

Université des Sciences et Technologies de Lille I  
Université du Droit et de la Santé de Lille II

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ MENTION : IMMUNOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement

par

**Olivier FAHY**

Le 07 Décembre 2000

### **IMPACT DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE URBAINE SUR LA REPOSE INFLAMMATOIRE : IMPLICATION DES CHIMIOKINES**

Devant le jury composé de :

<b>Professeur Xavier DESBIENS</b> Université des Sciences et Technologies, Lille	<b>Président</b>
<b>Professeur Francelyne MARANO</b> Université de Paris VII	<b>Rapporteur</b>
<b>Professeur Marc HUMBERT</b> Hôpital Antoine Béclère, Clamart	<b>Rapporteur</b>
<b>Docteur Hélène DESQUEYROUX</b> ADEME, Paris	<b>Examineur</b>
<b>Professeur André-Bernard TONNEL</b> Hôpital Calmette, INSERM U-416, Lille	<b>Examineur</b>
<b>Docteur Anne TSICOPOULOS</b> INSERM U-416, Lille	<b>Examineur</b>
<b>Professeur Benoît WALLAERT</b> Hôpital Calmette, INSERM U-416, Lille	<b>Directeur de Thèse</b>

**INSERM - INSTITUT PASTEUR**

# SOMMAIRE

## ABBREVIATIONS

## RESUME

## PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### CHAPITRE I : Pollution Atmosphérique

**A. Industrialisation et accroissement des émissions polluantes**

**B. Les différents polluants atmosphériques**

**1. Gazeux : SO<sub>2</sub>, CO, NO et NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>**

**2. Particulaires : SPM**

**C. Le diesel : Un impact majeur**

**1. Historique et définition physique**

**2. Répartition et évolution du parc automobile**

**3. Un composé complexe : Carbone particulaire, PAHs**

**D. Corrélation entre hausse de la prévalence des allergies et urbanisation croissante**

### CHAPITRE II : La réaction inflammatoire allergique

**A. L'Asthme : Une préoccupation grandissante**

**B. Mécanismes de la réaction inflammatoire allergique asthmatique**

**1. Les allergènes :**

**a. Introduction**

**b. Les acariens**

**c. Les allergènes de D. pt.**

**d. Der p 1**

**e. Rôle de Der p 1 dans la réaction inflammatoire**

**2. La réponse IgE**

**3. Les cytokines et le concept Th1/Th2 :**

**a. Les populations lymphocytaires B et T**

**b. Phénotypes Th1 et Th2**

- c. Les cytokines de type 1 et 2
  - d. Autres cytokines d'intérêt
  - 4. Nature des signaux polarisant vers les phénotypes Th1 et Th2
  - 5. Th1/Th2 et allergies
- C. Le modèle de la souris SCID**
- 1. Anomalies immunologiques
  - 2. Reconstitution et greffes

## **CHAPITRE III : Recrutement cellulaire : Le rôle des Chimiokines**

### **A. Introduction**

- 1. Schématisation de la transmigration
- 2. Mécanisme de locomotion cellulaire

### **B. Les familles de chimiokines**

- 1. Définition
- 2. Localisation chromosomique
- 3. Chimiokines d'intérêt dans notre étude
- 4. Inter-régulations chimiokines/cytokines

### **C. Les récepteurs aux chimiokines**

- 1. Structure
- 2. Mécanisme de transduction du signal
- 3. Récepteurs de chimiokines et allergie
  - a. Correspondance avec le concept Th1/Th2
  - b. Implication directe dans l'allergie
- 4. Récepteurs des chimiokines d'intérêt dans notre étude

## **CHAPITRE IV : Impact biologique des émissions diesel**

### **A. Un rôle carcinogène controversé**

### **B. Des études épidémiologiques difficiles**

### **C. Effets du diesel sur la réaction inflammatoire allergène-dépendante**

- 1. Modulation de la réponse IgE
  - a. Etudes chez les modèles animaux
  - b. Etudes chez l'homme
- 2. Action sur les cellules effectrices et le complément
- 3. Altération de l'épithélium

#### **4. Mécanismes de transduction du signal**

**a. AhR**

**b. R.O.S: - MAP Kinases**

**- Les facteurs de transcription nucléaires (NF- $\kappa$ B, AP1)**

### **CHAPITRE V : But du travail**

## **DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE RECHERCHE**

**1. Journal of Allergy and Clinical Immunology**

**2. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**

**3. Journal of Immunology**

**4. American Journal of Pathology**

## **TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **ANNEXES**

**1. Toxicology Letters**

**2. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique**

**3. Liste des Publications et Communications**

## RÉSUMÉ

La pollution atmosphérique urbaine est à la fois gazeuse et particulaire, et les tendances industrielles actuelles font des moteurs diesel les principales sources de particules dans l'air. Ces émissions diesel sont duales : Les particules de carbone présentent à leur surface de multiples composés adsorbés, dont les représentants de la famille des hydrocarbures polycycliques aromatiques. Ces particules diesel et leurs composés organiques associés sont probablement impliqués dans la recrudescence récente des manifestations pathologiques allergiques. Dans ce travail, nous avons voulu évaluer l'impact des extraits organiques de particules diesel sur la phase d'initiation et sur l'orientation de la réponse inflammatoire allergène-dépendante, en analysant les dérégulations d'une famille de médiateurs responsables du recrutement cellulaire, les chimiokines.

Nous avons pu montrer que l'exposition de cellules mononucléées et de macrophages alvéolaires de sujets sains aux extraits organiques de diesel induit une dérégulation marquée de la synthèse et de la production de chimiokines pro-inflammatoires (IL-8, MCP-1, RANTES). D'autre part, il existe une synergie des effets du diesel et de l'allergène spécifique lorsque des cellules de patients allergiques sont exposées simultanément à ces deux stimuli, débouchant sur une sur-expression massive de ces médiateurs alors responsables d'un recrutement accru de cellules effectrices comme les neutrophiles ou les éosinophiles. La voie des MAP Kinases semble être particulièrement sollicitée dans la transduction de ces stimuli, puisque qu'une inhibition spécifique a permis d'abolir en grande partie ces effets dérégulateurs. Diesel et allergène apparaissent de plus responsables d'une orientation vers une réponse immunitaire de type 2 (pro-allergisante), en favorisant le recrutement de lymphocytes Th2 via la balance de production de chimiokines (MDC et IP-10).

Enfin, le modèle de la souris SCID humanisée et greffée avec de la peau humaine a permis d'aborder *in vivo* les effets d'une surproduction locale de chimiokines, en analysant les recrutements cellulaires cutanés après injection de chimiokines recombinantes. Ce modèle apparaît prometteur dans l'étude des mécanismes de recrutement cellulaire par les chimiokines et leur modulation thérapeutique éventuelle.

En conclusion, nos travaux soulignent les effets perturbateurs d'une exposition combinée diesel/allergène sur un paramètre essentiel de la réponse inflammatoire, potentiellement responsable d'une augmentation du nombre des acteurs cellulaires et de leur activation, et donc d'une sévérité accrue des symptômes chez les patients allergiques.

**TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET  
PERSPECTIVES**

Dans cette étude, nous nous sommes attachés à comprendre l'effet dérégulateur des émissions diesel sur un paramètre essentiel dans l'initiation de la réponse inflammatoire, la synthèse de chimiokines. Nous avons choisi de travailler avec des extraits organiques des particules de diesel, réalisés avec un solvant (le dichlorométhane), car si le corps carboné de ces particules apparaît important pour les possibles effets cancérigènes ou dans les études conduites *in vitro* avec des cellules de structure, il semble bien que ce soit ces hydrocarbures adsorbés qui soient responsables de la plupart des effets sur les paramètres de la réaction inflammatoire (BolandS, AmJPhysiol99).

Nous avons adopté la dose de 50 ng de DEP-PAHs/ml (ou 50 ng/million de macrophages) dans l'ensemble de nos travaux. On peut se poser la question de la pertinence physiologique d'une telle concentration. Une étude menée à Tokyo a calculé que la concentration moyenne annuelle en DEPs est de 24  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (soit 40% de la masse particulaire totale) (YoshizumiK, cf ref23 TeradaN, ClinExpAll99). On peut considérer, au vu de leur taille moyenne, que 25% des particules de diesel se déposent dans le système respiratoire (Heyder, JaerosolSci87). Puisque nous respirons 15 à 20  $\text{m}^3$  d'air par jour, nous sommes susceptibles de voir environ 0.1 mg de DEPs se déposer dans nos voies respiratoires (il est intéressant de noter qu'à Los Angeles, cette valeur est estimée à 0.3mg (DS, JCI94), ce qui est assez concordant). Puisque les DEP-PAHs représentent près de 40% de la masse des DEPs récupérées sur les filtres (TakenakaH, JACI95), on peut obtenir une valeur de 40  $\mu\text{g}$  par période de 24h. Un individu moyen possède environ 1 milliard de macrophages dans ses poumons. On obtient donc une valeur de 40 ng de DEP-PAHs par million de macrophages, ce qui est tout à fait dans l'ordre de grandeur des concentrations utilisées dans cette étude. Pour les cellules mononucléées, ce calcul s'avère beaucoup plus difficile à réaliser, mais le fait que l'on obtienne une dose-réponse avec des concentrations croissantes de DEP-PAHs permet de penser que l'on se trouve à des niveaux physiologiquement représentatifs.

Dans notre approche *in vitro*, nous avons travaillé avec deux populations cellulaires :

Les cellules mononucléées du sang périphérique, constituées de lymphocytes et de monocytes/macrophages, les premières étant responsables de l'orchestration de la réponse immune, et les secondes étant de fortes productrices de chimiokines. Il nous a semblé avantageux de ne pas chercher à purifier plus avant l'un ou l'autre de ces types cellulaires. En effet, si cela ne permet pas d'être certain de l'origine exacte des variations observées, cela nous permet de nous placer dans un cadre plus proche de la situation *in vivo*, où les échanges entre ces cellules par médiateurs ou co-signaux sont cruciaux pour le métabolisme des chimiokines.

Les macrophages alvéolaires sont, avec les cellules épithéliales bronchiques, la première ligne de défense de l'organisme face à l'agression tant par les composés polluants que par les allergènes. Ces cellules nous ont donc particulièrement intéressé dans cette étude, d'autant qu'elles sont de fortes productrices de chimiokines.

### **- Dérégulation de la synthèse de chimiokines par le diesel:**

Nous pouvons tout d'abord remarquer que cette dérégulation se traduit aussi bien par une hausse que par une baisse de la production suivant les chimiokines considérées, nous permettant de penser d'emblée qu'il ne s'agit pas là d'une activation non spécifique. Il faut noter que les modifications en IL-8 et MCP-1 ont aussi pu être retrouvées pour les macrophages alvéolaires (données non publiées). Les taux de RANTES ne sont pas détectables dans les surnageants de macrophages alvéolaires).

De plus ces changements dans la synthèse des chimiokines étudiées sont présents au niveau transcriptionnel, indiquant que face au diesel, les cellules ne réagissent pas seulement par le relargage de médiateurs chimiotactiques, mais voient plutôt leur programme métabolique profondément modifié.



Les chimiokines sont des molécules pluripotentes, avec de multiples cibles cellulaires, responsables pour une large part du recrutement des cellules de l'immunité et de leur activation à un stade très précoce de la réaction inflammatoire. Nous pensons que les altérations du métabolisme des chimiokines par le diesel sont un des mécanismes par lesquels le diesel a une action directe sur les cellules immunitaires, induisant et exacerbant ainsi la réponse inflammatoire. Au vu des effets du diesel sur la synthèse d'IL-8, de RANTES, et de MCP-1, nous suggérons que l'exposition au diesel, par le biais des hydrocarbures présents sur les particules des fumées, puisse induire le recrutement préférentiel de neutrophiles, d'éosinophiles, et de cellules T mémoires (cibles majeures de l'IL-8 et du RANTES), plutôt que celui de monocytes/macrophages (cible principale du MCP-1).

Nos expériences de chimiotaxie avec des neutrophiles et des éosinophiles vont dans le sens des hypothèses développées ci-dessus.

Dans le cas des neutrophiles, l'IL-8 semble bien responsable à lui seul de 75% de l'augmentation de la migration observée, comme le démontrent les expériences d'inhibition. Mais il n'est pas impossible qu'un autre médiateur chimiotactique actif sur les neutrophiles participent conjointement à cette migration. En particulier, les extraits organiques des particules diesel provoquent une surproduction de la protéine C3a du complément, qui est un agent chimiotactique puissant pour les neutrophiles (Kanemitsu H, BiolPharmBull98). On peut aussi noter que suite à une exposition à des émissions diesel chez des volontaires humains, les expressions des ARNm codant pour GRO- $\alpha$ , un autre médiateur puissant du recrutement des neutrophiles, en même temps que celles d'IL-8, ont été retrouvées augmentées dans les biopsies bronchiques et les LBA (Salvi SS, AJRCCM2000).

Dans les cas des éosinophiles, la situation est plus nuancée. Si le RANTES est certainement responsable pour une part de la migration accrue des éosinophiles, il apparaît évident que d'autres médiateurs doivent intervenir. L'eotaxine-1, un des plus puissants agents

de la migration de ces cellules, ne semble pas mis en jeu, puisque les taux détectés dans les surnageants sont à la limite de détection. Toutefois, il reste possible que ce médiateur agisse à des concentrations très faibles ou que d'autres chimiokines soient impliquées. Les eotaxines-2 et -3, les MCP-2 et -4, ou encore le MIP-1 $\alpha$  sont des candidats potentiels. Le MIP-1 $\alpha$  a d'ailleurs été retrouvé surexprimé après challenge nasal avec des DEPs (ainsi que le RANTES), et on peut remarquer que dans cette étude les taux d'eotaxine-1 ne sont pas affectés (DS, AJRMB98).

Nos résultats concordent en partie avec les observations de Salvi et al (AJRCCM99) chez des volontaires humains, montrant que l'exposition aux fumées diesels provoque entre autre un recrutement de neutrophiles et de lymphocytes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, mais où la migration des éosinophiles ne semble pas affectée.

L'opposition entre les effets du diesel sur la synthèse d'IL-8 et de RANTES d'une part et de MCP-1 d'autre part reste un résultat intrigant. A notre connaissance, une seule autre étude a retrouvé ce phénomène tant au niveau protéique qu'au niveau de l'ARNm, lors de l'exposition simultanée de PBMCs au LPS (Lipopolysaccharide) et à la PHA (Phytohemagglutinine) (LieblerJM, JI94). Une explication pourrait être que deux voies de transcription distinctes sont mises en jeu pour la production de ces deux chimiokines. L'exemple de BCL-6 est à ce titre très intéressant vis-à-vis de nos résultats. Ce gène code pour protéine de type « doigts de Zinc », jouant le rôle de répresseur transcriptionnel (ChangCC, PNAS96). Or BCL-6 vient d'être décrit comme réprimant spécifiquement la transcription des chimiokines MCP-1, MCP-3, et MRP-1 (mCCL6) au niveau des lymphocytes mais aussi des macrophages (ToneyLM, NatImmunol2000). De plus BCL-6 semble associé à la balance Th1/Th2, comme régulateur négatif de la différenciation vers un profil Th2. Si cette étude a été conduite chez la souris, les extrêmes similitudes retrouvées

dans les promoteurs humains de ces chimiokines laissent penser que ces résultats sont transférables à l'homme. Une autre possibilité est qu'un même facteur de transcription peut activer ou inhiber l'expression de certains gènes. C'est par exemple le cas du facteur de transcription AhR, et c'est pourquoi nous avons d'abord pensé étudier son implication dans la dérégulation de la synthèse de chimiokines par le diesel.

### **- Synergie des effets du diesel et de l'allergène sur la dérégulation de la synthèse de chimiokines :**

Pour les travaux utilisant le Der p 1, nous avons opté pour une dose de 100 ng/ml. Cette protéine est purifiée sur colonne d'affinité en utilisant un anticorps spécifique, à partir d'extraits d'acariens. Elle est ensuite passée sur colonne de polymixine B afin d'éliminer les possibles contaminations en LPS. La concentration choisie peut facilement être rencontrée lors d'une exposition naturelle (RusznakC, AJRCMB99).

L'allergène Der p 1 induit une forte augmentation en IL-8, RANTES, MCP-1. Ces chimiokines sont particulièrement intéressantes dans le contexte d'une réaction inflammatoire allergène-dépendante, notamment parce qu'elles sont retrouvées surexprimées localement chez les sujets asthmatiques allergiques (ChanezP, IntArchAllImmunol96 ; HumbertM, AJRCMB97 ; AlamR, AJRCCM96).

La potentialisation *in vitro* de ces effets par le diesel nous permet de penser que l'exposition de patients allergiques aux émissions diesel est de nature à amplifier le processus local d'inflammation. Cette hypothèse est renforcée par les résultats concordant obtenus lors des tests de chimiotaxie sur les neutrophiles et les éosinophiles.

Le cas de RANTES est particulièrement relevant. Si le recrutement éosinophilique n'a jusqu'à présent pas été retrouvé dans les études sur les volontaires humains non-allergiques,

Takano et al (AJRCCM97) ont montré dans un modèle murin d'asthme allergique que l'instillation intra-nasale de diesel entraîne un infiltrat d'éosinophiles et de lymphocytes dans l'épithélium bronchique. Un tel recrutement chez le patient allergique, doublé d'une possible activation des éosinophiles par le RANTES, entraînerait probablement une altération supplémentaire de l'épithélium sur le lieu de l'inflammation après la dégranulation des éosinophiles et des neutrophiles (WellerPF, CurrOpinImmunol94). Enfin il faut rappeler que RANTES peut directement augmenter la production spontanée d'IgE par des cellules B IgE<sup>+</sup> ayant déjà commuté (KimataH, JEM96). Or les extraits organiques de particules diesel ont été montrés comme pouvant augmenter la production d'IgE, en agissant aussi bien sur le switch des cellules B que sur la phase post-switch (DS, JCI94 ; FujiedaS, AJRCMB98). Nous pouvons donc penser que l'augmentation de RANTES par le diesel démontrée par nos travaux est une explication de l'augmentation de la synthèse d'IgE observée par d'autres.

Nos résultats concernant le TNF- $\alpha$  peuvent apporter une explication possible de l'augmentation observée pour IL-8 et RANTES. En effet, le TNF- $\alpha$  a été démontré comme capable d'induire la production de RANTES par des fibroblastes pulmonaires humains (TeranLM, AJRCMB99), ou par des cellules mononucléées de rat (LaneBR, JI99), cette dernière étude montrant par ailleurs une corrélation avec le recrutement d'éosinophiles. Bien que les populations cellulaires mise en jeu ici ne soient pas tout à fait les mêmes, il est dès lors séduisant de penser que la surexpression de TNF- $\alpha$  par une exposition combinée à l'allergène et au diesel soit indirectement responsable de l'augmentation observée pour IL-8 et RANTES. De plus le TNF- $\alpha$  a de multiples effets proinflammatoires, et en particulier il peut induire l'expression de molécules d'adhérence ou déclencher la dégranulation des éosinophiles (BochnerBS, JEM91 ; SlungaardA, JEM90). De ce fait sa surexpression et son action indirecte sur l'expression d'autres chimiokines pourrait favoriser le développement des

premières étapes de la réaction inflammatoire, en facilitant indirectement la diapédèse des cellules circulantes.

Le fait que diesel et allergène associés soient responsables d'une forte production d'IL-8, de RANTES, de TNF- $\alpha$ , mais aussi de MCP-1 laisse penser que les patients allergiques risquent de voir la sévérité de leurs symptômes aggravée, du fait de la facilitation de l'extravasation de granulocytes et du recrutement d'un large éventail de cellules inflammatoires.

### **- Implication de la voie des MAP Kinases :**

Au départ de nos expériences visant à élucider les mécanismes de transduction par lesquels le diesel peut agir sur la synthèse de chimiokines par les cellules mononucléées, deux voies majeures semblaient possiblement impliquées : Une interaction directe de certains hydrocarbures avec le récepteur cytosolique et facteur de transcription AhR, ou la voie des espèces réactives de l'oxygène (ROS) aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que AP-1 ou NF $\kappa$ B.

Nos premiers résultats concernant la possible implication de AhR se sont révélés négatifs. En effet lorsque nous avons incubé les cellules avec diverses doses de dioxine (le ligand majeur de AhR, qui est d'ailleurs retrouvé dans les DEP-PAHs) aucune variation dans les concentrations en chimiokines n'a été détectée dans les surnageants de culture. Ainsi, en stimulant AhR dans nos conditions de culture, nous n'avons pas pu reproduire les dérégulations observées dans la synthèse de chimiokines, ce qui suggère que cette voie de transduction n'est pas impliquée dans la médiation des effets du diesel sur les chimiokines.

En revanche, en ajoutant du glutathion à nos cultures, nous avons constaté que les productions d'IL-8, de RANTES, et à un moindre degré de MCP-1 sont sensibles à cet inhibiteur des certaines espèces activées de l'oxygène. Par contre l'effet de Der p 1 n'a lui pas été modulé par le glutathion (sauf dans le cas de RANTES), laissant penser que l'allergène peut stimuler la production de cytokines et de chimiokines par d'autres voies, telle que celle découlant de son activité protéasique, par exemple (ComoyE, JI98). Cette implication des ROS dans la médiation des effets du diesel semble d'ailleurs assez spécifique de la phase organique des particules de diesel (donc les DEP-PAHs que nous avons utilisé), car il a été démontré sur des macrophages alvéolaires qu'après extraction des DEP-PAHs, les particules « lavées » ne sont plus capables de déclencher la voie des ROS (HiuraTS, JI99). L'effet observé sur la production de RANTES n'est toutefois peut-être pas direct. Cette chimiokine est en partie régulée par les ROS telle que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RoebuckKA, JleucoBiol99). D'autre part il a aussi été démontré que la stimulation de plaquettes par un allergène entraîne la production de métabolites de l'oxygène (Tsicopoulos, IntJImmunopharmacol88), et il est très difficile de s'affranchir totalement d'une contamination (de l'ordre de 5%) de ce type cellulaire dans les cultures de cellules mononucléées. Dès lors il est possible que l'inhibition des modulations de RANTES par le glutathion dans notre étude soit en partie le résultat d'inactivation des plaquettes.

Pour définir plus précisément les mécanismes de transduction impliqués dans la médiation des effets du diesel sur les modulations au niveau des chimiokines, nous avons bloqué deux voies des MAP Kinases en aval des ROS : les voies de p38 et Erk1/2.

Ces expériences démontrent que ces MAP Kinases sont probablement les deux principaux intermédiaires des effets dérégulateurs du diesel sur la production de chimiokines par les cellules mononucléées. Les promoteurs des gènes codant pour IL-8, RANTES et MCP-1 peuvent tous être activés par des facteurs tels que NF- $\kappa$ B et AP-1. Takizawa et al (JI99) ont

montré que les particules de diesel peuvent induire l'expression d'IL-8 via l'activation de NF- $\kappa$ B (et pas celle d'AP-1) dans des cellules épithéliales bronchiques, et ce même facteur est impliqué dans la production de RANTES par les macrophages sous l'action des DEP-PAHs. Par contre c'est par l'intermédiaire de p38 et AP-1 que la quinone tBHQ (un dérivé important issu du métabolisme des DEP-PAHs) induit l'expression d'IL-8 et de RANTES dans des macrophages (NgD, JI98).

Cette multiplicité n'est pas étonnante si nous gardons à l'esprit que les DEP-PAHs forment une combinaison extrêmement complexe de composés chimiques, et qu'il y existe de nombreux types cellulaires susceptibles de les rencontrer. Toutefois, nos résultats laissent penser que dans le cas des chimiokines IL-8, RANTES, et MCP-1, c'est principalement les voies de p38 et Erk1/2 qui entrent en jeu.

### **- Le diesel favorise l'orientation de la réponse immune vers un profil de type 2 via la modulation des chimiokines MDC et IP-10 :**

Nous avons pu montrer que le ratio MDC/IP-10 est fortement augmenté tant pour les cellules mononucléées que pour les macrophages alvéolaires après une exposition combinée au diesel et à l'allergène, marquant une évolution vers un profil pro-Th2 dans la balance des chimiokines associées à l'un ou l'autre profil. Nous pouvons de plus remarquer que pour les macrophages, en contact direct avec les polluants aériens, le diesel oriente nettement ce ratio à la hausse, même en l'absence de l'allergène spécifique, et d'un ordre de grandeur similaire à ce dernier.

Le recrutement préférentiel de cellules T de type 2 par les surnageants de cellules exposées est en accord avec l'effet connu de MDC sur les cellules Th2 (ImaiT, IntImmunol99), et nos expériences d'inhibition lors des tests de chimiotaxie confirme le rôle, bien que partiel, de MDC dans ce recrutement.

Ni le TARC ni l'eotaxine ne sont apparus modulés par le diesel et/ou l'allergène dans nos expériences. On peut donc penser que l'orientation des premières étapes de la réponse immune déclenchée par le diesel associé à l'allergène est dépendante pour une large part de la balance entre MDC et IP-10. Pourtant d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales bronchiques humaines ne semblent pas ou peu exprimer MDC, même chez les patients asthmatiques sous une stimulation appropriée, alors que TARC est surexprimé chez les asthmatiques allergiques (SekiyaT, JI2000). Ainsi dans un organe donné, MDC et TARC pourraient donc tous les deux potentialiser la réponse allergique, mais avoir des sources cellulaires différentes.

Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux obtenus au niveau des cytokines par l'équipe de D. Diaz-Sanchez (JI97). Travaillant avec des lavages de nez après une stimulation simultanée par le diesel et un allergène, ils ont pu observer une hausse de l'expression des ARNm codant pour l'IL-4 et l'IL-13, tandis que celle de l'IFN $\gamma$  décroissait.

Nous savons que la production de chimiokines peut être régulée par les cytokines, et plus particulièrement que si MDC est régulé positivement par l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-6 (pour les lymphocytes), et l'IL-13 (pour les monocytes) et négativement par l'IFN $\gamma$ , l'expression de l'IP-10 est augmentée par l'IFN $\gamma$  (BonecchiR, Blood98 ; GalliG, EJI2000). Pourtant nos expériences d'inhibition de ces cytokines de type 1 et 2 tout comme nos évaluations de cinétique de transcription n'ont pas permis de démontrer une corrélation entre variations au niveau des chimiokines et variations au niveau des cytokines.

Mais la dérégulation des synthèses de MDC et d'IP-10 par diesel et allergène pourrait bien découler de l'activation d'une voie de transduction parallèle. En effet, les gènes des chimiokines sont partiellement sous contrôle du facteur de transcription Stat6, qui est classiquement décrit comme activé par l'IL-4 (LeonardWJ, JACI2000). Or la production de MDC par les cellules Th2 est Stat6-dépendante (Zhang, JI2000). Mais une étude récente a



décrit l'existence d'une voie d'activation de Stat6 indépendante de l'IL-4. Chez la souris, Herold et al (JI97) ont en effet démontré que la production de MIP-1 $\alpha$  par des cellules T après stimulation antigénique est augmentée par l'addition d'un anticorps monoclonal anti-CD28 mimant la costimulation par le CD28. De plus Oki et al ont démontré tout récemment que l'activation du CD28 par des anticorps monoclonaux spécifiques ou par la liaison de ligands naturels tels que le CD80 ou le CD86 induit la phosphorylation du CD28, qui recrute et active Stat6 en retour (EJI2000). Un tel mécanisme est donc indépendant des sécrétions en IL-4 ou en IL-13, et susceptible de médier la régulation positive des gènes codant pour les chimiokines associées à un profil de réponse de type 2. Cette hypothèse est d'autant plus séduisante que les particules diesel sont capables d'induire et d'augmenter l'expression d'ARNm codant pour le CD80 dans des lavages de nez. De même, l'expression de CD80 à la surface de cellules d'une lignée macrophagique (THP-1) est augmentée après incubation avec la tBHQ, une des principales quinones dérivant du métabolisme des DEP-PAHs (Nel, JACI98). Le diesel, de cette façon, pourrait être responsable d'un recrutement direct de cellules de type 2, pas nécessairement dépendant du profil de cytokines du microenvironnement. Une telle perspective pourra être étudiée plus avant afin de déterminer plus finement les différents mécanismes d'action délétère du diesel, et choisir au mieux les cibles d'action thérapeutiques.

Ces espoirs de manipulation du système immunitaire en agissant sur les chimiokines pour contrer les effets délétères des pathologies allergiques et de l'asthme en particulier, encore aggravées par les polluants atmosphériques, sont en bonne voie. Les approches visant les chimiokines ou leurs récepteurs sont basées sur deux principes : 1) Réduire les infiltrats caractéristiques en éosinophiles, lymphocytes Th2 ou basophiles, et la synthèse d'IgE ; et 2) Promouvoir une réponse Th1, pour rééquilibrer la balance Th1/Th2.

Basé sur ces principes, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été proposées (Gangur, AnnAllASthmaImmunol2000):

L'utilisation d'anticorps neutralisant.

L'utilisation de chimiokines modifiées, jouant le rôle d'antagonistes incapable d'induire une stimulation, mais inhibant de façon compétitive la liaison des chimiokines endogènes à leurs récepteurs. Une série d'études menées in vitro et sur des modèles murins avec Met-RANTES (Wells, InflammRes99) et plus récemment sur AOP-RANTES (Wells, ImmunolLett99), deux inhibiteurs des récepteurs au RANTES, a donné des résultats encourageants et permis de réduire l'accumulation des éosinophiles et des lymphocytes T dans les voies respiratoires, et d'atténuer sensiblement la réaction d'hyperréactivité bronchique et la production de mucus.

Le développement de petites molécules qui bloquent les récepteurs des chimiokines (Pour revue, voir Horuk et Ng, Med Rev Res, 2000).

L'utilisation de chimiokines recombinantes, ou de vecteurs produisant ces chimiokines (plasmides, rétrovirus) pour induire une réponse Th1 anti-allergique. (Voir aussi l'Annexe 2 pour de plus amples détails sur ces nouveaux vecteurs d'expression plasmidique)

L'un des problèmes rencontrés provient de la grande redondance des chimiokines. On peut alors penser que les stratégies visant à bloquer l'action d'une chimiokine donnée seront moins performantes que celles utilisant des antagonistes de plusieurs récepteurs de chimiokines à la fois.

On peut remarquer que les approches thérapeutiques visant les chimiokines et leurs récepteurs sont beaucoup plus avancées dans d'autres pathologies telles que l'infection HIV ou le cancer, où certaines études en sont désormais au stade clinique ou préclinique, et où chimiokines recombinantes, vecteurs viraux ou plasmidiques, aussi bien qu'anticorps monoclonaux sont utilisés (HogaboamCM, CurrentPharmaceuticalDesign2000). Ceci laisse penser que les

pathologies allergiques, bien qu'en retard dans ce domaine, pourront elles aussi bénéficier de ce genre d'approche, pour peu que les mécanismes en soit finement détaillés pour permettre un ciblage efficace.

Toutefois, en ce qui concerne l'effet aggravant de la pollution atmosphérique sur la réaction inflammatoire allergique et en parallèle de ces nouveaux outils thérapeutiques, il est plus que raisonnable d'agir avant tout de façon préventive à l'origine du problème concernant les émissions polluantes plutôt que de ne développer que des projets curatifs. Les efforts des constructeurs dans ce domaine ne peuvent que porter leurs fruits, puisque l'utilisation de pots catalytiques modernes permet de réduire de près de 90% les concentrations de DEP-PAHs récoltées sur les filtres en sortie d'échappement.

**- Le modèles de souris SCID humanisée et greffées avec de la peau humaine autologue s'avère être utile pour une première évaluation *in vivo* des effets des chimiokines.**

Nous pouvons remarquer tout d'abord que ce modèle nous a permis de montrer pour la première fois des effets non encore décrits des chimiokines sur des certaines populations cellulaires. Ceci souligne l'intérêt de posséder un modèle d'étude *in vivo* de ces molécules aux multiples activités.

IP-10 est capable d'induire le recrutement cutané de cellules dendritiques. L'origine de ces cellules reste à déterminer avec certitude. Elles pourraient provenir de précurseurs ou de cellules matures circulant dans le sang du donneur, ou bien avoir pour origine le greffon de peau et recirculer après sa vascularisation. Cet effet nouveau d'IP-10 pourrait être indirect (puisque les cellules dendritiques ne sont pas connues comme exprimant le récepteur de l'IP-

10, CXCR3), via le recrutement initial de lymphocytes T sécrétant ensuite d'autres médiateurs chimiotactiques.

L'action sélective d'IP-10 sur le recrutement de cellules CXCR3<sup>+</sup> est particulièrement intéressante dans le contexte des réactions cutanées d'hypersensibilité retardée (DTH pour Delayed Type Hypersensitivity). En effet l'IP-10 a été retrouvé très fortement exprimé dans cette pathologie largement médiée par les lymphocytes T de type 1 (KaplanG, JEM87). Notre modèle suggère que l'IP-10 soit un acteur majeur de la physiopathologie de cette réaction de DTH.

Nos résultats avec RANTES sont en accord avec un travail précédent qui a étudié les effets d'injections de RANTES dans la peau de volontaires humains (BeckLA, JI97). Le recrutement cutané sous l'action de RANTES semble principalement médié par le CCR3, et peu par le CCR4. Le rôle du RANTES est étudié dans de nombreuses pathologies à la fois de type 1 (comme la DTH) et de type 2 (comme la LPR, pour Late Phase Reaction, induite au niveau de la peau par un allergène) (DevergneO, JEM94, YingS, JEM95). L'étroite correspondance entre nos résultats dans le modèle SCID et chez l'homme et les nombreux types cellulaires recrutés par le RANTES sont en accord avec les données obtenues *in vivo* montrant une forte inhibition de la réaction allergique par l'utilisation d'antagonistes de RANTES (GonzaloJA, JEM98).

Le recrutement de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (mais aussi de CD4<sup>+</sup> et de CD45RO<sup>+</sup> dans une moindre mesure) par le MDC apparaît logique puisque Campbell et al ont démontré la présence de CCR4, son récepteur, sur les cellules T aussi bien CD4<sup>+</sup> que CD8<sup>+</sup> (Nature99). Comme de plus MDC induit *in vitro* le recrutement spécifique de lymphocytes CD8<sup>+</sup> inactivés de type 2 et pas de type 1 (D'AmbrosioD, JI98), nous pouvons penser que les lymphocytes T

CD8<sup>+</sup> composant l'infiltrat observé dans notre modèle sont de type 2, mais cette hypothèse séduisante reste à valider dans de prochains travaux.

Nous pouvons aussi remarquer que le nombre de cellules CCR4<sup>+</sup> recrutées par les injections de MDC est modeste en regard de son effet sur les cellules T. Ceci laisse envisager l'existence d'un (au moins) autre récepteur pour MDC (théorie qui a déjà été avancée dans d'autres études *in vitro* (StruyfS, JI98 ; BochnerBS, JACI99), ou d'un effet indirect dans le recrutement des lymphocytes T.

Nos résultats concernant l'eotaxine sont tout particulièrement relevant quand on sait que cette chimiokine est un puissant chimioattractant pour les éosinophiles, cibles de nombreuses recherches pharmaceutiques à cause de leurs effets destructeurs à la suite de leur recrutement massif dans la peau lors par exemple de la dermatite atopique. Dans notre modèle le recrutement d'éosinophiles mais aussi de basophiles a pu être confirmé, ainsi qu'un recrutement modéré de lymphocytes (explicables par le fait que seul un petit pourcentage de cellules T du sang périphérique expriment le CCR3 (AndrewDP, JI98)).

L'ensemble de ces résultats conforte nos perspectives de travail *in vivo* avec ce modèle parfois qualifié de « pré-humain » dans l'approfondissement des connaissances des mécanismes de recrutement cellulaire par les chimiokines dans la peau. Plus encore, et sans les contraintes éthiques applicables à toutes les études menées chez l'homme, ce modèle apparaît comme une excellente première étape dans l'évaluation *in vivo* des capacités des futures molécules thérapeutiques visant à inhiber la migration cellulaire en réponse aux chimiokines.

Mais le modèle de souris SCID humanisée devrait aussi à court terme être utile dans l'évaluation *in vivo* de l'impact des polluants, et du diesel en particulier, sur la réaction inflammatoire allergène-dépendante. En effet, grâce à une technique performante d'exposition par instillation intra-trachéale de particules de diesel et/ou d'allergène, il sera possible d'analyser le recrutement cellulaire dans les voies aériennes, permettant ainsi de faire le lien avec les résultats obtenus dans notre travail sur les variations de production de chimiokines probablement à l'origine de ces recrutements. Là encore, les différences entre sujets sains et patients allergiques pourront être analysées grâce à la reconstitution des animaux par les cellules mononucléées de l'un ou l'autre groupe. Enfin, la co-administration de chimiokines recombinantes ou de molécules antagonistes permettra d'évaluer les possibilités de manipulation de la balance Th1/Th2 dans l'optique de nouveaux traitements des maladies allergiques respiratoires.