells, sensitized by epicutaneous LACK administration and the frequencies of apoptotic and/or necrotic donor cells were measured. Similar frequencies of annexin-V<sup>+</sup> and/or 7-AAD<sup>+</sup> CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> donor cells were found in both skin and draining LN (**Fig. S3A-B**). To further rule out a differential survival, CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> LACK-specific Th2 cells were transduced with a retroviral construct leading to the expression of anti-apoptotic Bcl-2 (an empty vector was used as control) and transferred into WT recipients that were sensitized by LACK. Overexpression of Bcl-2 did not affect the differences in frequencies between CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Th2 cells detected in skin or lymph nodes, further demonstrating that CX<sub>3</sub>CR1 is not involved in T cell survival (**Fig. 4D**). These two data sets contrast with our previous report on the role of CX<sub>3</sub>CR1 in T cell survival in allergic asthma (12). To investigate whether CX<sub>3</sub>CR1 was required for T cell retention into the inflamed skin, mice were co-injected with CX<sub>3</sub>CR1-proficient and -deficient LACK-specific effector T cells, challenged with LACK, and further treated with FKN-AT topically. Upon FKN-AT treatment, frequencies of CX<sub>3</sub>CR1-proficient T cells decreased and reached those of co-injected CX<sub>3</sub>CR1-deficient ones (**Fig. 4E**), strongly suggesting that blocking interactions between CX<sub>3</sub>CR1 and CX<sub>3</sub>CL1 impaired effector T cell retention in inflamed skin.

In conclusion, we demonstrated that CX<sub>3</sub>CL1 and expression by T cells of its unique receptor, CX<sub>3</sub>CR1, play a crucial role in the development of skin and systemic inflammatory response in a murine model of AD by retaining effector T cells in the inflamed skin. Such a role for CX<sub>3</sub>CL1 is original, since the chemokines known so far to be involved in AD contribute to the disease by inducing migration of inflammatory cells towards the skin and not by facilitating their retention in the inflammatory sites. Indeed, Islam *et al* demonstrated that CCL8 is involved in skin homing of CCR8-expressing Th2 cells in the same animal model of AD (10). Likewise, Homey *et al* showed that intradermal CCL27 injection attracted lymphocytes *in vivo* and, conversely, neutralization of CCL27 and its receptor CCR10 interactions impaired lymphocyte recruitment to the skin leading to

the suppression of DNFB (dinitrofluorobenzene)-induced skin inflammation in a murine model of contact hypersensitivity (9). In addition to the identification of a new mode of action for a chemokine, the full inhibition of AD by a fractalkine antagonist further demonstrate that CX<sub>3</sub>CR1/CX<sub>3</sub>CL1 axis represents a new promising therapeutic target in allergic inflammatory diseases like allergic asthma and atopic dermatitis.

**FIGURES**



**Figure 1**

**Figure 1. Absence of atopic dermatitis and attenuation of associated humoral and lung inflammatory response in CX<sub>3</sub>CR1-deficient mice.** AD was induced on abdominal skin in CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice by epicutaneous LACK sensitization for three 1-week periods, with a 2-week interval between applications. At day 49, sera were collected and animals were challenged by LACK nebulization. At day 50, AHR to increasing concentrations of methacholine was measured by invasive plethysmography. Then, mice were sacrificed and BAL fluid was collected and analyzed on cytospin preparations. Skin samples were collected at the site of sensitization. **A.** May Grünwald Giemsa staining of skin sections (original magnification X100). **B.** Epidermal thickness. **C.** Eosinophil, mast cell, MHC II<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell numbers in dermis. **D.** Immunoglobulin concentrations in serum. Total IgE (upper left panel), LACK-specific IgE (upper right panel), LACK-specific IgG<sub>1</sub> (bottom left panel) and LACK-specific IgG<sub>2a</sub> (bottom right panel) concentrations. **E.** Airway hyperreactivity to increasing methacholine concentrations. Resistance was evaluated by invasive plethysmography. **F.** Lung inflammatory response: total number of cells, macrophages, neutrophils, lymphocytes and eosinophils in BAL fluid. Data are expressed as mean ± SEM (*n*=6-10 animals per group). \* Statistically different from PBS-treated mice (*P* < 0.05) \$ Statistically different from CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice (*P* < 0.05).

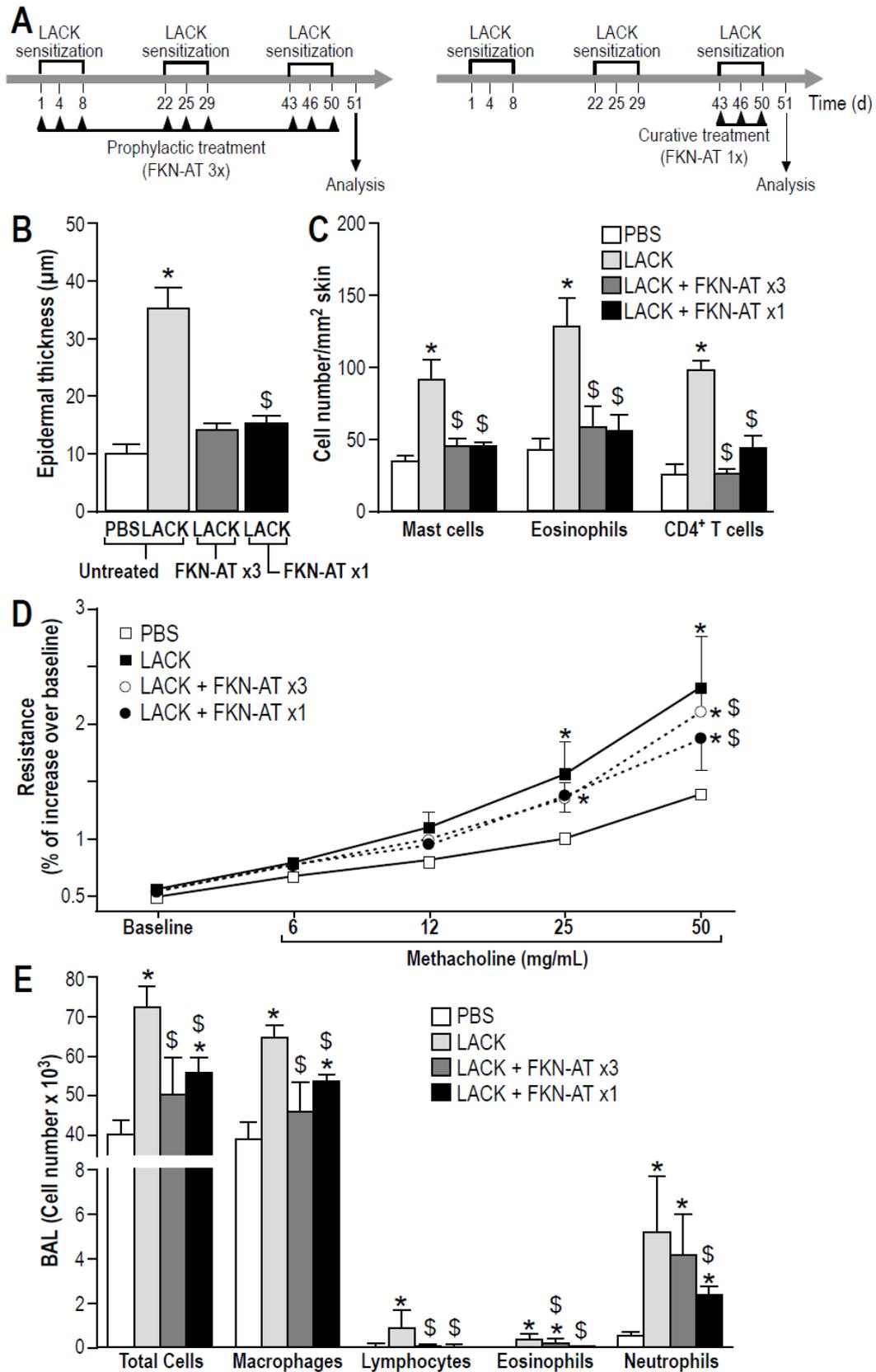
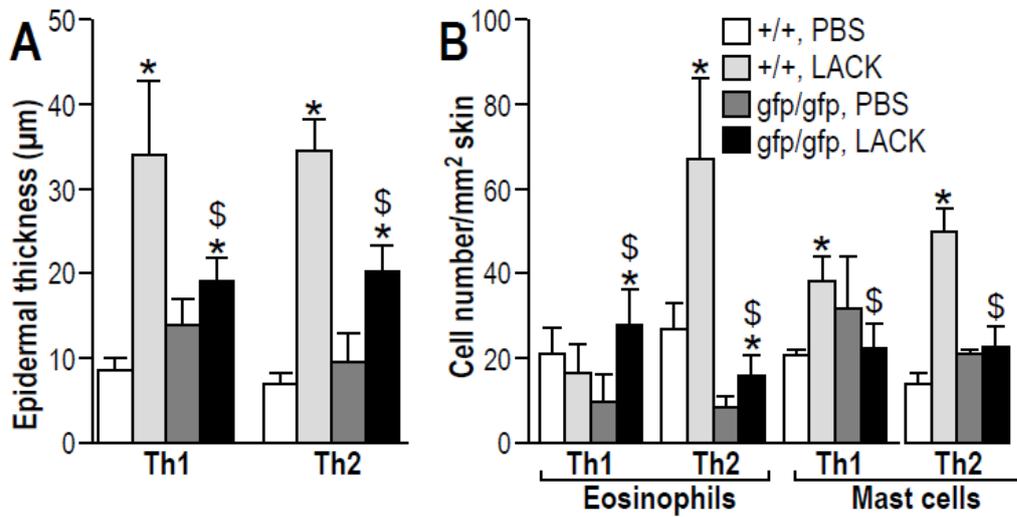


Figure 2

**Figure 2. Abrogation of AD features in wild-type mice treated with FKN-AT.** **A.** Timeline of FKN-AT administration during AD induction. **B.** Epidermal thickness. **C.** Eosinophil, mast cell, MHC II<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell numbers in dermis. **D.** Airway hyperreactivity to increasing methacholine concentrations. Resistance was evaluated by invasive plethysmography. **E.** Lung inflammatory response: total number of cells, macrophages, neutrophils, lymphocytes and eosinophils in BAL fluid. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM ( $n=6-10$  animals per group). \* Statistically different from PBS-treated mice ( $P < 0.05$ ), \$ Statistically different from vehicle-treated mice ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3**

**Figure 3. CX<sub>3</sub>CR1 expression regulates both Th1- and Th2- induced skin inflammation.**

Wild-type mice were injected at day -1 with LACK-specific CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> or CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Th1 or Th2 cells, further sensitized for one single week with LACK or PBS at day 0, and further analyzed at day 7. **A.** Epidermal thickness. **B.** Eosinophil and mast cell numbers in dermis at the site of sensitization. Data are expressed as mean ± SEM (*n*=6-10 animals per group). \* Statistically different from PBS-treated mice (*P* < 0.05), \$ Statistically different from CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> donor cells (*P* < 0.05).

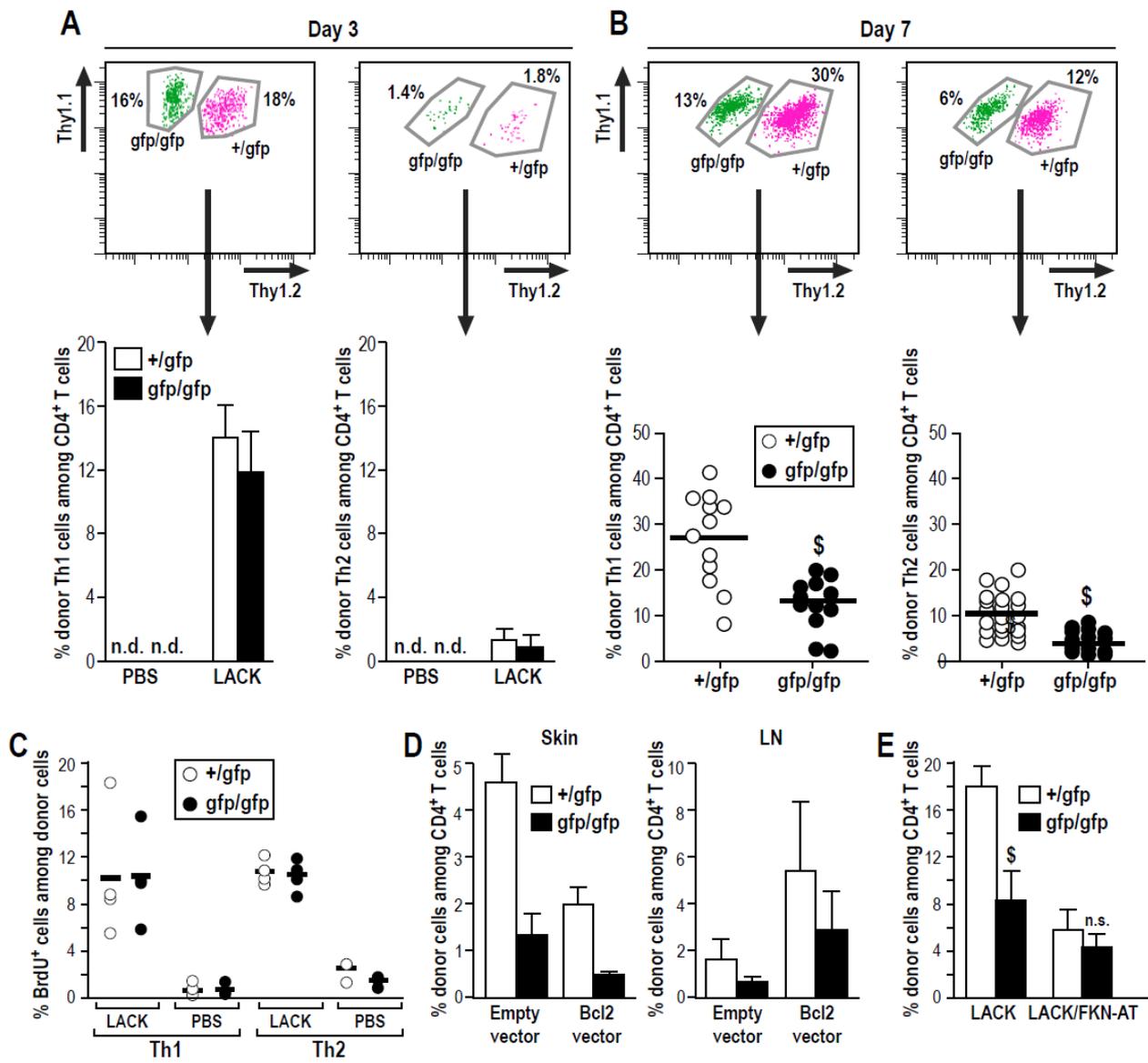


Figure 4

**Figure 4. CX3CR1 is neither required for early migration nor proliferation, nor survival but for T cell retention in inflamed skin.** Equal numbers of LACK-specific CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Th2 (A-D) or Th1 (A-C, E) cells were co-injected into CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice at day 0. Recipients were sensitized with LACK (black -histograms or -symbols) or PBS (grey -histograms or -symbols) at day 1 and day 4 and analyzed at day 3 (A) or day 7 (B-E). **A.** Donor cells were analyzed in skin by flow cytometry. Data show representative flow cytometry profiles (upper panels). Data show mean frequencies ± SEM of donor Th1 (bottom left panel) or Th2 (bottom right panels) cells among CD4<sup>+</sup> T cell population. One representative experiment out of two is shown. (*n*=6 mice per group). **B.** Donor cells were analyzed in skin by flow cytometry. Data show donor cell frequency of Th1 (bottom left panel) or Th2 (bottom right panel) in individual mice with bars indicating the mean from three experiments (*n*=16 mice per group). **C.** 18 h before sacrifice, recipient mice were injected with BrdU, and donor cells were analyzed by flow cytometry after staining with anti-BrdU, anti-Thy1.1, -Thy1.2 and -CD4 antibodies. Data show donor cell frequency of donor Th1 or Th2 cells in individual mice with bars indicating the mean in LACK-sensitized mice (*n*=4 mice), and in PBS-sensitized mice (*n*=2 mice). (One representative experiment out of two). **D.** CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> (empty histograms) and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> (black histograms) Th2 cells were infected with a Bcl2 or an empty retroviral vector. Equal numbers of transduced cells were co-injected into recipients that were further sensitized with one round of LACK sensitization. Data show mean of donor cell frequency in skin (left panel) and inguinal draining LN (right panel) of individual mice in one representative experiment out of two. (*n*=5 mice per group). **E.** At day 4, recipient mice received topically LACK together with FKN-AT. Three days later, the frequencies of donor cells were analyzed in skin by flow cytometry. Data show mean of donor cell frequency of individual mice in one representative experiment out of two. (*n*=5 mice per group). \$ Statistically different from CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> donor cells (*P* < 0.05).

## REFERENCES

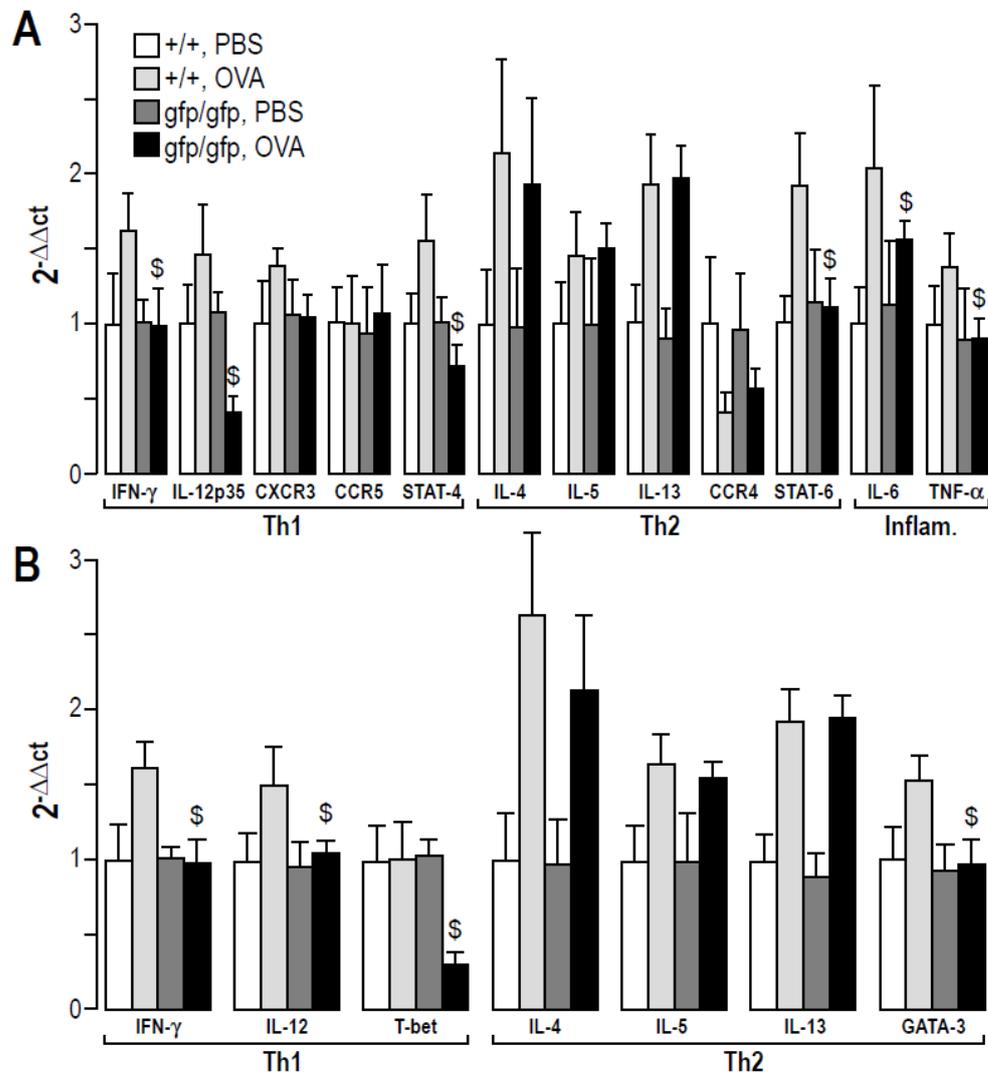
1. Guttman-Yassky, E., K.E. Nogales, and J.G. Krueger. 2011. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 127:1110-1118.
2. Guttman-Yassky, E., K.E. Nogales, and J.G. Krueger. 2011. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 127:1420-1432.
3. Leung, D.Y., M. Boguniewicz, M.D. Howell, I. Nomura, and Q.A. Hamid. 2004. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest* 113:651-657.
4. Grewe, M., C.A. Bruijnzeel-Koomen, E. Schopf, T. Thepen, A.G. Langeveld-Wildschut, T. Ruzicka, and J. Krutmann. 1998. A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunol Today* 19:359-361.
5. Schall, T.J., and A.E. Proudfoot. 2011. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol* 11:355-363.
6. Kagami, S., T. Kakinuma, H. Saeki, Y. Tsunemi, H. Fujita, K. Nakamura, T. Takekoshi, M. Kishimoto, H. Mitsui, H. Torii, M. Komine, A. Asahina, and K. Tamaki. 2003. Significant elevation of serum levels of eotaxin-3/CCL26, but not of eotaxin-2/CCL24, in patients with atopic dermatitis: serum eotaxin-3/CCL26 levels reflect the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 134:309-313.
7. Owczarek, W., M. Paplinska, T. Targowski, K. Jahnz-Rozyk, E. Paluchowska, A. Kucharczyk, and B. Kasztalewicz. 2011. Analysis of eotaxin 1/CCL11, eotaxin 2/CCL24 and eotaxin 3/CCL26 expression in lesional and non-lesional skin of patients with atopic dermatitis. *Cytokine* 50:181-185.

8. Reiss, Y., A.E. Proudfoot, C.A. Power, J.J. Campbell, and E.C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194:1541-1547.
9. Homey, B., H. Alenius, A. Muller, H. Soto, E.P. Bowman, W. Yuan, L. McEvoy, A.I. Lauerma, T. Assmann, E. Bunemann, M. Lehto, H. Wolff, D. Yen, H. Marxhausen, W. To, J. Sedgwick, T. Ruzicka, P. Lehmann, and A. Zlotnik. 2002. CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nat Med* 8:157-165.
10. Islam, S.A., D.S. Chang, R.A. Colvin, M.H. Byrne, M.L. McCully, B. Moser, S.A. Lira, I.F. Charo, and A.D. Luster. 2011. Mouse CCL8, a CCR8 agonist, promotes atopic dermatitis by recruiting IL-5+ T(H)2 cells. *Nat Immunol* 12:167-177.
11. Nakayama, T., Y. Watanabe, N. Oiso, T. Higuchi, A. Shigeta, N. Mizuguchi, F. Katou, K. Hashimoto, A. Kawada, and O. Yoshie. 2010. Eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 is a functional ligand for CX3CR1. *J Immunol* 185:6472-6479.
12. Mionnet, C., V. Buatois, A. Kanda, V. Milcent, S. Fleury, D. Lair, M. Langelot, Y. Lacoeyille, E. Hessel, R. Coffman, A. Magnan, D. Dombrowicz, N. Glaichenhaus, and V. Julia. 2010. CX3CR1 is required for airway inflammation by promoting T helper cell survival and maintenance in inflamed lung. *Nat Med* 16:1305-1312.
13. Echigo, T., M. Hasegawa, Y. Shimada, K. Takehara, and S. Sato. 2004. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in atopic dermatitis: possible contribution to skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 113:940-948.
14. Fraticelli, P., M. Sironi, G. Bianchi, D. D'Ambrosio, C. Albanesi, A. Stoppacciaro, M. Chieppa, P. Allavena, L. Ruco, G. Girolomoni, F. Sinigaglia, A. Vecchi, and A. Mantovani. 2001. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 107:1173-1181.

15. Tremblay, K., M. Lemire, V. Provost, T. Pastinen, Y. Renaud, A.J. Sandford, M. Laviolette, T.J. Hudson, and C. Laprise. 2006. Association study between the CX3CR1 gene and asthma. *Genes Immun* 7:632-639.
16. Depner, M., M.S. Kormann, N. Klopp, T. Illig, C. Vogelberg, S.K. Weiland, E. von Mutius, C. Combadiere, and M. Kabesch. 2007. CX3CR1 polymorphisms are associated with atopy but not asthma in German children. *Int Arch Allergy Immunol* 144:91-94.
17. Spergel, J.M., E. Mizoguchi, J.P. Brewer, T.R. Martin, A.K. Bhan, and R.S. Geha. 1998. Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101:1614-1622.
18. Jung, S., J. Aliberti, P. Graemmel, M.J. Sunshine, G.W. Kreutzberg, A. Sher, and D.R. Littman. 2000. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20:4106-4114.
19. Bar-On, L., T. Birnberg, K.L. Lewis, B.T. Edelson, D. Bruder, K. Hildner, J. Buer, K.M. Murphy, B. Reizis, and S. Jung. 2010. CX3CR1<sup>+</sup> CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14745-14750.
20. Kim, K.W., A. Vallon-Eberhard, E. Zigmond, J. Farache, E. Shezen, G. Shakhar, A. Ludwig, S.A. Lira, and S. Jung. 2011. In vivo structure/function and expression analysis of the CX3C chemokine fractalkine. *Blood* 118:e156-167.
21. Zhang, X., S. Yu, K. Hoffmann, K. Yu, and R. Forster. 2012. Neonatal lymph node stromal cells drive myelodendritic lineage cells into a distinct population of CX3CR1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> regulatory macrophages in mice. *Blood* 119:3975-3986.
22. Wang, Q., L. Malherbe, D. Zhang, K. Zingler, N. Glaichenhaus, and N. Killeen. 2001. CD4 promotes breadth in the TCR repertoire. *J Immunol* 167:4311-4320.

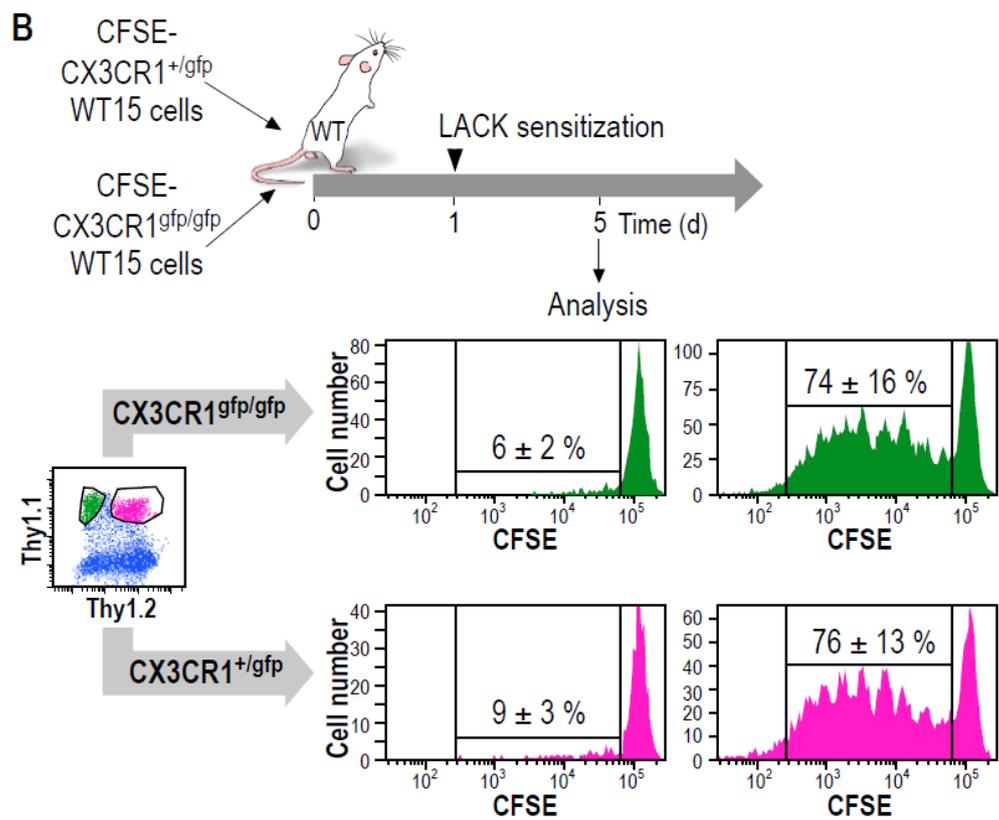
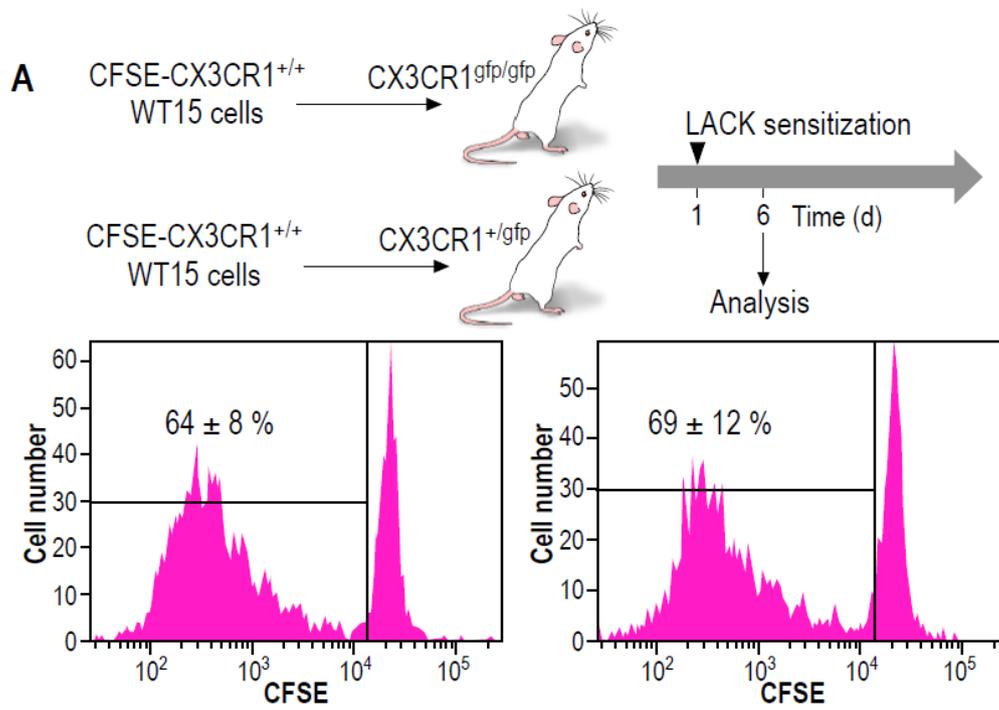
23. Spergel, J.M., E. Mizoguchi, H. Oettgen, A.K. Bhan, and R.S. Geha. 1999. Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. *J Clin Invest* 103:1103-1111.
24. Meucci, O., A. Fatatis, A.A. Simen, T.J. Bushell, P.W. Gray, and R.J. Miller. 1998. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14500-14505.
25. Landsman, L., L. Bar-On, A. Zernecke, K.W. Kim, R. Krauthgamer, E. Shagdarsuren, S.A. Lira, I.L. Weissman, C. Weber, and S. Jung. 2009. CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113:963-972.
26. Staumont-Salle, D., G. Abboud, C. Brenuchon, A. Kanda, T. Roumier, C. Lavogiez, S. Fleury, P. Remy, J.P. Papin, J. Bertrand-Michel, F. Terce, B. Staels, E. Delaporte, M. Capron, and D. Dombrowicz. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates skin inflammation and humoral response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 121:962-968 e966.
27. Kanda, A., V. Driss, N. Hornez, M. Abdallah, T. Roumier, G. Abboud, F. Legrand, D. Staumont-Salle, S. Queant, J. Bertout, S. Fleury, P. Remy, J.P. Papin, V. Julia, M. Capron, and D. Dombrowicz. 2009. Eosinophil-derived IFN-gamma induces airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the absence of lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*
28. Angeli, V., D. Staumont, A.S. Charbonnier, H. Hammad, P. Gosset, M. Pichavant, B.N. Lambrecht, M. Capron, D. Dombrowicz, and F. Trottein. 2004. Activation of the D prostanoid receptor 1 regulates immune and skin allergic responses. *J Immunol* 172:3822-3829.
29. Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.

Supplementary Figures



Supplementary figure 1

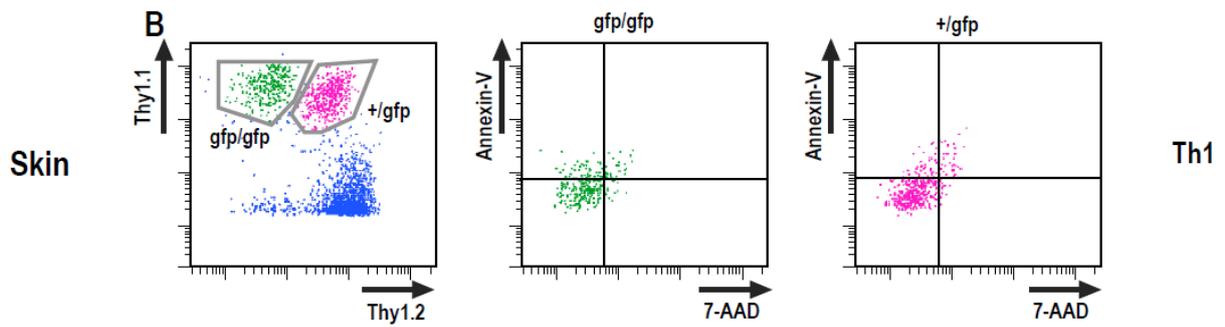
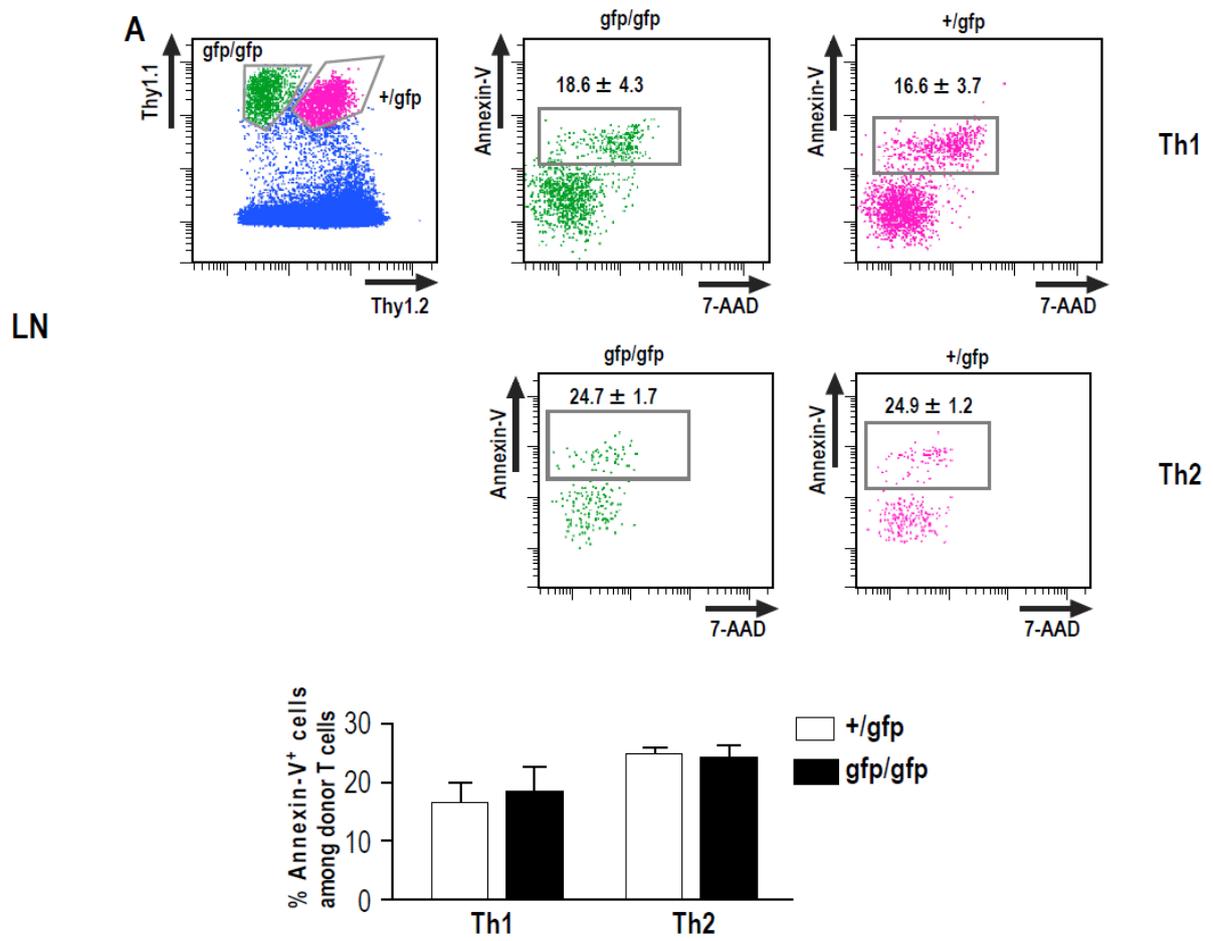
**Fig. S1. Attenuation of associated skin and draining lymph node response associated to AD in CX<sub>3</sub>CR1-deficient mice.** AD was induced on abdominal skin in CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> mice as described in Fig. 1. Abdominal skin collected at day 50 and steady-state mRNA expression was analyzed. **A.** Skin and **B.** Inguinal lymph node cytokine, chemokine and receptor, transcription factors mRNA expression. Results were expressed as the mean ± SEM fold induction compared with the mean expression level in PBS-treated WT mice. (*n*=6-10 animals per group). \$ Statistically different from CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> mice (*P* < 0.05)



**Fig. S2 CX<sub>3</sub>CR1-deficiency neither affects antigen presentation nor T cell proliferation. A.**

Lack of effect of CX<sub>3</sub>CR1 deficiency on antigen presentation. CSFE-labeled CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> WT15 Thy1.1<sup>+/+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells were injected i.v. into CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> or CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup> mice one day before epicutaneous sensitization with LACK. Donor cells were analyzed by flow cytometry 5 days later in inguinal LN after gating onto CD4<sup>+</sup> Thy1.1<sup>+</sup> cells. Data show one representative flow cytometry profile of CFSE staining with numbers indicating frequencies of dividing donor cells ± SEM (*n*=6)

**B.** Lack of effect of CX<sub>3</sub>CR1 deficiency on T cell proliferation. CSFE-labeled CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/+</sup> WT15 CD4<sup>+</sup> T cells were co-injected i.v. into WT Thy1.1<sup>-/-</sup> Thy1.2<sup>+/+</sup> mice one day before LACK or PBS epicutaneous sensitization. Donor cells were analyzed by flow cytometry 4 days later in inguinal LN after gating CD4<sup>+</sup> Thy1.1<sup>+</sup> cells. Data show a representative flow cytometry profile of CFSE staining with numbers indicating dividing CX<sub>3</sub>CR1<sup>+/+</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> donor cells. (*n*=5 mice in each group).



Supplementary figure 3

**Fig. S3. The absence of CX3CR1 does not induce preferential T cell death.** CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/+</sup> WT15 Th1 or CX<sub>3</sub>CR1<sup>+gfp</sup> Thy1.1<sup>+/-</sup> and CX<sub>3</sub>CR1<sup>gfp/gfp</sup> Thy1.1<sup>+/+</sup> WT15 Th2 cells were co-injected i.v. into WT Thy1.1<sup>-/-</sup> Thy1.2<sup>+/+</sup> mice one day before LACK epicutaneous sensitization. Donor cells were analyzed by flow cytometry 3 days later in inguinal LN (A) or in skin (B) after staining with antibodies to CD4, Thy1.1, Thy1.2, and Annexin-V, and 7-AAD. Data show representative flow cytometry profiles as well as mean frequencies of Annexin-V<sup>+</sup> cells among donor cells ± SEM.

Gene	Primer	Size	Sequence
Mouse GAPDH	Forward	20	5' CGT CCC GTA GAC AAA ATG GT 3'
	Reverse	20	5' AGG TCA ATG AAG GGG TCG TT 3'
Mouse IL-4	Forward	22	5' GGT CTC AAC CCC CAG CTA GTT G 3'
	Reverse	20	5' ATG GCG TCC CTT CTC CTG TG 3'
Mouse IL-5	Forward	22	5' TGA CCG CCA AAA AGA GAA GTG T 3'
	Reverse	23	5' TTG CCC ATT CTG TAC TCA TCA CA 3'
Mouse IL-12p35	Forward	20	5' CCA AAC CAG CAC ATT GAA GA 3'
	Reverse	20	5' AGC TCC CTC TTG TTG TGG AA 3'
Mouse IL-13	Forward	20	5' TTG CAT GGC CTC TGT AAC CG 3'
	Reverse	20	5' CGT GGC GAA ACA GTT GCT TT 3'
Mouse IL-6	Forward	20	5' CCA CGG CCT TCC CTA CTT CA 3'
	Reverse	22	5' CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G 3'
Mouse IFN- $\gamma$	Forward	20	5' GCT TTG CAG CTC TTC CTC AT 3'
	Reverse	22	5' CCA GTT CCT CCA GAT ATC CAA G 3'
Mouse TNF- $\alpha$	Forward	21	5' GTC TAC TGA ACT TCG GGG TGA 3'
	Reverse	20	5' CTC CTC CAC TTG GTG GTT TG 3'
Mouse CCR4	Forward	20	5' CGG CAT TGC TTC ATA GAC TG 3'
	Reverse	20	5' GTT TCA TCC TGG GTG GTG TC 3'
Mouse CCR5	Forward	20	5' ATC CGT TCC CCC TAC AAG AG 3'
	Reverse	20	5' GCA GGG TGC TGA CAT ACC AT 3'
Mouse CXCR3	Forward	20	5' AGC CAA GCC ATG TAC CTT GA 3'
	Reverse	20	5' GAG TCA GAG AAG TCG CTC TC 3'
Mouse T-bet	Forward	20	5' CCA ACA ATG TGA CCC AGA TG 3'
	Reverse	21	5' AGC TGA GTG ATC TCT GCG TTC 3'
Mouse GATA-3	Forward	20	5' GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA 3'
	Reverse	20	5' CAT TAG CGT TCC TCC TCC AG 3'
Mouse STAT-4	Forward	20	5' CCT GGG TGG ACC AAT CTG AA 3'
	Reverse	19	5' CTC GCA GGA TGT CAG CGA A 3'
Mouse STAT-6	Forward	19	5' CAT GAA CAA CAC GGT GCC C 3'
	Reverse	22	5' GGT GAC AGA CTC TGT GCC CTT C 3'

**Table S1. Sequences of primer sequences used for RT-PCR**

**AUTEUR : HORNEZ**

**Nicolas**

**Date de Soutenance : 24/09/2012**

**Titre de la Thèse : Rôle du couple fractalkine/CX<sub>3</sub>CR1 dans la dermatite atopique**

**Thèse, Médecine, Lille,**

**Cadre de classement : *DES Dermatologie-Vénérologie***

**Mots-clés : Chimiokines, Fractalkine, CX<sub>3</sub>CR1, CX<sub>3</sub>CL1, Dermatite atopique**

**Résumé :**

La dermatite atopique (DA) est une dermatose inflammatoire et allergique, très fréquente, à la physiopathologie complexe et de polarisation mixte : Th2 en phase aiguë et Th1 en phase chronique. Certaines études mettent en évidence des niveaux élevés d'expression de la fractalkine (FKN) et de son récepteur CX<sub>3</sub>CR1 chez les malades. Nous avons voulu approfondir l'étude du rôle de ce couple dans la DA.

L'étude de souris déficientes en CX<sub>3</sub>CR1 et de l'effet d'un antagoniste de la FKN dans un modèle murin de DA a permis de mettre en évidence une atténuation importante de l'expression de la maladie. Le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 semble impliqué dans la rétention des lymphocytes T aux sites inflammatoires et dans un mécanisme d'amplification de la réponse Th1.

Nous avons également souhaité confirmer la relevance de ces résultats pour la physiopathologie humaine en analysant des échantillons cutanés humains de dermatite atopique chronique. Nos résultats confirment une surexpression du couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 et une polarisation mixte et complexe dans la DA. Le couple FKN/CX<sub>3</sub>CR1 pourrait ainsi constituer donc une cible thérapeutique d'intérêt dans la phase chronique de la dermatite atopique chez l'homme.

**Composition du Jury :**

**Président : Pr Emmanuel DELAPORTE**

**Assesseurs : Pr Pierre THOMAS  
Pr Lionel PRIN**

**Directeur de thèse : Dr Delphine STAUMONT-SALLE**

██  
██