

Table des matières

Résumé	III
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations	X
Remerciements	XII
Chapitre I: Introduction	1
1.1 Mise en contexte	1
1.2 Immunité pulmonaire.....	1
1.2.1 Immunité innée.....	2
1.2.1.1 Cellules structurales et protéines	2
1.2.1.2 Cellules résidentes	2
1.2.1.3 Cellules recrutées.....	3
1.2.2 Immunité adaptative.....	4
1.2.2.1 DCs	4
1.2.2.2 LyT	4
1.2.2.3 LyB	5
1.2.3 Réponses inflammatoires	5
1.3 L'expression du CD103 sur les DCs dans la réponse au LPS	6
1.3.1 Le LPS.....	6
1.3.1.1 Inflammation pulmonaire induite par le LPS	7
1.3.1.2 Modèle d'inflammation au LPS	8
1.3.2 Les DCs pulmonaires	8
1.3.2.1 La présentation d'ag	9
1.3.2.2 Développement des DCs pulmonaires.....	9
1.3.2.3 Localisation et fonctions spécifiques des DCs pulmonaires	11
1.3.2.3.1 Les pDCs et les moDCs	11
1.3.2.3.2 Les cDCs.....	12
1.3.2.3.2.1 Les DCs CD103 ⁺	12
1.3.3 L'intégrine CD103	13
1.3.3.1 Rôles connus du CD103	14
1.3.3.2 Modulation de l'expression du CD103.....	14
1.4 L'expression du CD34 sur les mastocytes et les éosinophiles dans l'asthme allergique	16
1.4.1 L'asthme allergique.....	16
1.4.1.1 Inflammation	16
1.4.1.2 Remodelage pulmonaire	18
1.4.1.3 L'Hyperréactivité du système respiratoire	20
1.4.1.3.1 Les médiateurs dans l'HRB	20
1.4.1.4 Les modèles animaux pour l'étude de l'asthme	21
1.4.2 Les mastocytes	22
1.4.2.1 Développement des mastocytes.....	23
1.4.2.2 Activation des mastocytes	23
1.4.2.3 Rôles des mastocytes dans l'asthme	24
1.4.3 Les éosinophiles	25
1.4.3.1 Développement des éosinophiles.....	26

1.4.3.2	Activation d'éosinophiles.....	26
1.4.3.3	Rôles des éosinophiles dans l'asthme.....	27
1.4.4	Le CD34	27
1.4.4.1	Rôles connus du CD34	28
1.4.4.1.1	Prolifération des cellules hématopoïétiques.....	28
1.4.4.1.2	Inhibition de la différenciation de cellules hématopoïétiques	28
1.4.4.1.3	Molécule d'adhésion sur les <i>high endothelial veinules</i> (HEV)	29
1.4.4.1.4	Inhibition des adhésions non-spécifiques	29
1.4.4.1.5	Trafic cellulaire.....	29
1.4.4.1.6	Pathologie inflammatoire.....	29
1.4.4.2	Implication du CD34 dans l'asthme allergique	30
Chapitre II:	Problématiques, hypothèses et objectifs	32
Chapitre III:	Matériels et méthodes	35
3.1	Souris utilisées	35
3.2	Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs.....	35
3.2.1	Culture de cellules B16-FLT3L et modèle <i>in vivo</i> d'expansion de DCs	35
3.2.2	Stimulation et migration des DCs isolées	36
3.2.3	Stimulation et analyse en cytométrie des DCs isolées	36
3.3	Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique.....	37
3.3.1	Analyse en cytométrie du nombre de mastocytes au poumon en contexte d'asthme chronique	37
3.3.1.1	Modèle d'asthme chronique au HDM	37
3.3.1.2	Isolement des leucocytes du poumon	38
3.3.1.3	Cytométrie en flux des leucocytes isolés.....	38
3.3.2	Culture de mastocytes (BMMCs) et d'éosinophiles (BMEos) dérivés de la moelle osseuse.....	38
3.3.2.1	Récolte de la moelle osseuse	38
3.3.2.2	BMMCs	38
3.3.2.3	BMEos.....	39
3.3.3	Impact des dégranulats de BMMCs et de BMEos sur la contraction de trachées.....	39
3.3.3.1	Dégranulation des BMMCs	39
3.3.3.1.2	Dosage de la β -hexosaminidase.....	40
3.3.3.2	Dégranulation de BMEos	40
3.3.3.2.1	Dosage de la peroxydase.....	40
3.3.3.3	Bains d'organes	41
3.3.4	Dosage de la production de lipides bioactifs dans l'asthme par les BMMCs et les BMEos.....	41
3.3.4.1	Dégranulation des BMMCs et des BMEos.....	41
3.3.4.3	Dosage des lipides par spectrométrie de masse (MS)	42
3.3.5	Dosage <i>in vivo</i> de la production de lipides bioactifs dans l'asthme en contexte d'asthme allergique	42
3.3.5.1	Modèle d'asthme aigu	42
3.3.5.2	Récupération des poumons et du sérum	42
3.3.5.3	Dosage des lipides par spectrométrie de masse (MS)	43
3.4	Statistique.....	43

Chapitre IV: Résultats	44
4.1 Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs	44
4.1.1 Analyse de l'expression du CD103 sur les populations DC1 vs DC2	44
4.1.2 Impact de la modulation du CD103 sur des fonctions des DCs.....	46
4.1.2.1 Capacité d'activation des lyT: Expression du CD80, du CD86 et du CD40.....	46
4.1.2.2 Migration: Réponse au SDF-1 et expression du CCR7.....	48
4.1.2.3 Adhésion à l'épithélium: Expression d'E-Cadhérine	50
4.2 Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique.....	52
4.2.1 Analyse en cytométrie du nombre de mastocytes au poumon de souris WT et <i>Cd34^{-/-}</i> exposées au HDM.....	53
4.2.2 Vérification des cultures BMMCs et BMEos	54
4.2.3 Analyse de l'impact des dégranulats des BMMCs et des BMEos sur la contraction du muscle lisse	56
4.2.4 Caractérisation de la dégranulation des BMMCs et BMEos.....	57
4.2.4.1 Analyse de la capacité de dégranulation des BMMCs et BMEos	57
4.2.4.2 Analyse de la production de lipides bioactifs dans l'asthme par les BMMCs et BMEos en MS	59
4.2.5 Analyse <i>in vivo</i> de la production de lipides bioactifs dans l'asthme.....	61
4.2.5.1 Analyse <i>in vivo</i> de la production de lipide dans le poumon	62
4.2.5.2 Analyse <i>in vivo</i> de la production de lipide dans le sérum	62
Chapitre V: Discussion et conclusion.....	65
5.1 Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs.....	65
5.1.1 Populations de DCs modulées par le GM-CSF, le LPS et le TNF.....	65
5.1.2 Impact de la modulation du CD103 sur la capacité d'activation des lyT, la migration et l'adhésion des DCs	66
5.2 Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique.....	69
5.2.1 Impact du CD34 sur la migration des mastocytes au poumon.....	69
5.2.2 Impact du CD34 sur la capacité de dégranulation des mastocytes et des éosinophiles.....	69
5.2.3 Impact du CD34 sur la production de lipides bioactifs dans l'asthme.....	70
5.3 Conclusions.....	73
Bibliographie	74

Liste des tableaux

Tableau 1	Tableau récapitulatif des résultats obtenus à la section 4.1.2	52
-----------	--	----

Liste des figures

Figure 1 Origine et développement des sous-populations de cellules dendritiques	11
Figure 2 Modulation de l'expression du CD103.	15
Figure 3 Schéma des cellules impliquées dans l'asthme allergique	18
Figure 4 Représentation d'une bronche asthmatique	19
Figure 5 Médiateurs surexprimés dans l'asthme allergique impliqués dans l'HBR	21
Figure 6 Origine et développement des mastocytes	23
Figure 7 Réactivité du système respiratoire à des doses croissantes de méthacholine.....	30
Figure 8 Capacité de contraction de trachées WT et <i>Cd34</i> ^{-/-}	31
Figure 9 Mouvement des populations de DCs exprimant ou non le CD103 et/ou le XCR1	45
Figure 10 Expression du CD80, du CD86 et du CD40	47
Figure 11 Migration en réponse au SDF-1 et expression du CCR7	49
Figure 12 Expression de l'E-Cadhérine.....	51
Figure 13 Nombre de mastocytes au poumon en contexte d'asthme allergique	54
Figure 14 Vérification des cultures dérivées de la moelle osseuse	55
Figure 15 Impact des dégranulats des BMMCs et des BMEos sur la contraction de trachées	57
Figure 16 Capacité de dégranulation des BMMCs et BMEos	58
Figure 17 Sécrétion de lipide par les BMMCs	60
Figure 18 Sécrétion de lipide par les BMEos	61
Figure 19 Analyse in vivo de la production de lipide dans le poumon	63
Figure 20 Analyse in vivo de la production de lipide dans le sérum.....	64
Figure 21 Conclusions de l'impact de la modulation du CD103 sur les fonctions de DCs .	68

Liste des abréviations

2-AG: 2-arachidonylglycérol
5-HETE: acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque
13-HODE: acide 13-hydroxyoctadécanoïque
18-HETE: acide 18-hydroxyeicosatétraénoïque
AAE: alvéolite allergique extrinsèque
ag: antigène
APC: cellules présentatrices d'antigènes
ADRS: syndrome de détresse respiratoire aiguë
BMEos: éosinophiles dérivés de la moelle osseuse
BMMCs: mastocytes dérivés de la moelle osseuse
CCR7: *C-C chemokine receptor type 7*
CD: cluster de différenciation
cDCs: cellules dendritiques conventionnelles
CDP: précurseur commun de DCs
Cd34^{-/-}: gène *Cd34* déficient
CMP: progéniteur myéloïde commun
CysLT: leucotriènes cystéinés
DCs: cellules dendritiques
DPA: acide clupanodonique
ECP: protéine cationique de l'éosinophile
EDN: neurotoxine dérivée de l'éosinophile
EoP: progéniteurs d'éosinophiles
EPO: peroxydase de l'éosinophile
FBS: sérum fœtal bovin
Flt3: *Fms-like tyrosine kinase 3*
Flt3L: Flt3 ligand
GM-CSF: facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages
GMPs: progéniteurs de granulocyte/monocyte
HDM: *House dust mite*
HEV: *high endothelial veinules*
HRB: hyperréactivité bronchique
Ig: immunoglobuline
IL: Interleukine
IRF: *Interferon regulatory factor*
LPS: lipopolysaccharide
LT: leucotriènes
lyB: lymphocyte B
lyT: lymphocyte T
MBP: protéine basique majeure
MCps: progéniteurs de mastocytes immatures
MCTR1: l'acide 13-glutathionyl-14-hydroxy docosahexaénoïque
MDP: précurseur de macrophage/DCs
MFI: *Mean Fluorescence Intensity*
MHC: complexe majeur d'histocompatibilité

moDCs: cellules dendritiques dérivées de monocytes
MS: spectrométrie de masse
MYD88: *myeloid differentiation primary response 88*
NF- κ B: *nuclear factor-kappa B*
OPD: o-phenylene-diamine
OVA: ovalbumine
PAF: facteur d'activation plaquettaire
PAMP: motifs moléculaires associés aux pathogènes
pDCs: cellules dendritiques plasmacytoïde
PG: prostaglandine
RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*
SDF-1: *stromal cell-derived factor 1*
SP: surfactant pulmonaire
TGF- β : *transforming growth factor β*
Th: *helper T cells*
TLR4: récepteur de type Toll 4
TNF: facteur de nécrose tumorale
TX: thromboxane
Treg : lymphocytes T régulateurs
XCR1: *X-C motif chemokine receptor 1*
WT: *wild type*

Remerciements

Ma maîtrise m'a permis d'acquérir davantage d'expérience en recherche ainsi que plusieurs nouvelles connaissances autant techniques que théoriques. Elle m'a également permis d'apprendre à me faire confiance. Au début de ma maîtrise, chaque nouvelle manipulation me stressait énormément et j'avais du mal à accepter les échecs. Maintenant, je sais que j'ai toutes les compétences pour réussir, mais qu'il est également possible de ne pas réussir du premier coup, l'important c'est de comprendre ses erreurs et de persévérer. Ainsi, j'aimerais prendre le temps de remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'accomplir cette maîtrise.

Tout d'abord, je tiens à remercier la Dre. Marie-Renée Blanchet pour m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire et pour m'avoir poussé et repoussé à avoir confiance en moi. Ensuite, je veux remercier Anick, Juju, Mel, Kath et Em, les autres membres de l'équipe, pour toute l'aide qu'elles m'ont apportée, leur écoute et leur amitié. Vous avez été un grand support scientifique, mais également moral grâce à nos niaiseries et fous rires.

J'aimerais également remercier le Dr. Ynuck Bossé et le Dr. Nicolas Flamand ainsi que leur équipe pour leur collaboration à mon projet. Ces collaborations m'ont apporté de nouvelles connaissances et ont permis de faire évoluer mon projet.

Enfin, je tiens particulièrement à remercier mes parents qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont toujours soutenue et encouragée et mon conjoint pour m'avoir épaulé tout au long de ma maîtrise. Vous avez su m'écouter dans les moins bons moments et me démontrer votre fierté lors de mes réussites.

Chapitre I: Introduction

1.1 Mise en contexte

Le maintien de l'homéostasie pulmonaire est influencé par une très grande quantité de cellules autant structurales qu'immunitaires. Certaines cellules résident au poumon, comme les cellules dendritiques (DCs) et les mastocytes, et d'autres y migrent en contexte inflammatoire, comme les éosinophiles. Chacune de ces cellules exprime à sa surface plusieurs molécules qui sont essentielles aux différentes fonctions des cellules. Ces molécules peuvent être des récepteurs de cytokines ou de chimiokines, des molécules d'adhésion, des molécules d'activations, des marqueurs de populations, *etc.* La plupart de ces molécules exercent plusieurs fonctions distinctes pour une même cellule et, parfois, différentes fonctions selon le type de cellules qui l'exprime ou le contexte inflammatoire. De plus, l'inflammation peut moduler l'expression de certaines de ces molécules et cette modulation peut influencer les fonctions de la cellule. Toutefois pour certaines molécules de surface, leurs fonctions ne sont pas toutes connues, comme pour le CD103 et le CD34. Dans ce mémoire, l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur les fonctions des DCs ainsi que l'impact de l'expression du CD34 sur les fonctions des mastocytes et des éosinophiles seront étudiés, et ce, en contexte d'immunité pulmonaire.

1.2 Immunité pulmonaire

Chaque jour, les alvéoles filtrent environ 8000 à 9000 litres d'air qui contiennent des microparticules de poussières, des microorganismes et des allergènes pouvant avoir un impact négatif sur l'homéostasie du poumon. [1] L'homéostasie pulmonaire est en partie maintenue grâce à la présence de cellules immunitaires résidentes au poumon qui permettent l'élimination de la majorité des dangers extérieurs de manière silencieuse. [1] Toutefois, les dangers extérieurs peuvent également causer l'activation du système immunitaire et une

inflammation consécutive. La réponse immunitaire peut être classée en deux phases, soit l'immunité innée et l'immunité adaptative. De plus, au poumon, différentes réponses inflammatoires peuvent être induites.

1.2.1 Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense et elle survient en quelques minutes à la suite d'une infection. Elle n'est pas spécifique à l'infection, mais elle permet soit son élimination ou son contrôle jusqu'au développement de l'immunité adaptative. Au poumon, la première ligne de défense comprend des cellules structurales, des protéines, des cellules immunitaires résidentes et une migration de nouvelles cellules immunitaires. [2, 3]

1.2.1.1 Cellules structurales et protéines

Les cellules épithéliales pulmonaires sécrètent une grande variété de peptides antimicrobiens afin d'éliminer les microorganismes étrangers et des médiateurs comme des cytokines pour recruter les cellules immunitaires au site de l'inflammation. [2, 4-8] De plus, elles produisent du surfactant pulmonaire (SP), qui est sécrété dans la lumière alvéolaire. Le SP est composé de quatre protéines nommées SP-A, SP-B, SP-C et SP-D. Les protéines SP-A et SP-D se lient à la surface des bactéries et favorisent leur phagocytose par les cellules immunitaires. [9]

1.2.1.2 Cellules résidentes

Les deux populations majeures de cellules résidentes sont les macrophages et les DCs. [1, 10, 11] D'autres cellules résident également au poumon, dont les mastocytes. [12]

Les macrophages résidents éliminent les pathogènes par phagocytose et participent au recrutement des neutrophiles en sécrétant des cytokines et des chimiokines. Au poumon, les macrophages sont la principale source de médiateurs inflammatoires qui permettent la propagation ou la diminution de l'inflammation. [2, 13, 14]

Les DCs pulmonaires sont des sentinelles permanentes. [1, 15] Elles captent des antigènes (ag) du soi afin de maintenir la tolérance périphérique qui consiste à éliminer les lymphocytes T (lyT) autoréactifs [16] et des ag étrangers afin d'activer l'immunité. De plus, elles activent davantage les macrophages [2], produisent des interférons, des cytokines importantes dans l'immunité antivirale [17] et réactivent les lyT déjà présents au poumon. [18]

Les mastocytes sont très importants dans la défense de l'hôte contre les infections parasitaires dû à la toxicité des enzymes contenues dans leurs granules. Ils sont aussi impliqués dans les infections virales et bactériennes.[19, 20] De plus, les mastocytes recrutent des cellules immunitaires au site d'inflammation, contrôlent les fonctions de certaines cellules dont les éosinophiles, les lyT et les lymphocytes B (lyB) et augmentent l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ce qui favorise l'entrée des leucocytes dans le tissu enflammé. [12, 21-24] Les mastocytes régulent également l'homéostasie en remodelant les tissus endommagés et en dégradant les toxines produites par l'infection. [25]

1.2.1.3 Cellules recrutées

Les neutrophiles sont prédominants dans l'immunité innée puisqu'ils sont les premiers recrutés au poumon par les cellules épithéliales et les macrophages. Ils phagocytent et tuent les bactéries, les moisissures et les protozoaires à l'aide d'enzymes de dégradation, de peptides antimicrobiens et de dérivés réactifs de l'oxygène. [2, 14, 26, 27]

Différents rôles sont connus pour les éosinophiles dans l'immunité innée. En effet, ils sont très importants dans la défense de l'hôte contre les infections parasitaires dû à la toxicité des enzymes contenues dans leurs granules. Ils sont aussi impliqués dans les infections virales et bactériennes. [28] Les éosinophiles interagissent avec les DCs et les lyB et activent davantage les mastocytes. [19, 29, 30] Finalement, ils régulent l'homéostasie tissulaire en affectant les fonctions de la barrière épithéliale, l'hyperplasie des cellules épithéliales et/ou des cellules du muscle lisse, la différenciation des myofibroblastes et l'angiogenèse. [28]

1.2.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative est une immunité spécifique aux ag d'une infection et nécessite plusieurs heures voir jours pour se développer. Elle inclut une activation de cellules effectrices et la production d'anticorps, spécifiques aux ag. Les principales cellules impliquées dans l'immunité adaptative sont les DCs, les lyT et les lyB.

1.2.2.1 DCs

En plus de jouer un rôle dans l'immunité innée, les DCs résidentes du poumon font le pont entre l'immunité innée et adaptative. [31] Les DCs captent des ag des agents infectieux et migrent aux ganglions lymphatiques (*lymph node* (LN)) pour activer les lyT. [2, 32] Selon le contexte inflammatoire, différents lyT vont être activés et migrer au poumon.

1.2.2.2 LyT

Les LyT se divisent en deux groupes avec des fonctions différentes soit les lyT clusters de différenciation (CD) 4⁺ et les lyT CD8⁺. Les lyT CD4⁺ sont activés par les DCs en lyT auxiliaires (helper T cells (Th)) ou en lyT régulateurs (Tregs). Il existe plusieurs types de lyT auxiliaires soit Th1, Th2 et Th17. La maturation des différents Th par les DCs est aussi dépendante de certaines cytokines et cellules immunitaires. Brièvement, la prolifération des Th1 est dépendante de l'interleukine (IL) 12, des cellules tueuses naturelles (cNK) et des lyT CD8. La production de Th2 est, quant à elle, induite par l'IL-4, entre autres produite par les macrophages et les éosinophiles. Finalement, les Th17 sont induits par l'IL-6, l'IL-23 et le facteur de croissance transformant bêta (TGF-β). [33] Au poumon, les Th1 aident l'immunité cellulaire en activant davantage les cellules immunitaires comme les macrophages et les lyT CD8.[34, 35] Les Th2 sécrètent des cytokines qui induisent la migration de cellules immunitaires comme les éosinophiles et les mastocytes. [34-37] Les Th17 activent et attirent les neutrophiles au poumon. [34] Dans le LN, les différents Th interagissent avec les lyB pour la production d'anticorps ou immunoglobuline (Ig). [34, 38] Les Treg sont des lyT CD4 sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β ou IL-35) et exprimant des molécules de surface suppressives (Galectin-1). Ils régulent la réponse

inflammatoire en inhibant la prolifération des autres lymphocytes et participent à la tolérance immunologique. Ils sont, donc, importants dans le maintien de l'homéostasie. [39]

Les lyT CD8⁺ sont activés par les DCs en lyT cytotoxiques. Les lyT CD8⁺ contiennent des granules contenant des molécules cytotoxiques comme des protéases et des perforines qui induisent la lyse des cellules touchées. Ils sont, donc, principalement impliqués dans la réponse antivirale en tuant les cellules infectées. [40]

1.2.2.3 LyB

Les lyB sont activés par les ag de l'infection qui se rendent aux LN par la circulation sanguine et par les lyT activés par les DCs et produisent des Ig spécifiques aux ag. Il existe plusieurs types d'Ig soit IgG, IgM, IgA, et IgE. [38, 41] Au poumon, les Ig se fixent sur les ag et favorisent leur phagocytose. De plus, les IgA participent à la barrière protectrice en empêchant les pathogènes de se lier aux cellules épithéliales [42] et les IgE permettent l'activation des mastocytes. [19]

1.2.3 Réponses inflammatoires

L'environnement pulmonaire est continuellement en contact avec diverses particules telles que des microorganismes, des poussières et des allergènes. Selon le type de particules inhalées, différentes réponses inflammatoires vont être induites. Il existe deux grands types d'inflammation, soit aigüe et chronique. Dans ce mémoire, l'impact de la modulation du CD103 sur les DCs sera étudié en contexte d'inflammation aigüe et l'impact de l'expression du CD34 sur les fonctions des mastocytes et des éosinophiles sera étudié en contexte d'inflammation chronique.

L'inflammation aigüe est surtout induite par l'inhalation de microorganismes tels que des bactéries et des virus et elle est rapidement résolue par les cellules de l'immunité innée. [2] Les bactéries peuvent être divisées en deux groupes selon la composition de leur paroi soit les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. [43, 44] La composition de leur paroi étant différente, les deux groupes de bactéries possèdent des ag différents et vont,

donc, différemment activer les cellules de l'immunité innée. [43-45] L'ag d'intérêt dans ce mémoire est le lipopolysaccharide (LPS) qui est retrouvé à la surface des bactéries à Gram négatif. Le LPS, qui sera décrit plus en détail dans la prochaine section, est un très bon modèle d'inflammation aiguë puisqu'il est exprimé par des bactéries et qu'il est un très fort activateur des cellules immunitaires, dont les DCs. [46]

L'inflammation chronique est caractérisée par une activation excessive des cellules immunitaires souvent accompagnée d'altérations dans la résolution de l'inflammation et qui cause des dommages tissulaires. Elle est majoritairement associée à des maladies pulmonaires et à l'inhalation d'allergène. [2] Comparativement à l'inflammation aiguë qui est surtout résolue par l'immunité innée, l'inflammation chronique est associée à la présence de lymphocytes et d'anticorps. [47] L'existence d'anticorps contre un allergène permet la réactivation plus rapide des cellules immunitaires lors d'une réexposition à l'allergène. Toutefois, cela peut entraîner une activation excessive des cellules à la suite de quelques réexpositions. Ce phénomène est la cause de l'asthme allergique, le modèle d'inflammation chronique d'intérêt dans ce mémoire.

Ainsi, dans ce mémoire, l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur les fonctions des DCs sera étudié en contexte d'inflammation au LPS et l'impact de l'expression du CD34 sur les fonctions des mastocytes et des éosinophiles sera étudié en contexte d'asthme allergique.

1.3 L'expression du CD103 sur les DCs dans la réponse au LPS

1.3.1 Le LPS

Le LPS est la composante majeure de la membrane externe des bactéries à Gram négatif et il est un stimulant très puissant du système immunitaire. Il est composé d'un oligosaccharide et d'un glycolipide associé à la membrane, nommé lipide A, qui est la partie

immunogène du LPS. La structure du LPS est spécifique à chaque espèce de bactérie et l'ensemble des différents LPS retrouvés dans l'environnement est regroupé sous le terme endotoxine. [46]

Les endotoxines sont présentes dans l'air et polluent plusieurs environnements de travail. En effet, des concentrations élevées d'endotoxines sont retrouvées dans les bioaérosols d'élevage de volaille [48] et de porc, [49] de la culture du coton [50, 51] et des usines de verre [52] et de métaux. [53] L'exposition à ces endotoxines peut induire de la fièvre, de la toux, des essoufflements, une respiration sifflante, des maux de tête, une irritation du nez et de la gorge, une oppression thoracique et de l'inflammation. [54] L'inhalation de LPS peut induire le syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS). L'ARDS est un état extrêmement grave où la compliance pulmonaire et la capacité d'échanges gazeux chutent radicalement. Il est causé par une atteinte de la membrane alvéolo-capillaire induisant un œdème pulmonaire lésionnel. [55] De plus, le LPS peut augmenter la sévérité de l'asthme et des infections pulmonaires en augmentant la réponse inflammatoire. Il peut également induire des maladies pulmonaires associées à une diminution de la fonction pulmonaire. [54]

1.3.1.1 Inflammation pulmonaire induite par le LPS

Les cellules de l'immunité innée sont activées par des ag spécifiques retrouvés à la surface des microorganismes nommés motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP). Les PAMPs sont des molécules essentielles à la survie des microorganismes et conservées au cours de l'évolution. Ils se fixent à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) exprimés par les cellules immunitaires. [45] Le LPS est l'un des PAMP qui permet la reconnaissance et l'élimination des bactéries à Gram négatif. Le récepteur du LPS est le récepteur de type Toll 4 (TLR4). [56, 57] La liaison du LPS au TLR4 active deux voies de signalisation soit *myeloid differentiation primary response 88* (MYD88) dépendante et MYD88 indépendante. La voie MYD88 dépendante active le *nuclear factor-kappa B* (NF- κ B) et la voie MYD88 indépendante active NF- κ B et l'*Interferon regulatory factor* (IRF) 3 ce qui mène à la production de cytokines pro-inflammatoires. La cytokine la plus sécrétée par l'activation du TLR4 est le facteur de nécrose tumorale (TNF). [58] Au poumon, le TLR4

est exprimé par les cellules endothéliales, les neutrophiles, les macrophages et les DCs. L'activation des cellules endothéliales et des macrophages par le LPS induit une forte migration de neutrophiles au poumon. [59] En sécrétant plusieurs médiateurs enzymatiques, les neutrophiles vont induire un dommage tissulaire important et entraîner des maladies comme l'ARDS. [55] Les DCs activées par le LPS produisent des cytokines pro-inflammatoires et activent d'avantages les macrophages. [2] Ainsi, l'inhalation de LPS induit une inflammation pulmonaire sévère caractérisée par une migration massive de neutrophiles au poumon et une forte production de TNF.

1.3.1.2 Modèle d'inflammation au LPS

Le LPS est utilisé dans plusieurs modèles d'inflammation pulmonaire puisqu'il permet d'induire une forte réponse inflammatoire aigüe et qu'il est facile d'utilisation. Il peut être utilisé *in vitro* comme activateur cellulaire et *in vivo* pour l'étude des infections aux bactéries à Gram négatif et l'ARDS. [60] Ici on parle de modèle d'inflammation aigüe, mais le LPS peut également être utilisé dans des modèles chroniques. L'administration chronique du LPS induit un remodelage des voies respiratoires et une augmentation du nombre de cellules à gobelets. [61]

Au poumon, le LPS peut activer plusieurs types cellulaires, dont les cellules endothéliales, les neutrophiles et les DCs. Dans ce mémoire, le LPS est utilisé afin d'étudier une sous-population de DCs pulmonaires.

1.3.2 Les DCs pulmonaires

Les DCs ont été découvertes vers la fin des années 70 par les chercheurs Ralph Steinman et Zanvil Cohn. [62, 63] Aujourd'hui, elles sont connues comme des cellules présentatrices d'antigènes (APC) impliquées dans l'initiation de l'immunité adaptative et dans l'établissement de la tolérance centrale et périphérique.

1.3.2.1 La présentation d'ag

Dans des organes non lymphoïdes comme les poumons, les DCs sont présentes sous forme immature et deviennent matures à la suite d'une activation par des PAMPs et la capture ag. Les ag sont présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dont l'expression est augmentée lors de la maturation. Il existe deux types de CMH: le CMH de type I, qui permet la présentation des ag endogènes, et le CMH de type II, qui permet quant à lui la présentation des ag exogènes. Durant la maturation, l'expression de plusieurs molécules est augmentée dont le *C-C chemokine receptor type 7* (CCR7), le CD80, le CD86, et le CD40. [64, 65] Une fois matures, les DCs migrent aux LN à l'aide du récepteur de chimiokines CCR7 afin de présenter leurs ag aux lyT. [32] Chaque lyT reconnaît spécifiquement un seul ag et les lyT CD4 reconnaissent des ag présentés par le CMHII et les CD8 par le CMHI. Ainsi, lorsqu'un lyT reconnaît son ag à la surface d'une DCs, il se fixe à celui-ci. Ensuite, plusieurs autres liaisons se forment entre le lyT et la DC afin d'activer le lyT et initier la réponse immunitaire adaptative. La liaison du CD40 au CD40 ligand (CD154) exprimé par les lyT augmente le niveau d'activation des DCs et, donc, augmente la production de cytokines qui activent les lyT. Alors que, la liaison du CD80 ou du CD86 avec le CD28 fournit aux lyT un signal nécessaire à son activation complète. [65-67]

À la suite de la découverte de ces APC, plusieurs recherches ont démontré qu'il existe différentes sous-populations de DCs. Les trois sous-populations retrouvées au poumon sont les DCs conventionnelles (cDCs), les DCs plasmacytoïdes (pDCs) ainsi que les DCs dérivées de monocytes (moDCs). Les différentes sous-populations de DCs sont différenciées selon leur développement, leur localisation et leurs fonctions spécifiques. Les DCs étudiées dans ce mémoire sont une sous-population de cDCs.

1.3.2.2 Développement des DCs pulmonaires

Dans le poumon, les cDCs, les pDCs et les moDCs ont une durée de vie très courte et doivent continuellement être remplacées par leur précurseur sanguin originaire de la moelle osseuse. Dans la moelle osseuse, leur développement débute avec un progéniteur myéloïde commun (CMP) qui a perdu le potentiel de se différencier en granulocyte, en érythrocyte et en mégacaryocyte nommé précurseur de macrophage/DCs (MDP). Le MDP se différencie

en monocyte le précurseur sanguin des moDCs et en précurseur commun de DCs (CDP). Les CDP se différencient soit en pDCs directement ou en pré-DCs le précurseur sanguin des cDCs. [68-76]

Les monocytes et les pré-DCs circulent dans le sang et se différencient respectivement en moDCs et en cDCs dans le poumon. Les pré-DCs se différencient en deux populations de cDCs soit les DC1 et les DC2. Le développement des DC1 est dépendant des facteurs de transcription suivants: l'IRF8, le *DNA-binding protein inhibitor* (Id2), le *basic leucine zipper transcription factor* (BATF3), le *Nuclear factor, interleukin 3 regulated* (NFIL3) et le *B-cell lymphoma 6 protein* (Bcl6). La déplétion de ces gènes entraîne un retard sévère dans le développement des DC1, mais n'influence pas le développement des DC2. [77-87] Seule la déplétion du facteur IRF8 inhibe complètement le développement des DC1. Le développement des DC2 est associé aux facteurs de transcription suivants: le RelB, le *Neurogenic locus notch homolog protein 2* (NOTCH2), le *Recombining binding protein suppressor of hairless* (RBP-J), l'IRF2 et l'IRF4. [88-92] Elles sont caractérisées par le facteur IRF4, toutefois leur développement n'est pas complètement dépendant de son expression. [89, 93] Les monocytes se différencient en moDCs majoritairement lorsque le poumon est en condition inflammatoire. Les pDCs, restent en majorité dans le sang, mais ils peuvent également migrer au poumon. [94-102]

Le *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3) ligand (Flt3L) est une cytokine essentielle à la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques des DCs. Elle est produite par les cellules endothéliales et les lyT activés et son récepteur est le Flt3 ou CD135. Le Flt3 est exprimé par les progéniteurs myéloïdes, par les précurseurs de DCs (MDP et CDP), par les pDCs et les pré-DCs dans le sang et les cDCs dans les tissus. Une perte d'expression du Flt3 dans la moelle osseuse est associée à une perte du développement de ces sous-populations de DCs. Le GM-CSF est également important dans la différenciation de ces progéniteurs. Son récepteur Csf-2R est exprimé par les MDPs, les CDP et les cDCs. [74, 103] Le GM-CSF n'est pas essentiel au développement des DCs comme le Flt3L, mais il est très important dans la survie des cDCs dans les organes non lymphoïdes. [103]

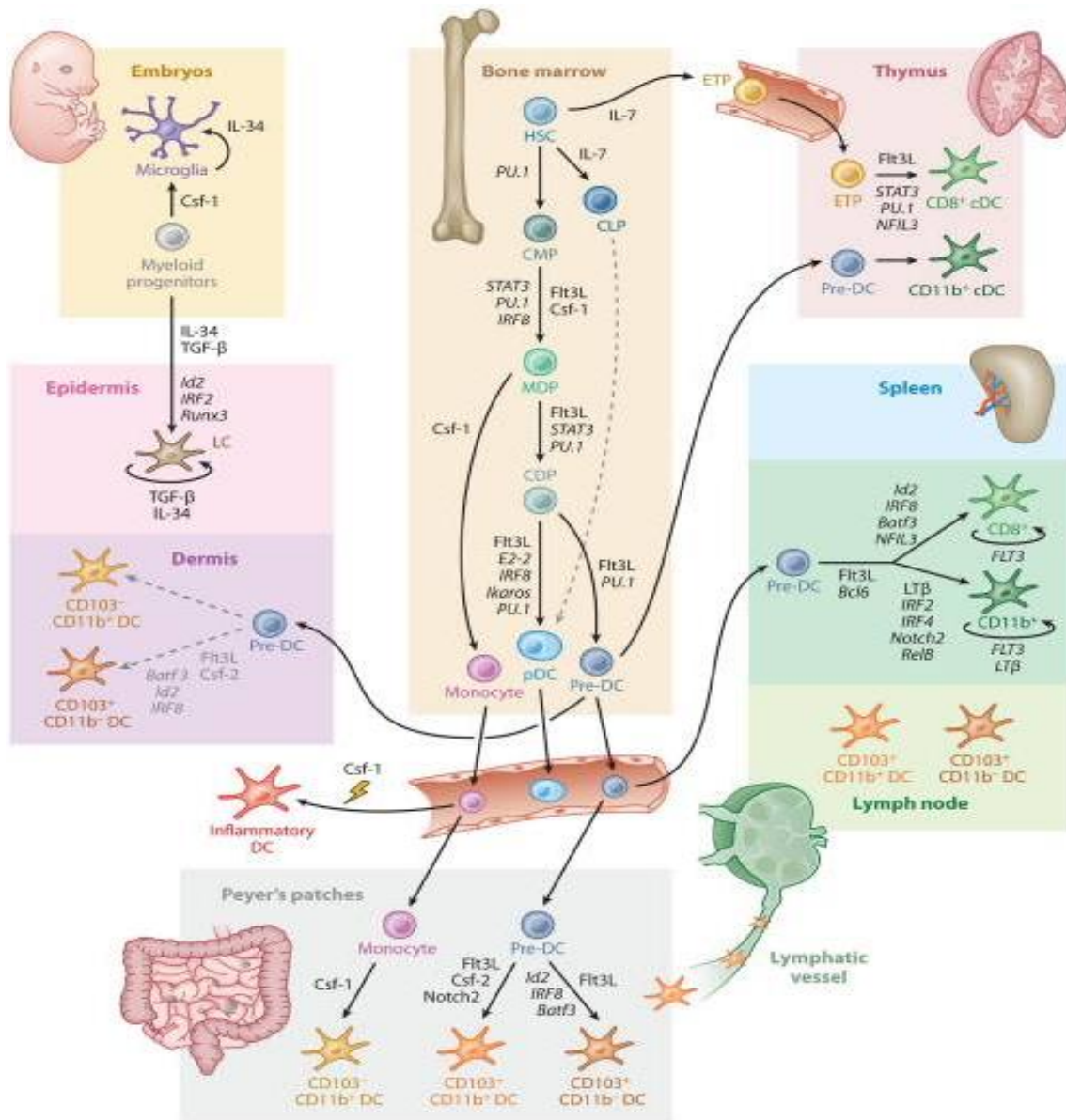


Figure 1 Origine et développement des sous-populations de cellules dendritiques [76]

1.3.2.3 Localisation et fonctions spécifiques des DCs pulmonaires

1.3.2.3.1 Les pDCs et les moDCs

Les pDCs résident dans le parenchyme pulmonaire et sont reconnues pour leur grande production d'interférons de type 1 (α/β), des cytokines importantes dans la réponse antivirale. [17] Les moDCs se retrouvent dans le parenchyme des bronches et des alvéoles. [10] Elles sont impliquées dans l'activation des lyT CD8 et sont essentielles dans la réactivation des lyT déjà présents au poumon. [18, 104]

1.3.2.3.2 Les cDCs

Les cDCs se divisent en deux populations soit les DC1 et les DC2. Les DC1 regroupent les DCs CD8 α ⁺ et les DCs CD103⁺ et les DC2 regroupent les DCs CD11b⁺ et les DCs CD11b⁻. [105, 106]

Les DC1 expriment spécifiquement le X-C motif chemokine receptor 1 (XCR1), un récepteur de chimiokines. [107-110] L'expression du CD8 α ou du CD103 est dépendante de la localisation des DC1. En effet, elles vont exprimer le CD8 α dans les organes lymphoïdes et le CD103 dans les organes non lymphoïdes.[111, 112]

Les DC2 expriment spécifiquement le Sirp α , un récepteur d'inhibition. [107] Les DC2 se retrouvent dans la plupart des organes et l'expression du CD11b est dépendante de facteurs de transcription. Les CD11b⁺ sont associées au facteur Notch2 alors que les CD11b⁻ sont associées au facteur *Kruppel-like factor 4* (Klf4). [89, 113, 114] Il existe dans l'intestin une population de DCs CD103⁺CD11b⁺ qui exprime Sirp α et qui est dépendante de l'expression d'IRF4 et de Notch2. [113]

Au poumon, on retrouve des DCs CD103⁺ et des DCs CD11b⁺ qui se situent dans l'épithélium des alvéoles et des bronches. [10, 115] Les DCs CD103⁺ représentent 40 à 60 % de la population totale de DCs pulmonaires alors que dans la majorité des tissus, ils sont présents en plus faible pourcentage (moins de 20 %). [83, 116, 117] Étant les DCs d'intérêts dans ce mémoire, les différents rôles, au poumon, des DCs CD103⁺ seront décrits en détail un peu plus loin. Les cDCs CD11b⁺ sont surtout impliquées dans l'activation des lyT. Elles induisent préférentiellement une réponse Th2 dans un modèle d'asthme et une réponse Th17 dans un modèle d'infection fongique. [79, 118]

1.3.2.3.2.1 Les DCs CD103⁺

Les cellules dendritiques CD103⁺ se retrouvent dans la majorité des organes non lymphoïdes et elles ont une très grande plasticité fonctionnelle. En effet, au poumon, elles sont reconnues pour avoir des fonctions régulatrices, mais également des fonctions inflammatoires

Les DCs CD103⁺ sont reconnues pour avoir des fonctions régulatrices puisqu'elles sécrètent très peu de cytokines à l'exception du CCL22 qui est impliqué dans le recrutement des Tregs. [119] Elles ont également la capacité de différencier les lyT naïfs en Tregs, et ce de façon dépendante au TGF- β et à l'acide rétinoïque. [83, 120].

Les DCs CD103⁺ ont la capacité de faire de la présentation croisée qui est impliquée dans plusieurs de leurs fonctions. La présentation croisée consiste à présenter des antigènes exogènes à l'aide du CMHI, alors qu'ils sont normalement présentés à l'aide du CMHII, et d'activer les lyT CD8. [121] À l'aide de la présentation croisée et de l'expression de récepteurs de corps apoptotiques, les DCs CD103⁺ participent à l'élimination des cellules apoptotiques. Le processus physiologique permettant d'éliminer les cellules en apoptose ce nomme efférocytose. L'efférocytose permet d'éviter que les cellules entrent en nécrose et libèrent leur contenu toxique dans l'environnement. [122, 123]

Les DCs CD103⁺ ont également des fonctions inflammatoires. En effet, l'activation des lyT CD8 par la présentation croisée est très importante dans l'immunité antivirale et anti-tumorale et, au poumon, les DCs CD103⁺ sont les spécialistes de cette présentation. [124-129] De plus, elles sécrètent une grande quantité d'IL-12, une cytokine essentielle dans l'activation des lyT. [130] Il a également été démontré qu'une absence des DCs CD103⁺ est associée à une infection virale plus sévère [17] et que les DCs CD103⁺ sont les plus efficaces pour transporter les antigènes tumoraux aux LN. [131, 132]

Le développement, la localisation et les fonctions des DCs CD103⁺ sont bien connus, toutefois l'expression du CD103 par ces DCs demeure très peu étudiée.

1.3.3 L'intégrine CD103

Les intégrines sont des protéines transmembranaires constituées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . [133] La partie extracellulaire de l'intégrine se lie aux molécules de la matrice extracellulaire ce qui permet aux cellules d'adhérer à leur environnement. [134-137] Lorsque l'intégrine est liée à son ligand, sa partie intracellulaire active des voies de signalisation qui contrôlent la migration, la différenciation et la survie des cellules. [138, 139]

Certaines intégrines, dont $\alpha L\beta 2$ (LFA-1), jouent aussi un rôle dans l'adhésion cellule-cellule. En effet, plusieurs intégrines sont essentielles au roulement des leucocytes sur les cellules endothéliales et à leur entrée dans le tissu enflammé.[140]

Le CD103 est l'intégrine αE (ITGAE) qui forme un complexe avec l'intégrine $\beta 7$. Le CD103 est exprimé par une sous-population de DCs [141-143] et par des lyT intra-épithéliaux CD4⁺, CD8⁺ et régulateurs. [144-147] Le seul ligand connu du CD103 est l'E-Cadhérine qui est exprimée sur la surface basolatérale des cellules épithéliales. [148]

1.3.3.1 Rôles connus du CD103

Le rôle du CD103 a été étudié dans des contextes plus généraux comme l'asthme où il joue un rôle dans la résolution de l'inflammation [149] et dans l'exposition au *Saccharopolyspora rectivirgula* où il joue un rôle dans le contrôle de l'initiation de la réponse inflammatoire. [150] Il a également été étudié de façon plus spécifique sur les lyT. La liaison du complexe $\alpha E\beta 7$ à l'E-Cadhérine permet l'adhésion des lyT à l'épithélium. De plus, le CD103 joue un rôle dans la morphologie et la motilité des lyT ainsi que dans la rétention des lyT dans les tissus. [146, 148, 151-154] Toutefois, pour les DCs, le CD103 est surtout utilisé comme marqueur de population et son rôle demeure très peu étudié. Dans ce mémoire, l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur les fonctions des DCs sera plus précisément étudié.

1.3.3.2 Modulation de l'expression du CD103

L'expression du CD103 est induite sur les DCs à l'intérieur des organes non-lymphoïdes puisque les pré-DCs n'expriment pas le CD103. [72] Il peut être induit par le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF), l'IL-3 et le TGF- β . [155-158] De plus, notre laboratoire a récemment observé que l'induction du CD103 peut être inhibée par le LPS et par le TNF. En effet, l'expression du CD103 peut être augmentée, *in vitro*, sur des DCs par le GM-CSF et la présence de LPS ou de TNF empêche cette augmentation (Figure 2a). Ainsi, l'expression du CD103 peut être modulée à la surface des DCs. Il a également été observé qu'à la suite d'une exposition au LPS *in vivo*, le nombre

de DCs CD103⁺ au poumon est diminué (Figure 2b). Toutefois, l'influence de la modulation du CD103 sur les fonctions des DCs demeure inconnue.

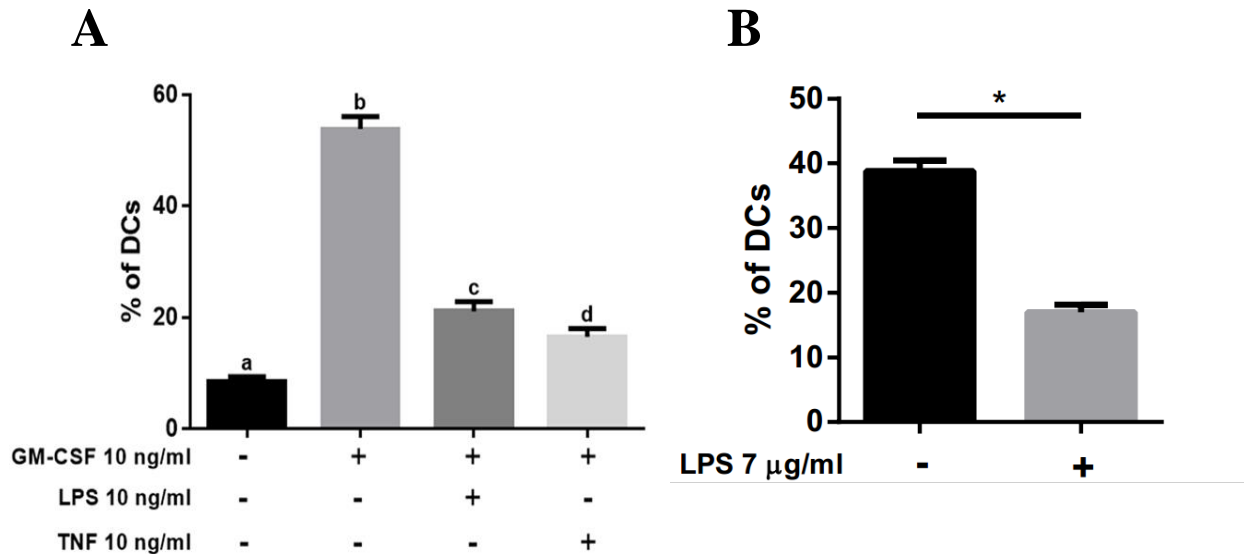


Figure 2 **Modulation de l'expression du CD103** A) Des DCs isolées de rates de souris ont été stimulées sous quatre conditions pour moduler l'expression du CD103 à leur surface. Elles ont été incubées 18 heures à 37°C en présence d'aucun réactif, de GM-CSF seul, de GM-CSF avec LPS ou de GM-CSF avec TNF à une concentration de 10ng/mL. B) Pourcentage de DCs CD103⁺ au poumon 18h après l'instillation de LPS 7µg/mL.

L'expression du CD103 peut être modulée à la surface des DCs par le LPS et le TNF, toutefois l'impact de cette modulation sur les fonctions des DCs demeure inconnu. Ainsi, l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur certaines fonctions des DCs en contexte d'inflammation au LPS sera étudié dans ce mémoire. Dans notre laboratoire, une seconde molécule d'intérêt est étudiée soit le CD34. Plusieurs rôles sont connus pour le CD34 dont une implication dans l'asthme allergique. Toutefois, l'impact direct de son expression sur les fonctions de cellules immunitaires comme les mastocytes et les éosinophiles demeure inconnu et sera étudié dans ce mémoire.

1.4 L'expression du CD34 sur les mastocytes et les éosinophiles dans l'asthme allergique

1.4.1 L'asthme allergique

L'asthme est une maladie chronique des voies respiratoires qui touche environ 300 millions de personnes dans le monde. Elle a un impact important sur la qualité de vie des patients et engendre de coûteuses dépenses à l'état en termes de traitement et d'hospitalisation. [159, 160] L'asthme est une maladie très hétérogène puisqu'il existe plusieurs phénotypes tels que l'asthme allergique, l'asthme non-allergique et l'asthme occupationnel, et plusieurs formes telles que l'asthme éosinophilique et l'asthme non-éosinophilique. De plus, il existe différents degrés de sévérité de la maladie soit intermittente, persistante légère, modérée et sévère. [161, 162] Plusieurs facteurs génétiques et environnementaux sont associés à l'asthme et ils peuvent être très différents d'un patient à l'autre, ce qui augmente davantage l'hétérogénéité de l'asthme. [163] À ce jour, le traitement de cette maladie demeure très compliqué puisque chaque type d'asthme demande des spécificités de traitement et que certains types comme l'asthme sévère sont très difficiles à traiter. [164] De plus, présentement, différentes composantes de l'asthme, soit l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique (HRB) sont traitées séparément par différents médicaments. [165, 166] L'étude de nouveaux mécanismes impliqués dans les différentes composantes de l'asthme pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques ciblant toutes les composantes de l'asthme.

Dans ce mémoire, l'asthme allergique sera abordé. Ce type d'asthme est déclenché par l'exposition à un allergène et il est caractérisé, de façon générale, par trois composantes: une inflammation chronique principalement de type Th2, un remodelage des voies respiratoires et une HRB. [164-166]

1.4.1.1 Inflammation

L'asthme allergique est causé par une exposition à un allergène pour lequel une réaction immunitaire est développée. [161] Lors de l'exposition initiale à l'allergène, les DCs

présentes au poumon captent celui-ci et migrent au LN afin d'activer lyT CD4+. Les lyT CD4+ activés se différencient en Th2 et sécrètent de l'IL-4 qui permet d'activer les lyB à produire des IgE spécifiques pour l'ag. Les IgE ainsi formés se retrouvent au poumon et se lient aux mastocytes, ce qui les sensibilise à l'allergène. [36, 167] Lors des expositions subséquentes au même allergène, les IgE liés aux mastocytes captent l'allergène, ce qui active la dégranulation des mastocytes. Plusieurs médiateurs inflammatoires tels que l'histamine et la tryptase sont alors libérés dans l'environnement pulmonaire. Ces médiateurs induisent la contraction du muscle lisse des bronches (bronchoconstriction), activent les fibroblastes et altèrent les cellules endothéliales. [19] De plus, les mastocytes sécrètent des cytokines qui recrutent d'autres cellules inflammatoires au poumon. [37] Ensuite, une réponse immunitaire tardive est initiée. Les Th2 sécrètent de l'IL-5 qui entraîne un recrutement d'éosinophiles, et de l'IL-9, qui augmente le nombre de mastocytes au poumon. [36, 37] Les éosinophiles arrivent au poumon et y sont activés par les nombreux médiateurs inflammatoires produits par les mastocytes, les Th2 et les autres cellules immunitaires. Les éosinophiles activés libèrent des cytokines, comme l'IL-4 et l'IL-13, qui activent davantage la réponse immunitaire. [19, 29, 30] De plus, les granules des éosinophiles contiennent des protéines cationiques et des enzymes qui altèrent l'épithélium et activent les mastocytes. [168, 169] Tous ces éléments contribuent à l'installation d'une inflammation chronique et au remodelage des voies respiratoires et sont représentés à la Figure 1.

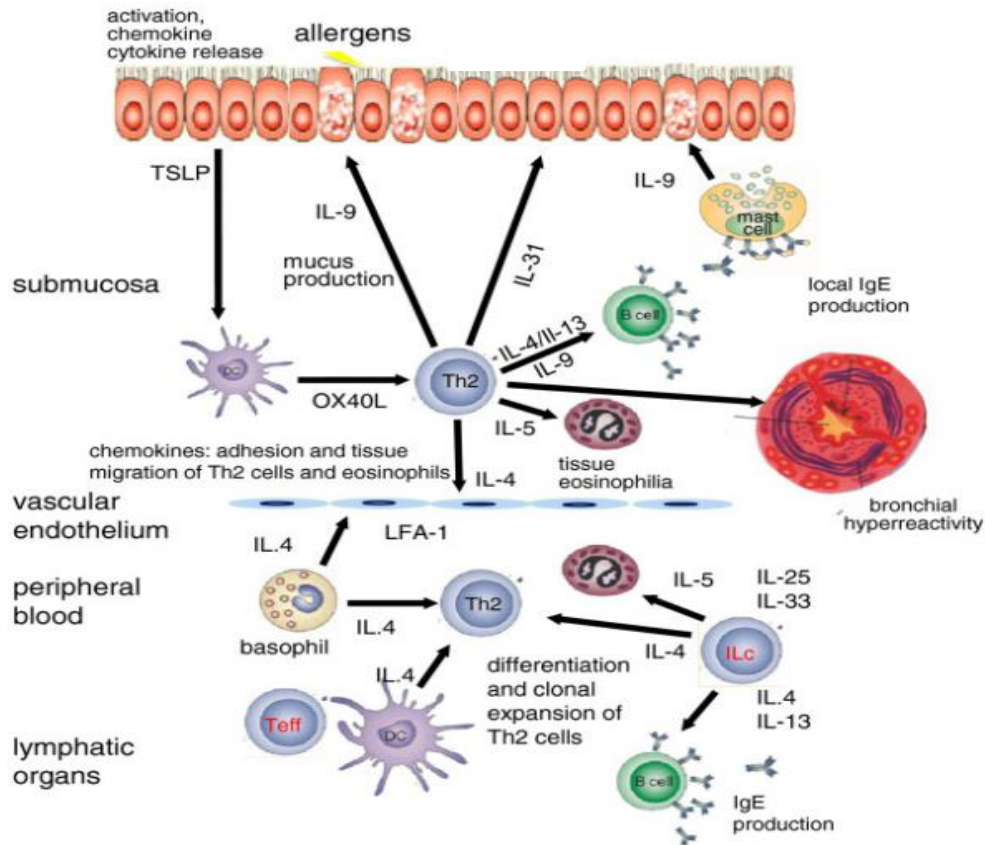


Figure 3 Schéma des cellules impliquées dans l'asthme allergique [170]

1.4.1.2 Remodelage pulmonaire

L'asthme entraîne des changements structuraux importants au niveau du système respiratoire qui contribue à la diminution des fonctions respiratoires observée chez les patients et à l'inflammation chronique, par l'augmentation de la production de médiateurs inflammatoires. Ce remodelage est caractérisé par une altération de l'épithélium, une fibrose sous-épithéliale, une angiogenèse vasculaire et une augmentation du muscle lisse. [171]

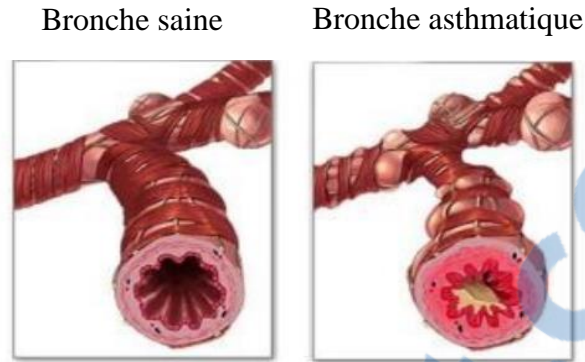


Figure 4 **Représentation d'une bronche asthmatique [170]**

L'altération de l'épithélium se manifeste par une diminution, voire une perte de l'épithélium bronchique, la perte de cellules ciliées, l'hyperplasie des cellules à gobelets et la surproduction de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines initiant le recrutement de cellules inflammatoires. [171] L'hyperplasie des cellules à gobelets mène, quant à elle, à la surproduction de mucus qui contribue à l'obstruction de la lumière des voies respiratoires. [172-174]

La fibrose sous-épithéliale est causée par une déposition accrue de protéines de la matrice extracellulaire incluant les collagènes de type I, III et IV; la fibronectine; la tenascine; le lumican et le biglycan. [171] Ces protéines sont produites par les fibroblastes activés par la tryptase et des cytokines fibrogènes sécrétées par les mastocytes. [175] L'accumulation de matrice extracellulaire modifie la structure et altère les propriétés mécaniques des bronches et du poumon. [176]

La surproduction de facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), par l'épithélium endommagé et les cellules inflammatoires entraîne une angiogenèse vasculaire. En plus d'une augmentation anormale du nombre et de la taille des micro-vaisseaux, une dilatation des vaisseaux qui favorise l'entrée de cellules inflammatoires et de cytokines au poumon est également observée. [171, 176, 177] La surproduction de facteurs de croissance entraîne également une plus grande prolifération des cellules musculaires lisses, ce qui cause une augmentation de la masse musculaire lisse. [171, 176]

1.4.1.3 L'Hyperréactivité du système respiratoire

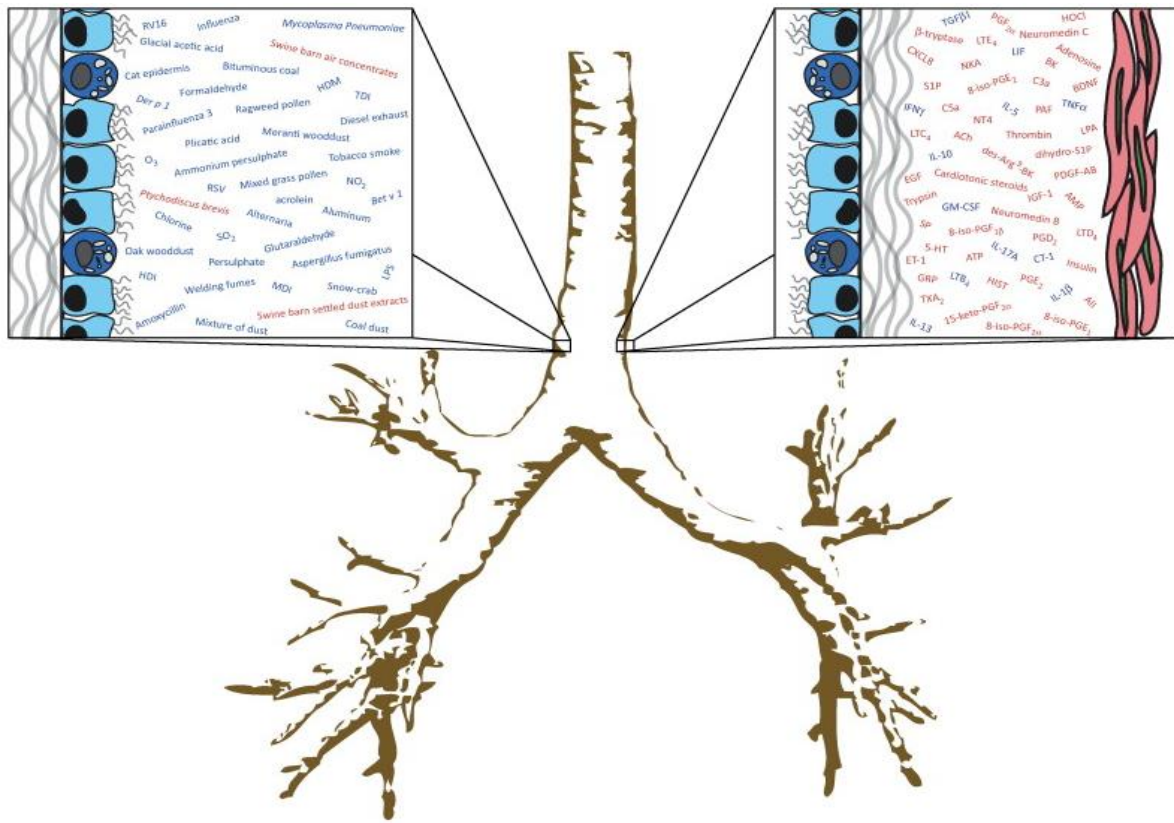
L'HRB se définit comme une diminution excessive des fonctions respiratoires en réponse à un large spectre de stimuli. [178, 179] Chez un asthmatique, l'HRB se traduit par une réponse exagérée du système respiratoire pour une même dose de stimulus, telle la méthacholine, comparativement à un sujet sain. La sensibilité est également accrue, c'est-à-dire que les sujets asthmatiques vont générer une réponse à de plus faibles doses que les sujets sains. [180-182]

Plusieurs théories tentent d'expliquer l'HRB, incluant l'altération des propriétés contractiles du muscle lisse. [183, 184] La force du muscle lisse, ainsi que d'autres propriétés du muscle lisse telles que sa vélocité de contraction, son raccourcissement maximal, sa rigidité ainsi que sa capacité à tolérer et récupérer des oscillations de longueur, peuvent participer à l'HRB. [182, 185, 186] L'HRB a longtemps été expliqué par l'altération du muscle lisse et sa contraction excessive (bronchoconstriction), [185] cependant la littérature considère désormais la participation d'éléments non-contractiles tels que l'inflammation chronique. [187, 188] Ainsi, les trois composantes majeures de l'asthme allergique (HRB, remodelage et inflammation) sont interreliées entre elles et participent de ce fait au développement de l'HRB. [189]

1.4.1.3.1 Les médiateurs dans l'HRB

Plusieurs spasmogènes inflammatoires sont surexprimés dans l'asthme allergique (Figure 3, carré de droite, molécules en rouge) et influencent l'HRB. [187] Les plus étudiés sont l'histamine, les leucotriènes (LT), l'endothéline-1, la composante du complément C5a, la bradykinine, la prostaglandine (PG) D₂ et le thromboxane A₂. Ces médiateurs contribuent au développement de l'HRB en induisant la contraction du muscle lisse. Plusieurs médiateurs ont un effet synergique sur l'induction de la contraction. [187] De plus, ces spasmogènes induisent, également un phénomène appelé *force adaptation*. La *Force adaptation* consiste en un gain de force du muscle lisse lorsque celui-ci est longuement exposé aux spasmogènes. [187] D'autres médiateurs, comme des cytokines présentes dans l'asthme allergique, influencent l'HRB en n'induisant pas directement la contraction du muscle lisse, mais en augmentant l'efficacité des spasmogènes (Figure 3, carré de droite, molécules en bleue). Par

exemple, le TNF augmente l'effet contractile de l'histamine, du LTD₄, de la bradykinine, de la sérotonine et du thromboxane A₂. [187]



TRENDS in Molecular Medicine

Figure 5 Médiateurs surexprimés dans l'asthme allergique impliqués dans l'HBR [187]

1.4.1.4 Les modèles animaux pour l'étude de l'asthme

La souris est l'animal le plus utilisé dans l'étude de l'asthme puisque son système immunitaire est semblable à celui de l'être humain et que plusieurs variétés de souris modifiées génétiquement sont disponibles. [190, 191] Les BALB/c et les C57BL/6j sont les deux espèces de souris les plus souvent utilisées. Les deux espèces développent une réponse de type Th2, toutefois, les BALB/c sont plus sensibles au développement d'une HRB. Dans ce mémoire, les C57BL/6j ont été utilisées puisque les souris déficientes pour le gène *Cd34* (*Cd34^{-/-}*) disponibles au laboratoire ont été faites sur fond de C57BL/6j. [190, 192, 193]

Différents types d'allergènes peuvent être utilisés pour le développement de l'asthme chez la souris. L'ovalbumine (OVA), une protéine dérivée des œufs de poules, est un bon



allergène puisqu'elle induit une inflammation accrue et une hyperréactivité. Toutefois, l'OVA est rarement impliquée dans l'asthme chez l'humain. Un second inconvénient à l'utilisation de l'OVA est que la réponse allergique à celui-ci nécessite une période de sensibilisation systémique en présence d'un adjuvant (hydroxyde d'aluminium) ce qui n'est pas représentatif de la sensibilisation locale qui a lieu chez l'humain. [190, 194]

Un second allergène couramment utilisé est l'extrait d'acariens (*House Dust Mite* : HDM). On retrouve les acariens un peu partout comme dans les lits et les tapis et il une étude démontre qu'ils sont impliqués dans le développement de l'HRB de certains patients asthmatiques. [194] Cet allergène possède aussi une activité protéolytique intrinsèque le rendant plus efficace pour engendrer une réponse allergénique que l'OVA. [194] En effet, l'HDM contient des protéases qui dégradent l'épithélium des voies respiratoires et ainsi facilitent son entrée dans les tissus. [195] En plus d'induire une inflammation persistante et une hyperréactivité, une période d'exposition de 5 à 7 semaines d'HDM occasionne un remodelage des voies respiratoires, une augmentation du recrutement des éosinophiles et le développement d'une réponse de type Th2. [194]

Plusieurs cellules sont impliquées dans la composante inflammatoire de l'asthme allergique. Dans ce mémoire, deux de ces cellules seront étudiées plus en profondeur soit les mastocytes et les éosinophiles.

1.4.2 Les mastocytes

Identifiés pour la première fois en 1878 par Paul Ehrlich, [196] les mastocytes sont des cellules immunitaires impliqués dans l'homéostasie tissulaire, la défense de l'hôte contre les pathogènes, la cicatrisation, mais également dans la pathologie de l'asthme, des maladies d'hypersensibilité et des mastocytoses. [19] Ils se retrouvent dans la majorité des tissus, plus particulièrement, en association avec les vaisseaux sanguins et l'épithélium. [12, 19] Ils contiennent des granules et expriment le CD117 ou cKIT, le récepteur du *stem cell factor* (SCF), le FcεRI, un récepteur de l'IgE et le CD34. [19]

1.4.2.1 Développement des mastocytes

Les mastocytes dérivent de la moelle osseuse de progéniteurs multipotents (MPPs) qui se différencient en CMPs qui, à leur tour, se différencient en progéniteurs de granulocyte/monocyte (GMPs). Finalement, les GMPs donnent naissance aux progéniteurs de mastocytes immatures (MCps). [197-200] Les MCps, qui n'expriment pas le FcεRI et qui contiennent peu ou pas de granules [198, 201] entre en circulation dans le sang, puis mûrissent en mastocytes une fois à l'intérieur des tissus. Ce développement est dépendant des facteurs de transcriptions PU.1 [202] et *Signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) [203] et du facteur de croissance SCF. [204, 205] Une fois matures, les mastocytes ont une longue durée de vie. Ainsi, ils ne doivent pas être continuellement remplacés par des nouveaux progéniteurs comme les DCs. De plus, l'augmentation du nombre des mastocytes dans un tissu lors de l'inflammation n'est pas due à une grande migration de nouveaux MCps, mais plutôt à la division à l'intérieur du tissu d'une petite quantité de nouveaux MCps.[199]

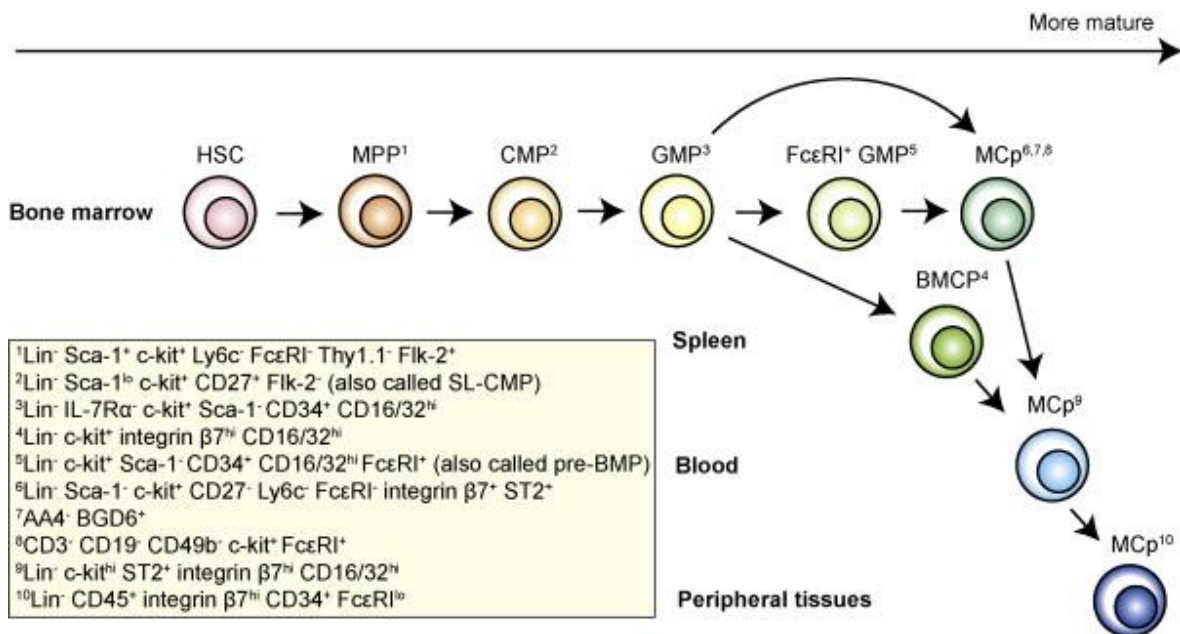


Figure 6 Origine et développement des mastocytes [201]

1.4.2.2 Activation des mastocytes

Les mastocytes sont majoritairement activés par la liaison d'IgE, liés à un ag, à leurs récepteurs FcεRI. Ils peuvent également être activés par des molécules du complément, des

IgG et des molécules liant des récepteurs de type Toll. [206, 207] Une fois activés, les mastocytes sécrètent trois types de médiateurs, soit des médiateurs déjà préformés retrouvés dans leurs granules, des médiateurs lipidiques nouvellement formés et des cytokines. [19]

Les médiateurs préformés incluent l'histamine, des sérines protéases, la carboxypeptidase A et des protéoglycanes. À la suite de la fusion des granules avec la membrane plasmique des mastocytes, ces médiateurs sont relâchés dans l'environnement. L'histamine est un médiateur chimique qui, selon les récepteurs qu'elle active, induit une contraction des bronches, une vasodilatation ou une sécrétion de mucus. [208] La tryptase est une sérine protéase exclusivement retrouvée dans les granules des mastocytes. Elle favorise l'accumulation de cellules inflammatoires en induisant la sécrétion d'IL-8, un chimioattractant, et en augmentant l'expression ICAM-1 sur les cellules épithéliales. [209] Elle stimule également la synthèse de collagène par les fibroblastes. [175]

À la suite de l'activation des mastocytes, plusieurs médiateurs lipidiques sont rapidement synthétisés à partir de l'acide arachidonique, dont la PGD₂, différentes LT tels que LTB₄ et LTC₄ ainsi que des leucotriènes cystéinés (CysLT). Les CysLT et PGD₂ ont aussi un effet bronchoconstricteur sur le muscle lisse et recrutent les éosinophiles et les basophiles. [19]

Les cytokines sécrétées par les mastocytes sont entre autres le TNF- α , l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13, l'IL-16, Il-6 et le GM-CSF. [19] Ces cytokines permettent l'activation des leucocytes au site inflammatoire. [12] Le TNF- α , Il-4 et Il-13 augment l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. [22] L'IL-5, l'IL-16 et le GM-CSF favorisent la migration de cellules immunitaires au site d'inflammation. Finalement, l'IL-4 sécrété par les mastocytes est impliqué dans l'induction des Th2 et la production d'IgE par les lyB. [12]

1.4.2.3 Rôles des mastocytes dans l'asthme

Les mastocytes sont grandement impliqués dans la pathologie de l'asthme. Ils contribuent aux trois grandes caractéristiques de la maladie soit l'inflammation chronique, le remodelage et l'HRB. Leur implication dans l'inflammation consiste à sécréter des cytokines

et des médiateurs lipidiques qui recrutent des cellules immunitaires au poumon, dont les éosinophiles qui sont des joueurs majeurs dans la pathologie de l'asthme. [12, 19] Ils sécrètent également de l'IL-4 qui augmente la réponse Th2 induite par l'inhalation d'allergènes. [12] Une infiltration de mastocytes dans l'épithélium bronchique et dans le muscle lisse des voies respiratoires est observée dans l'asthme. [210] Dans l'épithélium, les mastocytes jouent un rôle dans l'hyperplasie des cellules à gobelets puisque certains de leurs médiateurs, comme l'histamine, induisent la sécrétion de mucus. [211] Au niveau du muscle lisse, les mastocytes jouent différents rôles. Plusieurs médiateurs sécrétés par les mastocytes ont un effet bronchoconstricteur. [19] La tryptase induit la sécrétion de TGF β par le muscle lisse ce qui recrute d'autres mastocytes au muscle lisse. [212] La chymase, un autre médiateur retrouvé dans les granules des mastocytes, dégrade la matrice extracellulaire du muscle lisse. [213] Les mastocytes sont également impliqués dans l'activation des fibroblastes qui cause une déposition accrue de protéines de la matrice extracellulaire. [171, 175] Ces différentes fonctions des mastocytes dans l'asthme induisent le remodelage des voies respiratoires et l'HRB.

1.4.3 Les éosinophiles

Peu de temps après la découverte des mastocytes, le chercheur Paul Ehrlich a également fait la découverte des éosinophiles. [214] Les éosinophiles sont des cellules immunitaires reconnues pour leur implication dans l'immunité contre les parasites, l'homéostasie tissulaire et dans l'asthme. Ils se retrouvent principalement au niveau des muqueuses, en particulier celle du système digestif, et dans quelques organes lymphoïdes. [28] Les éosinophiles n'expriment pas de marqueurs spécifiques, mais la combinaison de différents marqueurs permet de les identifier en cytométrie. Par exemple, les éosinophiles expriment le récepteur de l'IL-5, le CCR3, le Siglec-8(humain)/Siglec-F(souris) et le CD34. Ils peuvent également être identifiés par des traits morphologiques distinctifs tels que la présence d'un noyau bilobé et des granules qui prennent une couleur rosée à la suite d'une coloration à l'éosine. [215]

1.4.3.1 Développement des éosinophiles

Tout comme les mastocytes, les éosinophiles dérivent des CMPs de la moelle osseuse. Les CMPs se différencient en progéniteurs d'éosinophiles (EoP) qui, à leur tour, se différencient en éosinophiles matures. [215] Le développement des éosinophiles est dépendant des facteurs de transcriptions suivant: *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP), [216] GATA-1 [217] et PU.1 [218] et des cytokines IL-5, IL-3 et GM-CSF. [19] Un réservoir d'éosinophiles matures se forme à l'intérieur de la moelle osseuse, contrairement aux mastocytes qui sont seulement matures une fois aux tissus, et les éosinophiles sont relâchés dans la circulation sanguine à la suite d'une activation. [219]

1.4.3.2 Activation d'éosinophiles

Les éosinophiles n'ont pas de voie d'activation majeure comme les mastocytes. Ils peuvent être activés par des IgG, des IgA, des chimiokines de type CC, des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP), le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et certaines cytokines comme l'IL-5, l'IL-3 et le GM-CSF. [19] Une fois activés, les éosinophiles peuvent sécréter trois types de médiateurs soit des protéines cationiques et des cytokines préformées dans les granules et des lipides nouvellement synthétisés. [220, 221] Les protéines cationiques majeures sont la protéine basique majeure (MBP), [222] la protéine cationique de l'éosinophile (ECP), [223] la peroxydase de l'éosinophile (EPO) [224, 225] et la neurotoxine dérivée de l'éosinophile (EDN). [226, 227] La MBP est la protéine la plus abondante des granules. Elle joue un rôle dans l'immunité antiparasitaire et dans l'asthme.[19, 222] L'EDN et l'ECP dégradent l'ARN et présentent une toxicité pour les parasites. [19, 223, 226, 227] L'EPO oxyde des halogénures afin de produire des dérivés réactifs de l'oxygène bactéricides. [19, 224, 225]

Les éosinophiles contiennent plusieurs cytokines dans leurs granules dont l'IL-4, l'IL-3 l'IL-5, l'IL-13, et le TNF- α . L'IL-5 et l'IL-3 activent les autres éosinophiles présents au site inflammatoire et l'IL-4 et l'IL-13 participent à l'induction de Th2. [19]

Les lipides produits par les éosinophiles sont, entre autres, le LTC₄, la PGE₂, le thromboxane et le PAF. Plusieurs lipides sécrétés par les éosinophiles induisent une bronchoconstriction. [19]

1.4.3.3 Rôles des éosinophiles dans l'asthme

Les éosinophiles, tout comme les mastocytes, sont des joueurs majeurs dans le développement de l'asthme. Ils sont très importants dans le maintien de l'inflammation puisqu'ils sécrètent des cytokines qui activent les différentes cellules inflammatoires présentes au poumon. [19, 29, 30] De plus, ils jouent un rôle majeur dans le développement de la réponse Th2 caractéristique de l'asthme. En effet, les éosinophiles sécrètent des cytokines immunomodulatrices de type Th2, interagissent avec les DCs immatures, inhibent le développement des Th1 et possèdent des capacités pour présenter les ag. [28] Les éosinophiles sont également impliqués dans le remodelage des voies respiratoires puisqu'ils sécrètent plusieurs lipides qui induisent une bronchoconstriction et des protéines cationiques qui altèrent l'épithélium. [168, 169] Les éosinophiles favorisent la prolifération des cellules du muscle lisse [228] et sécrètent des cytokines fibrogènes. [229]

Les mastocytes et les éosinophiles expriment le CD34 et sont impliqués dans l'asthme allergique où ils augmentent l'inflammation et induisent la contraction du muscle lisse et le remodelage de voies respiratoires. L'impact du CD34 sur ces fonctions demeure inconnu et sera étudié dans ce mémoire.

1.4.4 Le CD34

Les sialomucines sont des protéines transmembranaires et sont fortement glycosylées. Leur principale fonction connue est d'agir en tant que molécule d'adhésion. Elles sont divisées en différentes familles dont les membres ont des caractéristiques similaires. [230] Le CD34 possède une partie extracellulaire hautement glycosylée et sialylée ce qui lui confère une charge négative. Malgré une partie intracellulaire, aucun ligand ni signalisation intracellulaire ne sont encore connus pour le CD34. [230] Il est principalement reconnu pour

être un marqueur des cellules souches hématopoïétiques, toutefois, il est également retrouvé chez les cellules vasculaires endothéliales et sur les cellules mésenchymateuses et stromales. [231] De plus, le CD34 a été observé chez les cellules satellites ainsi que chez une population de progéniteurs fibroadipogéniques retrouvés dans le muscle. [232] Finalement, il est aussi retrouvé à la surface de plusieurs cellules matures dont les mastocytes [233], les éosinophiles [234], les cellules de la microglie [235] et les DCs. [236, 237] L'expression du CD34 est réversible et dépendante du statut d'activation des cellules. [238]

1.4.4.1 Rôles connus du CD34

Plusieurs fonctions sont connues pour le CD34. Elles sont différentes selon le type cellulaire qui l'exprime et elles peuvent être contradictoires. Il est impliqué dans la prolifération et la différenciation cellulaire, dans l'adhésion, le trafic cellulaire et dans certaines pathologies inflammatoires.

1.4.4.1.1 Prolifération des cellules hématopoïétiques

Le CD34 est impliqué dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. En effet, chez des souris *Cd34^{-/-}*, les précurseurs de cellules hématopoïétiques prolifèrent moins bien que celles des souris sauvages (*wild type* (WT)). De plus, le phénotype peut être renversé par la transfection de *Cd34* pleine longueur, ce qui confirme son rôle dans le phénomène.[236]

1.4.4.1.2 Inhibition de la différenciation de cellules hématopoïétiques

Lorsque le rôle du CD34 a été étudié sur une lignée cellulaire de myoblastes M1, on lui a plutôt trouvé un rôle d'inhibition de la différenciation. Les myoblastes se différencient en macrophages à la suite d'une exposition à certaines cytokines telles que l'IL-6 ou LIF. Par contre, leur différenciation en macrophages est inhibée suivant l'ajout de CD34 ectopique. [239] Cette fonction est toutefois mitigée puisqu'elle n'a été observée que chez cette lignée cellulaire et en contexte plus ou moins « naturel » (ajout de CD34 ectopique).

1.4.4.1.3 Molécule d'adhésion sur les *high endothelial veinules* (HEV)

Le CD34 favorise l'adhésion des lymphocytes sur l'endothélium vasculaire dans les tissus lymphoïdes. En effet, le CD34 exprimé par les HEV contient, via une modification post-transcriptionnelle, une structure de glycan nommé Sialyl Lewis X qui est le ligand de la L-sélectine exprimée par les lymphocytes. Ainsi, en contenant le Sialyl Lewis X, le CD34 permet l'adhésion des lymphocytes aux HEV. [230, 231]

1.4.4.1.4 Inhibition des adhésions non-spécifiques

Lorsque le CD34 n'est pas modifié par le Sialyl Lewis X, il inhibe les adhésions non spécifiques. En fait, la charge négative de la partie extracellulaire du CD34 empêche, par répulsion, que deux cellules qui expriment le CD34 se collent ensemble. [240] Cette fonction a été démontrée chez des mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris *Cd34^{-/-}* qui, *in vitro*, ont tendance à former des amas. [241, 242] De plus, l'expression du CD34 à la surface de l'endothélium vasculaire permet de diminuer les adhésions non-spécifiques avec les cellules hématopoïétiques circulantes. [240]

1.4.4.1.5 Trafic cellulaire

L'importance du CD34 dans le trafic cellulaire a été démontrée chez plusieurs types cellulaires. Tout d'abord, une absence du CD34 perturbe le potentiel de migration des progéniteurs hématopoïétiques. [243] Ensuite, une diminution du nombre de mastocytes et d'éosinophiles recrutés au poumon en contexte d'asthme est observée chez les souris *Cd34^{-/-}*. [244] Une absence du CD34 entraîne aussi une altération de la migration des DCs au LN en contexte d'alvéolite allergique extrinsèque (AAE). [237] Finalement, le CD34 semble important dans la migration des cellules satellites au muscle. [232]

1.4.4.1.6 Pathologie inflammatoire

Le CD34 semble jouer un rôle dans certaines pathologies inflammatoires. En effet, il semble avoir un rôle protecteur dans l'asthme et l'AAE en affectant la migration des cellules alors que dans l'arthrite, il exacerbe plutôt l'inflammation en augmentant la perméabilité vasculaire. [245]

1.4.4.2 Implication du CD34 dans l'asthme allergique

Dans l'asthme, le CD34 est impliqué au niveau inflammatoire puisqu'une diminution du nombre de mastocytes et d'éosinophiles recrutés au poumon en contexte d'asthme est observée chez les souris *Cd34^{-/-}*. L'impact de l'expression du CD34 sur la migration des éosinophiles dans l'asthme est bien étudié. En effet, différentes méthodes ont été utilisées afin de déterminer le nombre d'éosinophiles au poumon chez les souris *Cd34^{-/-}* exposées à un allergène et il a été démontré que les éosinophiles demeurent dans le sang de ces souris. [244] Toutefois, une seule méthode a été utilisée pour déterminer le nombre de mastocytes au poumon chez les souris *Cd34^{-/-}*, ainsi, l'impact de l'expression du CD34 sur la migration des mastocytes demande d'avantages d'analyse. Le CD34 semble également important dans le développement de l'HRB. En effet, une perte de la réactivité du système respiratoire en réponse à la méthacholine suivant une exposition à l'OVA a été observée chez les souris *Cd34^{-/-}* (comparativement aux souris *Cd34^{-/-}* naïves) (Figure 6a). [244] Une seconde étude démontre que la perte de réactivité est également observée suivant une exposition au HDM (Figure 6b). [246]

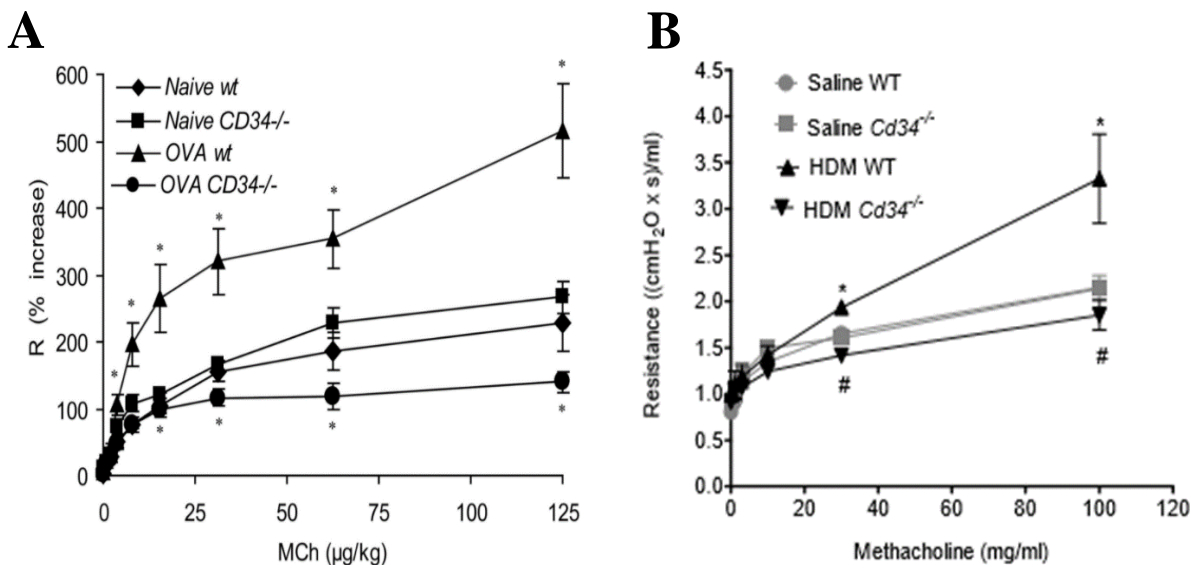


Figure 7 Réactivité du système respiratoire à des doses croissantes de méthacholine, chez des souris WT et *Cd34^{-/-}* ayant développé l'asthme allergique expérimental A) à l'ovalbumine et B) à l'HDM [244, 246].

Une première hypothèse a été étudiée afin d'expliquer cette perte de réactivité soit le muscle lisse. En effet, l'hyperréactivité du système respiratoire est majoritairement causée par la contraction excessive du muscle lisse [185] et le CD34 est exprimé par les progéniteurs de celui-ci. [232] Ainsi, l'implication du CD34 dans la formation et le remodelage du muscle lisse pourrait affecter sa contraction. Toutefois, aucune différence de contraction n'a été observée entre des trachées de souris WT et *Cd34^{-/-}* (Figure 6). [246] Ainsi, les mécanismes derrière la perte de réactivité du système respiratoire en absence de CD34 comparativement aux souris WT exposées à un allergène, voire même aux souris *Cd34^{-/-}* naïves, demeurent inexpliqués.

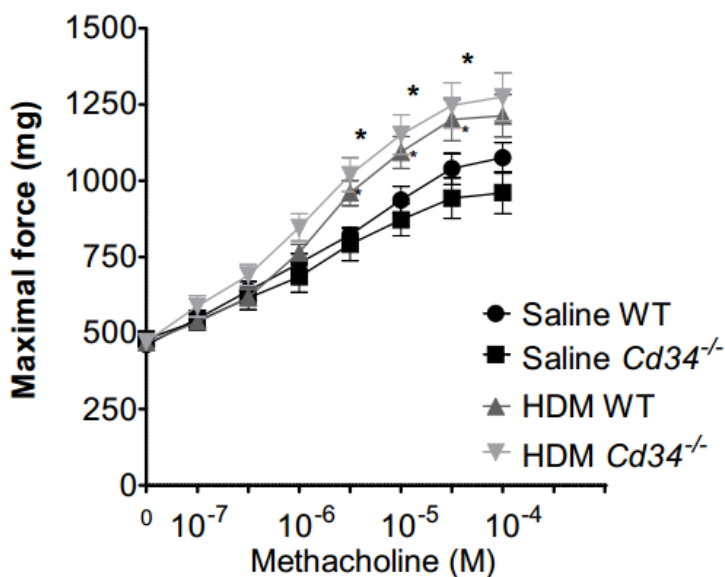


Figure 8 **Capacité de contraction de trachées WT et *Cd34^{-/-}* exposées ou non au HDM en réponse à des doses croissantes de méthacholine.** [246]

Dans ce mémoire, l'impact du CD34 dans la composante inflammatoire de l'asthme allergique sera approfondi afin d'expliquer cette perte de réactivité. En effet, le CD34 est exprimé par les mastocytes et les éosinophiles, deux cellules centrales dans le développement de l'asthme allergique et impliquées dans le développement de l'HRB. Plus précisément, l'impact du CD34 sur les fonctions des mastocytes et des éosinophiles en contexte d'asthme allergique sera étudié.

Chapitre II: Problématiques, hypothèses et objectifs

Le maintien de l'homéostasie pulmonaire est influencé par une très grande quantité de cellules dont certaines résident au poumon, comme les DCs et les mastocytes, et d'autres y migrent en contexte inflammatoire, comme les éosinophiles. Chacune de ces cellules exprime à sa surface plusieurs molécules qui sont essentielles aux différentes fonctions des cellules. La plupart de ces molécules exercent plusieurs fonctions distinctes pour une même cellule et, parfois, différentes fonctions selon le type de cellules qui l'exprime ou le contexte inflammatoire. De plus, l'inflammation peut moduler l'expression de certaines de ces molécules et cette modulation peut influencer les fonctions de la cellule. Toutefois pour certaines molécules de surface, leurs fonctions ne sont pas toutes connues, comme pour le CD103 et le CD34.

Le CD103 est exprimé par une population de DCs qui est grandement impliquée dans l'inflammation pulmonaire en y jouant plusieurs rôles distincts. En effet, selon l'environnement inflammatoire, les DCs CD103⁺ peuvent avoir des fonctions régulatrices ou inflammatoires. [119, 120, 122-132] Toutefois, pour les DCs, le CD103 est surtout utilisé comme marqueur de population et son influence sur leurs fonctions demeure inconnue. De plus, il a récemment été démontré que l'expression du CD103 pouvait être modulée à la surface des DCs (Figure 4). Toutefois, les populations de DCs sur lesquelles le CD103 est modulé ainsi que l'impact de cette modulation sur les fonctions des DCs et sur la réponse immunitaire demeurent inconnus.

Le CD34 est une molécule exprimée à la surface des éosinophiles et des mastocytes, des cellules inflammatoires impliquées dans l'asthme. En plus d'être impliqué dans l'adhésion [240-242] et le trafic cellulaire de ces cellules [232, 237, 243, 244], le CD34 est impliqué dans la réactivité du système respiratoire en contexte d'asthme allergique expérimental. En effet, une perte de réactivité du système respiratoire est observée chez les souris *Cd34*^{-/-} exposées à un allergène comparativement aux souris WT et *Cd34*^{-/-} naïves (Figure 6). [244, 246] Toutefois, cette perte de réactivité n'est pas causée par un défaut

intrinsèque du muscle lisse en absence du CD34 (Figure 7). [246] L'inflammation est une composante importante de l'asthme et peut être impliquée dans l'HRB. [181, 187, 188] Notamment, les mastocytes et les éosinophiles recrutés au poumon sécrètent des spasmogènes qui induisent une contraction du muscle lisse et participent au remodelage des voies respiratoires. [19, 168, 169] Le CD34 est exprimé par ces cellules et influence l'inflammation dans l'asthme en affectant leur migration. [244] Toutefois, l'impact du CD34 sur la migration des mastocytes est très peu étudié. De plus, l'impact du CD34 sur la fonction de dégranulation des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme reste inconnu.

L'hypothèse générale de ce mémoire est que l'expression et la modulation de deux molécules de surface, le CD103 et le CD34, affectent les fonctions de cellules qui l'expriment dans le contexte de l'immunité pulmonaire.

Objectif A: Depuis la découverte de la modulation de l'expression du CD103 à la surface des DCs, nous pensons que cette modulation pourrait expliquer la grande plasticité fonctionnelle des DCs CD103⁺. Ainsi, l'hypothèse spécifique de cette étude est que la modulation de l'expression du CD103 s'effectue spécifiquement sur les DC1 et affecte leur migration et leur capacité d'adhésion. L'objectif principal est de déterminer l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur certaines fonctions des DC1 dans l'immunité innée. Les sous-objectifs sont :

1. Vérifier que le GM-CSF, le LPS et le TNF modulent l'expression du CD103 sur les DC1 et non sur les DC2.
2. Vérifier si la modulation de l'expression du CD103 affecte les principales fonctions des DCs, soit l'activation des lyT, la migration aux LN et l'adhésion à l'épithélium.

Objectif B: L'HRB est influencé par la fonction du muscle lisse, sa structure ainsi que l'inflammation pulmonaire. [189] Puisque très peu de différences sont observées sur le muscle lisse entre les souris WT et *Cd34*^{-/-} [246], nous nous sommes intéressées à l'inflammation pulmonaire. Ainsi, l'hypothèse spécifique de cette étude est que l'expression du CD34 est nécessaire à la localisation et à la dégranulation des mastocytes et des éosinophiles. L'objectif principal est de déterminer l'influence de l'expression du CD34 sur

certaines fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'immunité de l'asthme. Les sous-objectifs sont :

1. Déterminer le nombre de mastocytes au poumon de souris WT et *Cd34^{-/-}* exposées au HDM.
2. Déterminer l'impact de l'ajout de dégranulats de mastocytes et d'éosinophiles de souris WT et *Cd34^{-/-}* sur la contractilité du muscle lisse.
3. Caractériser la dégranulation de mastocytes et d'éosinophiles de souris WT et *Cd34^{-/-}*.
4. Analyser *in vivo* la production de lipides chez des souris WT et *Cd34^{-/-}* salines ou exposées au HDM.

Chapitre III: Matériels et méthodes

3.1 Souris utilisées

Les souris ont été hébergées au Centre de recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec pour toute la durée des expérimentations. Chaque protocole a été approuvé par des comités d'éthiques locales et respect les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux. Pour les différents protocoles, des souris *Cd34^{+/+}* (WT) et *Cd34^{-/-}* âgées entre 6 à 8 semaines ont été utilisées. Les souris WT et *Cd34^{-/-}* étaient recroisées avec des souris C51Bl/6 à toutes les huit générations. Toutes les souris ont été euthanasiées par surdose d'un mélange de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine (10 mg/kg) injecté de façon intrapéritonéale.

3.2 Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs

3.2.1 Culture de cellules B16-FLT3L et modèle *in vivo* d'expansion de DCs

Les cellules B16 surexprimant le Flt3L (données par le Dr Kelly McNaghy) ont été cultivées dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS). Le milieu des cellules était changé jusqu'à confluence soit environ 4 jours. Les cellules ont été re-suspendues dans de la solution saline stérile à une concentration de 40×10^6 cellules/mL.

Le Flt3L étant essentiel au développement des DCs, l'injection de cellules B16 surexprimant le Flt3L chez des souris induit un grand nombre de DCs dans divers tissus, dont la rate et le poumon. 5×10^6 cellules dans 125uL ont été injectées sous-cutané de chaque côté

du bas du dos de souris, tel que décrit préalablement. [247, 248] Lorsque les mélanomes ont eu atteint un diamètre d'environ 1 cm (environ 3 semaines après l'injection), les souris ont été euthanasiées et leur rate récoltée. Les rates ont été écrasées puis filtrées avec un filtre de 70µm et une lyse des globules rouges a été effectuée à l'aide de chlorure d'ammonium (0.420g NaHCO₃, 4.01g NH₄Cl et 0.182g EDTA pour 500mL d'eau distillée) pendant 20 secondes. Ensuite, les DCs ont été isolées par sélection négative en utilisant le *EasySep Mouse pan-DC Enrichment Kit* tel que décrit par le manufacturier (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada).

3.2.2 Stimulation et migration des DCs isolées

3x10⁶ DCs isolées ont été suspendues dans 3mL de milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 complet (RPMI 1640 supplémenté de 10% de FBS, 1 % de sodium pyruvate, et 40 µM de β-mercaptoéthanol) et stimulées 18h avec 10ng/mL de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) et 10ng/mL de LPS (Sigma, Oakville, ON, Canada) selon deux conditions soit GM-CSF seul ou GM-CSF avec LPS. Pour la stimulation, des plaques 6 puits non-adhérentes ont été utilisées. À la suite de la stimulation, les cellules ont été récoltées et 2.5x10⁵ cellules ont été suspendues dans 500µL de milieu complet avec 20ng/mL de GM-CSF et 20ng/mL de LPS en respectant les mêmes conditions et ont été déposées dans un insert de 3µm. Celui-ci a été déposé dans une plaque 24 puits dont chaque puits contenait 500 µL de milieu complet avec différentes concentrations de SDF-1 (CXCL12) (AbLab Technologies, Vancouver, BC, Canada), soit 0nM, 1nM, 10nM et 100nM. Après 18 heures d'incubation à 37°C, les cellules dans les inserts et les cellules dans les puits ont été récoltées et comptées. Les résultats sont exprimés en ratio du nombre de cellules dans le puits sur le nombre de cellules dans l'insert.

3.2.3 Stimulation et analyse en cytométrie des DCs isolées

6x10⁵ DCs isolées ont été suspendues dans 3mL RPMI 1640 complet et stimulées 18h avec 10ng/mL de GM-CSF, 10ng/mL de LPS, et 10ng/mL de TNF (Peprotech, Rocky Hill,

NJ, USA) selon quatre conditions soit sans aucun réactif, avec GM-CSF seul, avec GM-CSF et LPS et avec GM-CSF et TNF. Pour la stimulation des plaques 6 puits non adhérentes ont été utilisées. Les cellules ont été récoltées puis suspendues dans 200µL de tampon de marquage (500mL de tampon phosphate salin (PBS) et 5mL de FBS) dans une plaque 96 puits. Après centrifugation, les cellules ont été suspendues dans 25µL de *FcBlock* (clone93) (BioLegend, San Diego, CA, USA) et 25µL de marquage primaire et incubées à 4°C pour 20 minutes. À la suite de lavages avec du tampon de marquage, les cellules ont été suspendues dans 50µL d'anticorps secondaire et incubées à 4°C pour 20 minutes. Les anticorps utilisés étaient: anti-CD11b-Pe/Cy7 (clone N418), anti-CD103-PE (clone M290), anti-CD86-biotin (clone GL1), anti-CD11c-APC (clone HLA), anti-CD80-biotin (clone16-10A1) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-E-Cadherin-biotine (clone DECMA-1) (eBioscience, San Diego, CA, USA); anti-MHC-II-Pac-Blue (clone M5/114.15.2), anti-CD11c-PerCP (clone, anti-CD197-AF647 (clone 4B12), anti-XCR1-BV650 (clone ZET), anti-CD40-PE/Cy7 (clone 3/23) (BioLegend, San Diego, CA, USA).

3.3 Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique

3.3.1 Analyse en cytométrie du nombre de mastocytes au poumon en contexte d'asthme chronique

3.3.1.1 Modèle d'asthme chronique au HDM

Des souris WT et *Cd34*^{-/-} ont été exposées à 50 µL d'HDM (GREER, Lenoir, NC, USA) 1µg/mL de façon intranasale trois fois par semaines pendant cinq semaines. Les instillations étaient effectuées aux deux jours soit, lundi, mercredi et vendredi. Des souris WT et *Cd34*^{-/-} contrôles ont été exposées à 50 µL de saline. Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière instillation.

3.3.1.2 Isolement des leucocytes du poumon

Le poumon a été prélevé et digéré, avec une solution de 12.5 µg/mL de Collagénase IV (Sigma, Oakville, ON, Canada) et de 0.5mg/mL de DNase (Sigma, Oakville, ON, Canada), 45 minutes à 37°C. Après la digestion, les poumons ont été filtrés avec un filtre de 70µm et une lyse des globules rouges a été effectuée à l'aide de chlorure d'ammonium tel que décrit précédemment.

3.3.1.3 Cytométrie en flux des leucocytes isolés

Les cellules ont été ensuite marquées tel que décrit précédemment avec les anticorps suivants: anti-CD45-PerCP (clone 30-F11), anti-CD34-APC (clone MEC14.7), anti-B220-APC/Cy7 (clone RA3-6B2), anti-CD90.2-AF700 (clone 30-H12), anti-CD117-PE/Cy7 (clone 2B8) et anti-FcεRI-PB (BioLegend, San Diego, CA, USA).

3.3.2 Culture de mastocytes (BMDCs) et d'éosinophiles (BMEos) dérivés de la moelle osseuse

3.3.2.1 Récolte de la moelle osseuse

La moelle osseuse qui a été utilisée pour la culture cellulaire de mastocytes et d'éosinophiles provenait de pattes de souris WT et *Cd34^{-/-}* naïves. À la suite de l'euthanasie des souris, les pattes inférieures ont été récupérées et nettoyées pour obtenir le tibia et le fémur. Les extrémités des os ont été coupées et une seringue de 25G contenant du PBS a été insérée à l'intérieur de l'os afin de récupérer la moelle osseuse. Une lyse des globules rouges a été effectuée à l'aide de chlorure d'ammonium tel que décrit précédemment puis les cellules de la moelle ont été filtrées avec un filtre de 70µm.

3.3.2.2 BMDCs

Pour la culture des mastocytes, toutes les cellules récoltées provenant d'une souris ont été mises en culture avec 10mL de milieu d'enrichissement soit RPMI 1640 avec 10% de FBS, 5x10⁻⁵M de β-mercaptoéthanol et 5ng/ml d'IL-3 (StemCell Technologies, Vancouver,

BC, Canada) dans un flacon T75. Le lendemain de la mise en culture, les cellules ont été transférées dans un nouveau flacon et 5mL de nouveau milieu a été ajouté. Ensuite, le milieu et le flacon ont été changés au trois jours. L'obtention d'une culture de mastocytes prenait quatre semaines et a été vérifiée à l'aide du marquage en cytométrie décrit à la section 3.3.1.3

3.3.2.3 BMEos

Pour la culture des éosinophiles, toutes les cellules récoltées provenant d'une souris ont été mises en culture avec 10mL d'un premier milieu d'enrichissement soit RPMI 1640 avec 20% de FBS, 5×10^{-5} M de β -mercaptoéthanol et 100ng/ml de Flt3L (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) et 100ng/mL de SCF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) dans un flacon T75 pour quatre jours. Ensuite, le milieu a été changé pour un deuxième milieu d'enrichissement soit RPMI 1640 avec 20% de FBS, 5×10^{-5} M de β -mercaptoéthanol et 10ng/ml d'IL-5 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). La moitié du milieu IL-5 était changé à tous les jours à partir du jour huit jusqu'au jour quatorze. L'obtention d'une culture d'éosinophiles prenait deux semaines et la pureté de la culture été vérifiée à l'aide d'une coloration différentielle de type H&E [249] et le marquage en cytométrie. Le marquage a été effectué tel que décrit précédemment en utilisant les anticorps suivants: anti-SiglecF-BV711 (clone E50-2440) (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA), anti-CCR3-PE (clone 83101), anti-CD45-APC-Cy7 (clone 30-F11) (BioLegend, San Diego, CA, USA).

3.3.3 Impact des dégranulats de BMMCs et de BMEos sur la contraction de trachées

3.3.3.1 Dégranulation des BMMCs

Pour sensibiliser les mastocytes, 2×10^6 BMMCs ont été suspendus dans 5mL de milieu (RPMI 1640 avec 10% de FBS, 5×10^{-5} M de β -mercaptoéthanol et 5ng/ml d'IL-3) dans un T25 auxquels est ajouté 1 μ g/mL d'anti-DNP (Sigma, Oakville, ON, Canada). Le tout a été incubé à 37°C pour 24 heures. La dégranulation a été, par la suite, effectuée dans du Krebs (112mM NaCl, 5,0 KCl, 1,0mM KH_2PO_4 , 1,2mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 29,8mM NaHCO_3 , 1,1mM

glucose et 0,25mM CaCl₂-H₂O), une solution physiologique, pour être utilisée avec les bains d'organe. Les cellules sensibilisées ont été suspendues dans un T25 avec 3mL de Krebs chaud et incubées cinq minutes dans un bain-marie à 37°C. Puis, 20ug/mL de 11-DNP-OVA (Biosearch Technologies, Novato, CA, USA) a été ajouté et l'incubation a été poursuivie pour 30 minutes supplémentaires. Le surnageant a été récupéré et conservé pour les bains d'organe.

3.3.3.1.2 Dosage de la β -hexosaminidase

L'efficacité de la dégranulation des mastocytes a été vérifiée par dosage de la β -hexosaminidase, un produit de dégranulation des mastocytes. Pour ce faire, 50 μ L du surnageant de dégranulation de chaque culture de mastocytes a été prélevé et mélangé avec 50 μ L d'une solution 1x (1 μ L de la solution mère dans 99 μ L de tampon citrate) de la solution mère du substrat de la β -hexosaminidase (0.0038g de *4-methylumbelliferyl N-actyl- β -D-glucosaminide* (Sigma, Oakville, ON, Canada) dans 100 μ L de diméthylsulfoxyde (DMSO)) dans une plaque 96 puits et incubé une heure à 37°C. La réaction a été arrêtée avec 100 μ L de Tris-Base 10x et dosée à une longueur d'excitation de 360nm et d'émission de 450nm. La quantité de β -hexosaminidase a été obtenue avec le rapport 360/450 nm.

3.3.3.2 Dégranulation de BMEos

Pour la dégranulation des BMEos, 2x10⁶ cellules ont été suspendues dans 1mL de Krebs dans un tube de 15mL auquel est ajouté 10 μ M de PAF (Sigma, Oakville, ON, Canada). Le tout a été incubé 30 minutes à 37°C et le surnageant a été conservé pour les bains d'organes.

3.3.3.2.1 Dosage de la peroxydase

L'efficacité de la dégranulation des éosinophiles a été vérifiée par dosage de la peroxydase, un produit de dégranulation des éosinophiles. Toutefois, puisque celle-ci peut adhérer sur les parois, le dosage devait se faire directement dans le contenant de dégranulation. Ainsi, deux dégranulations de chaque culture étaient toujours effectuées en

parallèle, l'une pour les bains d'organe et l'autre pour le dosage de la dégranulation. Pour le dosage, 5×10^5 cellules ont été dégranulées dans 1mL de Krebs dans une plaque 6 puits. Après la dégranulation, 1mL d'une solution d'o-phenylene-diamine (OPD) (AMRESCO, Solon, OH, USA) (800uL 5mM OPD dans 4mL 1M Tris (pH8.0), 5.2mL H₂O et 1.25uL H₂O₂ 30%) a été ajouté directement dans les puits et incubé à température pièce pour 2 minutes. La réaction a été arrêtée avec l'ajout de 500uL de 4M H₂SO₄ et la quantité de peroxydase a été obtenue par dosage à une longueur d'onde de 492nm.

3.3.3.3 Bains d'organes

Les bains d'organes ont été effectués en collaboration avec l'équipe du Dr. Ynuik Bossé. Les trachées de souris WT et *Cd34^{-/-}* naïves ont été récoltées et installées dans un bain d'organe contenant 2mL de Krebs et ont été équilibrées à l'aide de chocs électriques pour une période de 30 minutes afin de vérifier leur viabilité. À la suite de l'équilibration, une dose réponse à des concentrations croissantes de méthacholine (10^{-7} à 10^{-3} M) a été effectuée pour déterminer quelle concentration permet d'avoir la plus belle contraction. Après plusieurs lavages, la trachée était contractée, avec la concentration de méthacholine déterminée, dans 1mL de Krebs pendant cinq minutes. Ensuite, 1mL de Krebs ou de dégranulation de BMMCs WT ou *Cd34^{-/-}* était ajouté dans le bain et laissé pendant 15 minutes. Les trois tests (ajout de Krebs, de dégranulat WT ou de dégranulat *Cd34^{-/-}*) ont été faits sur chaque trachée en s'assurant de bien laver la trachée entre chaque test. Le même protocole a été effectué avec des dégranulations de BMEos WT et *Cd34^{-/-}*. La force de contraction était ensuite analysée pour les 20 minutes de chaque test.

3.3.4 Dosage de la production de lipides bioactifs dans l'asthme par les BMMCs et les BMEos

3.3.4.1 Dégranulation des BMMCs et des BMEos

Pour sensibiliser les mastocytes, 2×10^5 cellules ont été suspendues dans 1mL de RPMI 1640 dans un tube de 15mL avec 1µg/mL d'anti-DNP et incubées à 37°C pour deux heures. Ensuite, 20ug/mL de 11-DNP-OVA a été ajouté aux cellules et incubé 30 minutes dans un

bain-marie. Afin d'induire la dégranulation des éosinophiles, 5×10^5 cellules ont été suspendues dans 1mL de RPMI 1640 dans un tube de 15mL avec 3mM de calcium ionophore et incubées à 37°C pour 30 minutes.

3.3.4.3 Dosage des lipides par spectrométrie de masse (MS)

500µL de méthanol a été ajouté aux échantillons dégranulés de BMDCs et de BMDMs et congelé à -80°C pour 24 heures. L'extraction des lipides et leur analyse MS ont été effectuées en collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Flamand tel que décrit préalablement [250]

3.3.5 Dosage *in vivo* de la production de lipides bioactifs dans l'asthme en contexte d'asthme allergique

3.3.5.1 Modèle d'asthme aigu

Des souris WT et *Cd34^{-/-}* ont été exposées à 50 µL d'HDM 1µg/mL de façon intranasale durant 10 jours consécutifs. Des souris WT et *Cd34^{-/-}* contrôles ont été exposées à 50 µL de saline. Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière instillation.

3.3.5.2 Récupération des poumons et du sérum

Les poumons des souris ont été congelés dans l'azote liquide puis transformés en poudre à l'aide d'un mortier. 0.1mg de poumon a été pesé et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse des lipides en MS. Le sang des souris a été récupéré par ponction cardiaque puis centrifugé 15 minutes à 500g. Le sérum a, ensuite, été récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse des lipides en MS.

3.3.5.3 Dosage des lipides par spectrométrie de masse (MS)

L'extraction des lipides et leur analyse MS des échantillons de poumon et de sérum ont été effectuées en collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Flamand tel que décrit préalablement [250]

3.4 Statistique

Les résultats sont présentés \pm l'erreur type sur la moyenne (SEM). L'analyse statistique ANOVA a été utilisée pour les analyses à comparaisons multiples et suivie par *Tukey's multiple comparison test*. Pour les analyses à comparaison simple, l'analyse *unpaired T test* a été utilisée. Le seuil de significativité est de $p \leq 0.05$.

Chapitre IV: Résultats

4.1 Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs

Notre laboratoire a récemment démontré que l'induction du CD103 par le GM-CSF pouvait être modulée par le LPS et le TNF. Toutefois, l'impact de cette modulation sur les fonctions des DCs demeure inconnu. Ainsi, l'objectif A de ce projet est de déterminer l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur certaines fonctions des DC1 dans l'immunité innée. Après avoir vérifié que la modulation du CD103 s'effectue sur la population d'intérêt, les trois principales fonctions des DCs ont été étudiées soit l'activation des lyT, la migration au LN et l'adhésion à l'épithélium.

4.1.1 Analyse de l'expression du CD103 sur les populations DC1 vs DC2

Les DC1 et les DC2 sont les deux sous-populations de cDCs. Les DC1 sont XCR1 positives et elles expriment le CD8 α ou le CD103. Les DC2 sont Sirp α positive et elles expriment ou non le CD11b. [105, 106] Puisque les deux sous-populations de cDCs n'exercent pas les mêmes fonctions, il était important de vérifier sur qu'elle(s) population(s) le GM-CSF, le LPS et le TNF modulent le CD103. Les DCs stimulées ont été sélectionnées en cytométrie en flux par une double expression des marqueurs CMHII et CD11c puis divisées en quatre populations selon leur expression du CD103 et du XCR1 soit CD103⁻XCR1⁺ et CD103⁺XCR1⁺ qui représentent les DC1 et CD103⁻XCR1⁻ et CD103⁺XCR1⁻ qui représentent les DC2. (Figure 9A) Les résultats démontrent que les DCs isolées de la rate des souris sont majoritairement CD103⁻XCR1⁺ (56.8%) et qu'à la suite d'une exposition de 18 heures au GM-CSF, la majorité des DCs CD103⁻XCR1⁺ deviennent CD103⁺XCR1⁺ (41.4%). La présence de LPS et de TNF avec le GM-CSF empêche la majorité des cellules CD103⁻XCR1⁺ de devenir CD103⁺XCR1⁺, dont le % n'augmente qu'à 13.6% et 10.7% respectivement (Figure 9A). De plus, l'expression du CD103 n'est pas modulée sur les

populations XCR1⁻ (Figure 9B). Ainsi, le modèle de modulation de l'expression du CD103 par le GM-CSF, le LPS et le TNF, module le CD103 sur les DC1 spécifiquement.

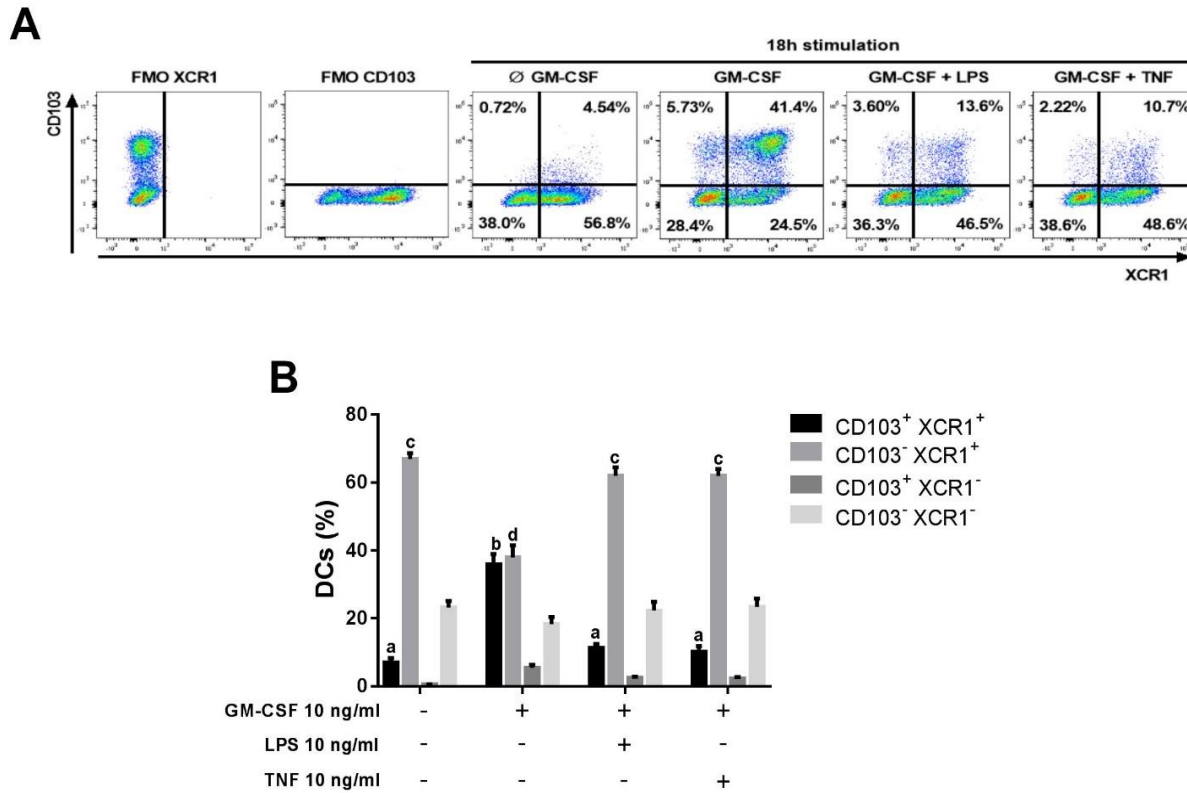


Figure 9 **Mouvement des populations de DCs exprimant ou non le CD103 et/ou le XCR1.**

Des DCs isolées de rates de souris ont été stimulées selon quatre conditions pour moduler l'expression du CD103 à leur surface. 6×10^5 cellules sont incubées 18 heures à 37°C en présence d'aucun réactif, de GM-CSF seul, de GM-CSF avec LPS ou de GM-CSF avec TNF à une concentration de 10ng/mL. Les DCs stimulées ont été sélectionnées en cytométrie en flux par une double expression des marqueurs CMHII et CD11c puis divisées en quatre populations selon leur expression du CD103 et du XCR1. A) exemple de modulation sous forme de graphique de cytométrie et B) résultat de toutes les expériences. n=9 souris par groupe. * $p < 0.05$.

4.1.2 Impact de la modulation du CD103 sur des fonctions des DCs

Pour l'analyse de l'impact de la modulation du CD103 sur des fonctions des DCs, des marqueurs de fonction ont été analysés en cytométrie en flux. Chaque marqueur de fonction a été analysé à l'aide de la Mean Fluorescence Intensity (MFI) qui indique la quantité de protéines exprimée sur chaque cellule analysée et non seulement le pourcentage de cellules positives pour le marqueur. La MFI de chaque marqueur a été mesurée sur les DCs totales puis sur les populations suivantes: les deux populations XCR1⁺ et la population CD103⁻XCR1⁻. La population CD103⁺XCR1⁻ n'étant pratiquement pas existante (Figure 9), elle n'a pas été étudiée.

4.1.2.1 Capacité d'activation des lyT: Expression du CD80, du CD86 et du CD40

Pour l'activation des lyT, la capacité d'activation des DCs a été analysée en analysant l'expression de molécules de co-stimulation soit le CD80, le CD86 et le CD40. Ces molécules ont été choisies, car le CD80 et le CD86 fournissent aux lyT un signal nécessaire à leur activation complète, alors que le CD40 augmente le niveau d'activation des DCs. [65-67]

L'expression du CD80 et du CD86 est augmentée sur les DCs totales à la suite de l'exposition au GM-CSF et la présence de LPS et de TNF l'augmente davantage (Figure 10. A-I et B-I). L'expression du CD80 est majoritairement augmentée sur les cellules CD103⁻XCR1⁻ alors que l'expression du CD86 est majoritairement augmentée sur les populations XCR1⁺. En présence de LPS, les deux populations XCR1⁺ expriment autant le CD80 et le CD86. Toutefois, en présence de TNF, les cellules CD103⁺XCR1⁺ expriment plus le CD80 et le CD86 que les cellules CD103⁻XCR1⁻ (Figure 10 A-II et B-II). L'expression du CD40 est augmentée sur les DCs totales en présence de LPS et de TNF (Figure 10 C-I). Elle est plus élevée chez les cellules CD103⁻XCR1⁺ en présence de LPS et égale chez les deux populations XCR1⁺ en présence de TNF (Figure 10 C-II). Ainsi, les deux populations XCR1⁺

exprimant, indépendamment de l'expression du CD103, les molécules de co-stimulation soit de façon équivalente, plus faiblement ou plus fortement selon les conditions.

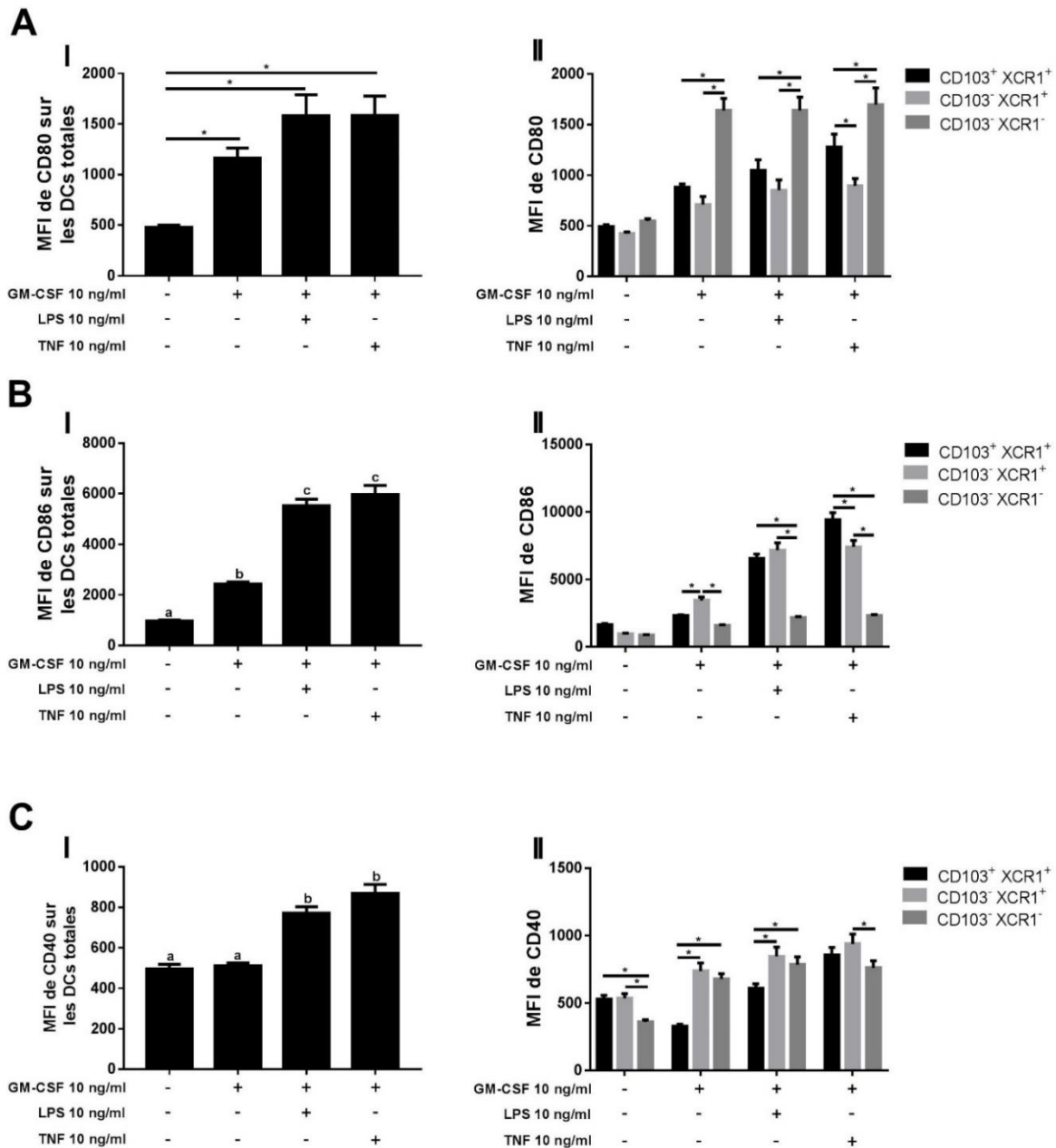


Figure 10 **Expression du CD80, du CD86 et du CD40.** Des DCs isolées de rates de souris ont été stimulées selon quatre conditions pour moduler l'expression du CD103 à leur surface. 6×10^5 cellules sont incubées 18 heures à 37°C en présence d'aucun réactif, de GM-CSF seul, de GM-CSF avec LPS ou de GM-CSF avec TNF à une concentration de 10ng/mL. Les DCs stimulées ont été sélectionnées en cytométrie en flux par une double expression des

marqueurs CMHII et CD11c puis divisées en quatre populations selon leur expression du CD103 et du XCR1. Puis l'analyse de A) l'expression du CD80, de B) l'expression du CD86 et de C) expression du CD40 a été effectuée. n=5 souris par groupe. Les résultats sont représentatifs de deux expériences * p < 0.05

4.1.2.2 Migration: Réponse au SDF-1 et expression du CCR7

Pour la migration des DCs, la réponse au stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), une chimiokine, et l'expression du CCR7 le récepteur de chimiokines exprimé par les DCs activées pour migrer au LN [32] ont été analysées.

Tout d'abord, un test de migration en réponse au SDF-1, une chimiokine impliquée dans la migration des DCs [251], a été effectué avec des cellules stimulées avec du GM-CSF seul et du GM-CSF avec LPS. Le pourcentage de cellules qui ont migré augmente en réponse aux doses croissantes de SDF-1 et ce pourcentage est plus élevé pour les cellules stimulées au GM-CSF avec LPS (Figure 11 A). Ce résultat démontre que la présence de LPS augmente la migration des DCs. Toutefois, il n'est pas possible de conclure si l'expression du CD103 a un impact sur la migration puisque ce résultat n'indique pas quelle(s) population(s) a migré. Pour tenter de répondre à cette question, l'expression du CCR7 a été analysée en cytométrie en flux sur les différentes populations stimulées. L'expression du CCR7 est augmentée sur les DCs totales en présence de LPS et de TNF (Figure 11 B-I). Ce résultat concorde avec le résultat observé à la figure 11A. Lors de l'analyse des populations, une augmentation de l'expression du CCR7 est observée, en présence de GM-CSF seul, chez les populations CD103⁻XCR1⁺ et CD103⁻XCR1⁻ (Figure 11B-II). En présence de LPS et de TNF, l'expression du CCR7 est augmentée sur toutes les populations et les deux populations XCR1⁺ expriment autant le CCR7. Ainsi, en présence de GM-CSF seul, les DCs qui augmentent le CD103 n'ont pas la capacité de migrer puisqu'elles n'expriment pas le CCR7. Toutefois, une fois activées avec du LPS ou du TNF, les cellules CD103⁺XCR1⁺ ont la même capacité de migration que les cellules CD103⁻XCR1⁺ puisqu'elles expriment la même quantité de CCR7 à leur surface. Ainsi, les résultats du CCR7 suggèrent que les deux populations XCR1⁺ ont la capacité de répondre au SDF 1.

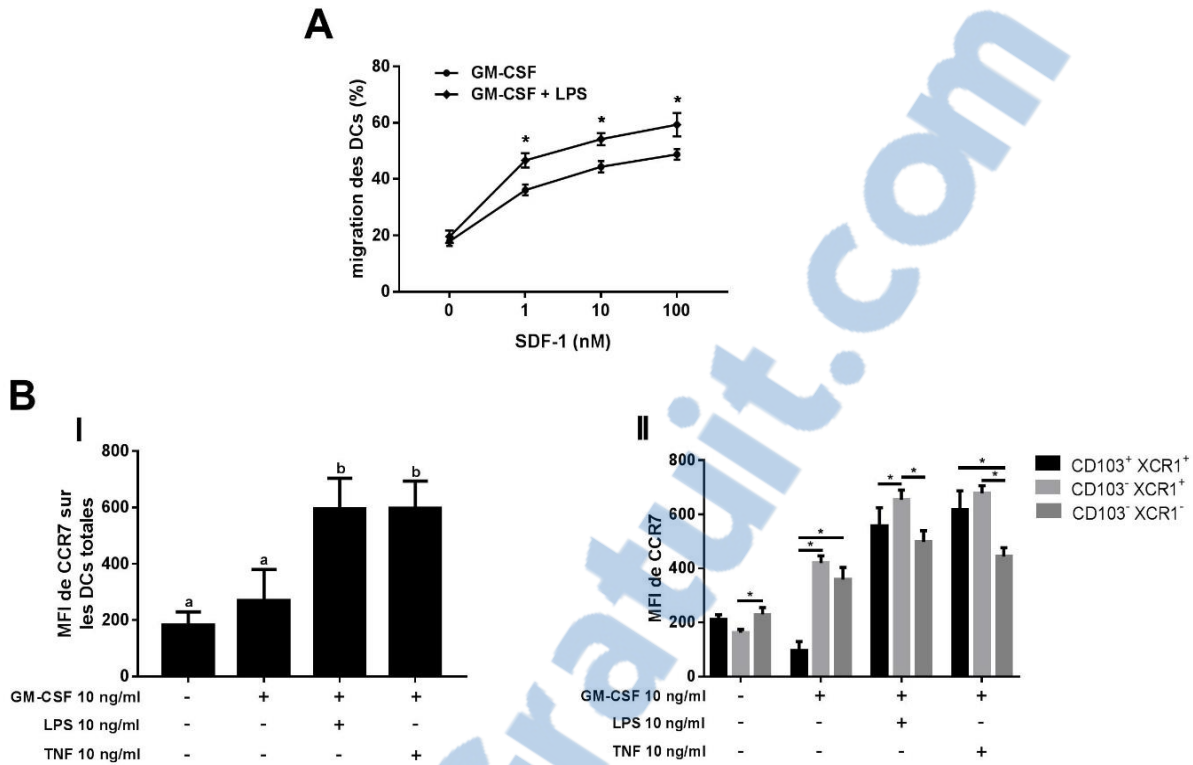


Figure 11 **Migration en réponse au SDF-1 et expression du CCR7.** Des DCs isolées de rates de souris ont été stimulées selon quatre conditions pour moduler l'expression du CD103 à leur surface. 3×10^6 cellules pour la migration et 6×10^5 cellules pour la cytométrie sont incubées 18 heures à 37°C en présence d'aucun réactif, de GM-CSF seul, de GM-CSF avec LPS ou de GM-CSF avec TNF à une concentration de 10ng/mL. A) Pour la migration, 2.5×10^5 cellules ont été suspendus dans $500 \mu\text{L}$ de milieu et ont été déposées dans un insert de $3 \mu\text{m}$ et celui-ci a été placé dans une plaque 24 puits contenant $500 \mu\text{L}$ de milieu de stimulation avec différentes concentrations de SDF-1 soit 0nM, 1nM, 10nM et 100nM. B) Les DCs stimulées ont été sélectionnées en cytométrie en flux par une double expression des marqueurs CMHII et CD11c puis divisées en quatre populations selon leur expression du CD103 et du XCR1. Puis l'analyse de l'expression du CCR7 a été effectuée. $n=5$ souris par groupe. Les résultats sont représentatifs de deux expériences * $p < 0.05$

4.1.2.3 Adhésion à l'épithélium: Expression d'E-Cadhérine

L'E-Cadhérine est exprimée à la surface des cellules épithéliales et elle est le seul ligand connu du CD103. [148] La liaison du CD103 à l'E-Cadhérine permet aux DCs d'adhérer à l'épithélium. L'E-Cadhérine est également exprimée par les DCs et elle peut s'auto-liaisonner. [252, 253] Une augmentation de l'expression de l'E-Cadhérine sur les DCs est observée chez les souris *Cd103^{-/-}*. [149] Il pourrait s'agir d'une compensation pour que les DCs sans CD103 puissent conserver leur fonction d'adhésion à l'épithélium. Ainsi, l'expression d'E-Cadhérine a été analysée à la suite de l'exposition au GM-CSF, au LPS et au TNF pour la fonction d'adhésion à l'épithélium des DCs, mais également pour observer s'il y a effectivement compensation de la perte d'expression du CD103 par l'expression d'E-Cadhérine.

L'expression de l'E-Cadhérine est augmentée sur les DCs totales à la suite de l'exposition au GM-CSF. Cette augmentation est diminuée par la présence de LPS et de TNF (Figure 12 A-I). Ainsi, le GM-CSF, le LPS et le TNF modulent l'expression de l'E-Cadhérine sur les DCs totales selon le même patron que le CD103. Pour les sous-populations, le GM-CSF augmente l'expression de l'E-Cadhérine sur les populations CD103⁺XCR1⁺ et CD103⁻XCR1⁻. Toutefois, l'augmentation est plus élevée chez les cellules CD103⁺XCR1⁺. Le LPS et le TNF diminuent l'augmentation d'E-Cadhérine sur les deux populations. L'expression de l'E-Cadhérine n'est pas modulée sur la population CD103⁻XCR1⁺ (Figure 12 A-II).

Pour mieux visualiser la modulation du CD103 et de l'E-Cadhérine sur les DCs totales, la figure 12 B montre un exemple en cytométrie en flux de la distribution des DCs selon l'expression du CD103 et de l'E-Cadhérine. Avant l'exposition au GM-CSF la majorité des cellules sont CD103⁻ et E-Cadhérine⁻. À la suite de l'exposition au GM-CSF, elles deviennent majoritairement doubles positives. Cette modulation est bloquée par la présence de LPS et de TNF. Ce résultat démontre qu'il n'y a pas de compensation par l'expression de l'E-Cadhérine lors de la perte de l'expression du CD103. Ainsi, une exposition au GM-CSF augmente l'expression du CD103 et de l'E-Cadhérine sur les mêmes cellules XCR1⁺.

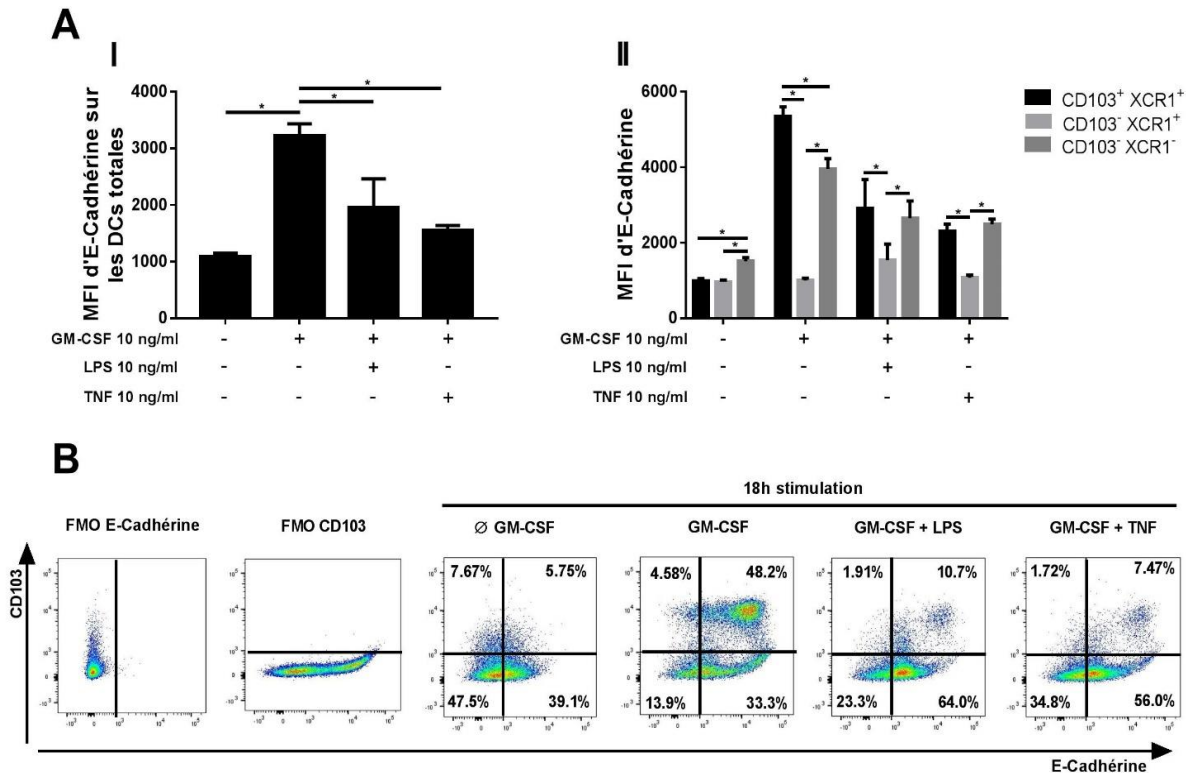


Figure 12 **Expression de l'E-Cadhérine.** Des DCs isolées de rates de souris ont été stimulées selon quatre conditions pour moduler l'expression du CD103 à leur surface. 6×10^5 cellules sont incubées 18 heures à 37°C en présence d'aucun réactif, de GM-CSF seul, de GM-CSF avec LPS ou de GM-CSF avec TNF à une concentration de 10ng/mL . Les DCs stimulées ont été sélectionnées en cytométrie en flux par une double expression des marqueurs CMHII et CD11c puis divisées en quatre populations selon leur expression du CD103 et du XCR1. Puis l'analyse de l'expression de l'E-Cadhérine a été effectuée. $n=5$ souris par groupe. Les résultats sont représentatifs de deux expériences * $p < 0.05$

Vous trouverez à la page suivante un tableau récapitulatif des résultats démontrés à cette section. Les scores établis permettent d'observer l'évolution de l'expression d'un marqueur de fonction pour une population en fonction des différentes conditions ainsi que de comparer l'expression d'un marqueur de fonction entre les populations pour une même condition. Toutefois, les marqueurs de fonction ne peuvent pas être comparés l'un à l'autre puisqu'un même score entre deux marqueurs de fonction n'est pas nécessairement équivalent.

Tableau 1 **Tableau récapitulatif des résultats obtenus à la section 4.1.2**

		Score d'expression des marqueurs de fonction selon les différentes conditions et populations		
		CD103 ⁺ XCR1 ⁺	CD103 ⁻ XCR1 ⁺	CD103 ⁻ XCR1 ⁻
CD80	Sans GM-CSF	+	+	+
	GM-CSF	++	++	++++
	GM-CSF + LPS	++	++	++++
	GM-CSF + TNF	+++	++	++++
CD86	Sans GM-CSF	+	+	+
	GM-CSF	+	++	+
	GM-CSF + LPS	+++	+++	+
	GM-CSF + TNF	++++	+++	+
CD40	Sans GM-CSF	++	++	+
	GM-CSF	+	+++	+++
	GM-CSF + LPS	++	+++	+++
	GM-CSF + TNF	+++	+++	++
CCR7	Sans GM-CSF	+++	++	+++
	GM-CSF	+	++++	++++
	GM-CSF + LPS	+++++	+++++	+++++
	GM-CSF + TNF	+++++	+++++	++++
E-Cadhérine	Sans GM-CSF	+	+	++
	GM-CSF	+++++	+	++++
	GM-CSF + LPS	+++	++	+++
	GM-CSF + TNF	+++	+	+++

4.2 Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique

Le CD34 est exprimé par les mastocytes et les éosinophiles, deux cellules centrales dans le développement de l'asthme allergique et impliquées dans le développement de l'HRB. Le CD34 est également impliqué dans la réactivité du système respiratoire. Toutefois, l'impact du CD34 sur les fonctions des mastocytes et des éosinophiles demeure inconnu. Ainsi, l'objectif B de ce projet est de déterminer l'influence de l'expression du CD34 sur certaines fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'immunité de l'asthme. Tout d'abord, le nombre de mastocytes au poumon a été analysé par cytométrie en flux. Ensuite,

des cultures dérivées de la moelle osseuse de mastocytes et d'éosinophiles ont été utilisées pour déterminer si le CD34 influence la dégranulation de ces cellules. La dégranulation a été analysée à l'aide de bain d'organe, par le dosage de médiateurs et l'analyse de la production de lipides. Finalement, la production de lipide a été analysée *in vivo*.

4.2.1 Analyse en cytométrie du nombre de mastocytes au poumon de souris WT et *Cd34*^{-/-} exposées au HDM

L'impact du CD34 sur la migration des mastocytes demeure très peu étudié. Une seule étude a démontré une diminution du nombre de mastocytes au poumon chez les souris *Cd34*^{-/-} en contexte d'asthme allergique. [244] Cet objectif (B1) permettait de confirmer les résultats obtenus en utilisant une seconde technique d'analyse soit la cytométrie en flux. Toutefois, les résultats obtenus, lors de nos travaux, ne sont pas concluants. Moins de 1% des cellules totales sont positives pour c-KIT et FcεR1, les marqueurs spécifiques des mastocytes (Figure 13A) et les résultats entre les souris présentent une grande marge d'erreur (Figure 13B). Ainsi, il n'a pas été possible de vérifier l'impact de l'expression du CD34 sur le recrutement des mastocytes au poumon.

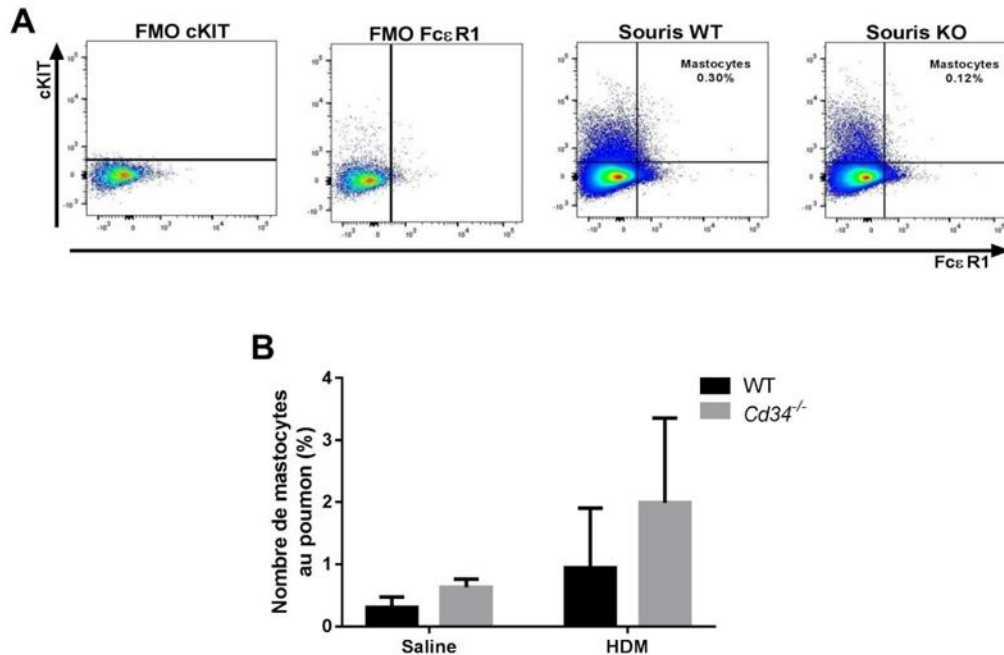


Figure 13 **Nombre de mastocytes au poumon en contexte d'asthme allergique.** Des souris WT et *Cd34^{-/-}* ont été exposées à 50 μ L d'HDM 1 μ g/mL de façon intranasale trois fois par semaines pendant cinq semaines. Le poumon a été prélevé et digéré, puis le nombre de mastocytes a été analysé en cytométrie en flux. A) Exemple du marquage en cytométrie en flux et B) Nombre de mastocytes au poumon. n=3 pour les souris salines et n=8 pour les souris HDM.

4.2.2 Vérification des cultures BMMCs et BMEos

Des cultures dérivées de la moelle ont été utilisées pour répondre aux objectifs B2 et B3 qui étaient de déterminer l'impact de l'ajout de dégranulats de mastocytes et d'éosinophiles de souris WT et *Cd34^{-/-}* sur la contractilité du muscle lisse et de caractériser la dégranulation de mastocytes et d'éosinophiles de souris WT et *Cd34^{-/-}*. Avant l'utilisation des cultures pour des expériences, il était important de vérifier la pureté des cultures en mastocytes et éosinophiles. Il est important de noter qu'aucune différence de nombre et d'expression de marqueurs spécifique n'est observée entre les progéniteurs hématopoïétiques de souris WT et *Cd34^{-/-}*. [244] Ainsi, les cultures dérivées de la moelle osseuse de souris WT et *Cd34^{-/-}* ont la même capacité de développement. Pour les BMMCs, les cellules ont été

analysées par cytométrie en flux puisque les mastocytes peuvent être spécifiquement identifiés par une double expression de c-KIT et de FcεR1. [19] Les BMMCs produits étaient bien des mastocytes puisque plus de 90% des cellules étaient doubles positives pour c-KIT et FcεR1 (Figure 14A).

Pour les BMEos, les cellules ont été analysées avec deux techniques distinctes puisque les éosinophiles n'expriment pas de marqueurs spécifiques. Tout d'abord, la morphologie distinctive des éosinophiles a été analysée par coloration H&E. Les cellules obtenues présentaient bien la morphologie distinctive des éosinophiles soit un noyau en forme de beigne et des granules roses à la suite d'une coloration à l'éosine. (Figure 14B) [215] Ensuite, deux molécules exprimées par les BMEos ont été analysées, soit le CCR3 et le Siglec F [254], et plus de 80% des cellules obtenues étaient doubles positives pour les deux molécules. (Figure 14B) Ainsi, les BMEos obtenus étaient bien des éosinophiles.

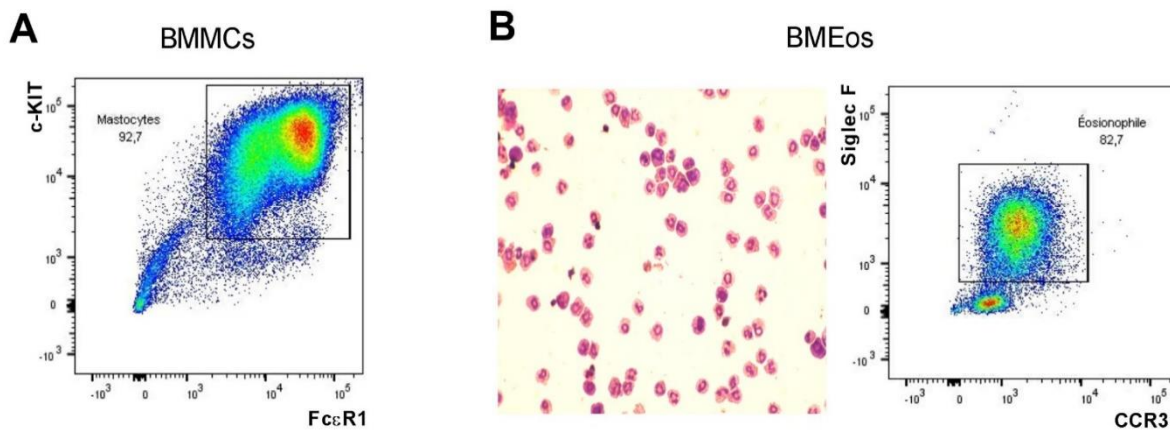


Figure 14 **Vérification des cultures dérivées de la moelle osseuse.** Des cellules de la moelle osseuse ont été cultivées 4 semaines avec de l'Il-3 pour obtenir des BMMCs et 4 jours avec du Flt3-L et du SCF puis 10 jours supplémentaires avec de l'IL-5 pour obtenir des BMEos. A) Analyse en cytométrie des BMMCs et B) analyse par coloration H&E et par cytométrie des BMEos.

4.2.3 Analyse de l'impact des dégranulats des BMMCs et des BMEos sur la contraction du muscle lisse

Les mastocytes et les éosinophiles sécrètent divers médiateurs qui affectent la contraction du muscle lisse et ainsi l'HRB. [19] L'ajout de dégranulats de BMMCs et de BMEos en bain d'organe permettait d'analyser l'impact des médiateurs sécrétés sur le muscle lisse, mais, également, d'observer une différence dans la dégranulation des cultures WT et *Cd34^{-/-}*. Lors de l'ajout de Krebs à la suite de la contraction avec de la méthacholine, la contraction diminue pour le reste du test (Figure 15A et B). L'ajout de dégranulats de BMMCs WT permet de maintenir la contraction de la trachée tout au long du test. Une différence significative est observée entre la force de contraction de l'ajout de Krebs et de dégranulats WT. L'ajout de dégranulats de BMMCs *Cd34^{-/-}* permet de maintenir la contraction pour les 5 premières minutes puis la contraction diminue pour le reste du test (Figure 15A). Ainsi, les dégranulats des BMMCs WT affectent la contraction du muscle en maintenant la contraction. De plus, il semble y avoir une différence entre les dégranulats de BMMCs WT et *Cd34^{-/-}* puisque le maintien de la contraction est moins long pour les dégranulats de BMMCs *Cd34^{-/-}*.

L'impact de l'ajout de BMEos WT et *Cd34^{-/-}* sur la contraction de trachée diffère d'une trachée à l'autre. Ainsi, les dégranulats de BMEos WT et *Cd34^{-/-}* n'affectent pas la contraction du muscle lisse. De plus, aucune différence n'est observée entre les dégranulats WT et *Cd34^{-/-}* (Figure 15B).

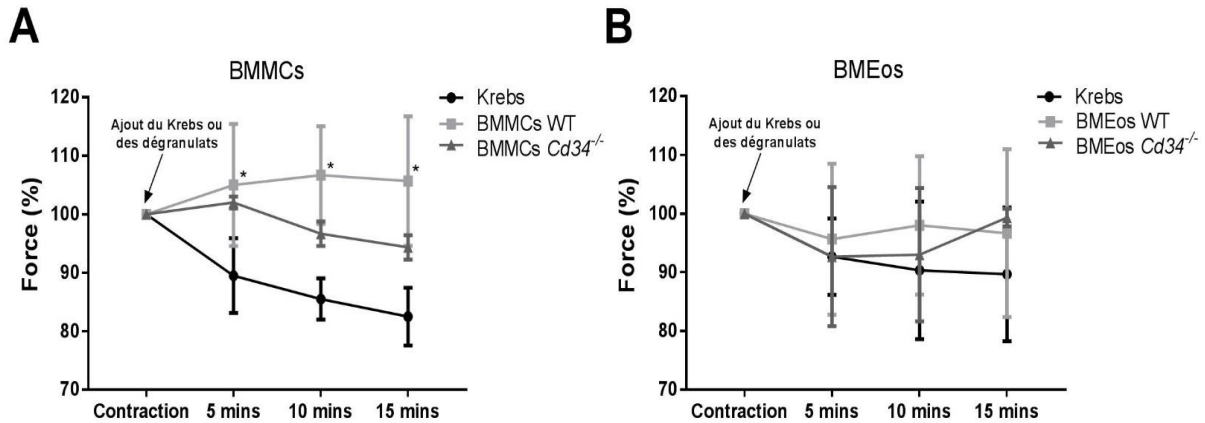


Figure 15 **Impact des dégranulats des BMBCs et des BMEos sur la contraction de trachées.** Des trachées de souris WT et *Cd34^{-/-}* naïves ont été récoltées et installées dans un bain d'organe contenant 2mL de Krebs et ont été équilibrées à l'aide de chocs électriques. Les trachées étaient pré-contractées avec de la méthacholine, dans 1mL de Krebs pendant cinq minutes. Ensuite, 1mL de Krebs ou de dégranulation de cultures WT ou *Cd34^{-/-}* était ajouté dans le bain et laissé pendant 15 minutes. A) Ajout de dégranulats de BMBCs WT et *Cd34^{-/-}* et B) Ajout de dégranulats de BMEos WT et *Cd34^{-/-}*. n=3 trachées *= différence significative avec l'ajout de Krebs p < 0.05.

4.2.4 Caractérisation de la dégranulation des BMBCs et BMEos

À la suite des résultats obtenus avec l'ajout de dégranulats en bain d'organe soit une différence entre les BMBCs WT et *Cd34^{-/-}* et aucune différence entre les BMEos WT et *Cd34^{-/-}*, la dégranulation des différentes cultures a été analysée. Tout d'abord, leur capacité de dégranulation a été déterminée par dosage de médiateur retrouvé dans leurs granules, puis leur production de lipides bioactifs a été analysée en MS.

4.2.4.1 Analyse de la capacité de dégranulation des BMBCs et BMEos

La capacité de dégranulation de BMBCs a été déterminée par dosage de la β -hexosaminidase. Le dosage de la β -hexosaminidase est plus faible chez les BMBCs *Cd34^{-/-}*

que chez les BMDCs WT. Ainsi, l'absence de CD34 diminue la capacité de dégranulation des mastocytes.

La capacité de dégranulation des BMEos a été vérifiée par dosage de la peroxydase. Le dosage de la peroxydase est semblable chez les BMEos WT et les BMEos *Cd34^{-/-}*. Ainsi, l'expression du CD34 n'affecte pas la capacité de dégranulation des éosinophiles.

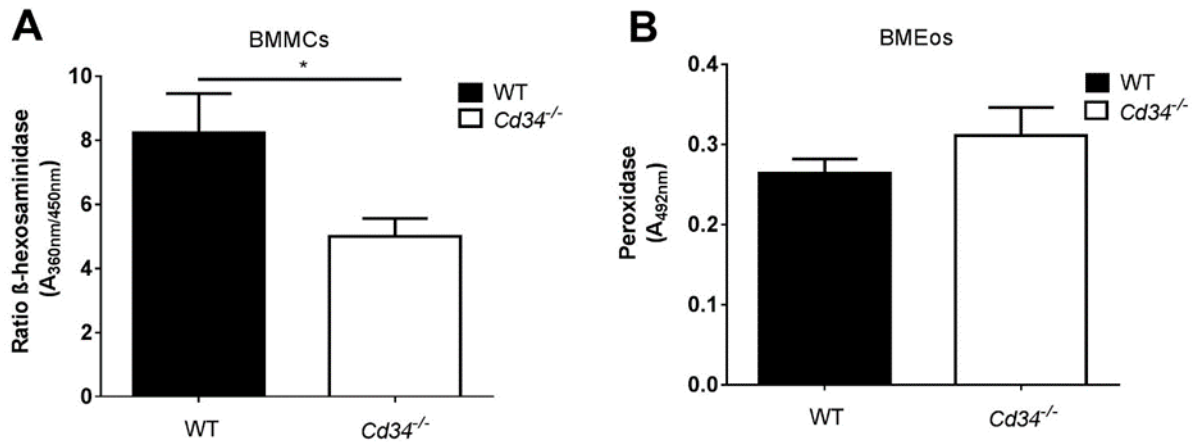


Figure 16 **Capacité de dégranulation des BMDCs et BMEos.** Les BMDCs ont été activés à l'aide d'un anti-DNP et d'un DNP. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 heures en présence de 1µg/mL d'anti-DNP pour être sensibilisées, puis elles ont été dégranulées par l'ajout de 20ug/mL de 11-DNP-OVA. Les BMEos ont été activés à l'aide de PAF. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 10µM de PAF. A) La capacité de dégranulation de BMDCs a été déterminée par dosage de la β-hexosaminidase. Le substrat de la β-hexosaminidase a été ajouté au surnageant de dégranulation des cellules et incubé une heure à 37°C. La réaction a été dosée à une longueur d'excitation de 360nm et d'émission de 450nm. La quantité de β-hexosaminidase a été obtenue avec le rapport 360/450 nm. B) La capacité de dégranulation des BMEos a été vérifiée par dosage de la peroxydase. Une solution d'o-phenylene-diamine (OPD) a été ajoutée directement dans les puits de dégranulation et incubé à température pièce pour 2 minutes. La quantité de peroxydase a été obtenue par dosage à une longueur d'onde de 492nm. n=5 cultures par groupe * p < 0.05

4.2.4.2 Analyse de la production de lipides bioactifs dans l'asthme par les BMMCs et BMEos en MS

Lorsque les mastocytes et les éosinophiles sont activés, ils sécrètent des médiateurs lipidiques nouvellement formés. [19] Puisque les cellules ont été lysées et analysées au MS avec les dégranulats, ces résultats démontrent l'impact du CD34 sur la production de lipides des mastocytes et des éosinophiles plutôt que sur leur sécrétion. Pour alléger les figures, seuls les lipides présentant une différence entre les cultures WT et *Cd34^{-/-}* sont présentés. La majorité des lipides présentés ne sont pas dosés lorsque les cellules ne sont pas stimulées (Figure 17, 18A et 18B) ce qui concorde avec la production *de novo* des lipides par les mastocytes et les éosinophiles. Toutefois, le 2-arachidonyleglycérol (2-AG) et l'acide clupanodonique (DPA)-1-G et 2-G sont dosés, même lorsque les cellules ne sont pas stimulées.

Pour les BMMCs, trois lipides démontrent une différence entre les cultures WT et *Cd34^{-/-}* soit l'acide 5-hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE), l'acide 18-hydroxyeicosatétraénoïque (18-HETE) et le thromboxane (TX) A₂ mesuré par les niveaux de TXB₂. Ces trois lipides sont produits en plus grande quantité chez les BMMCs *Cd34^{-/-}* (Figure 17). Ainsi, le CD34 peut affecter la production des mastocytes de certains lipides.

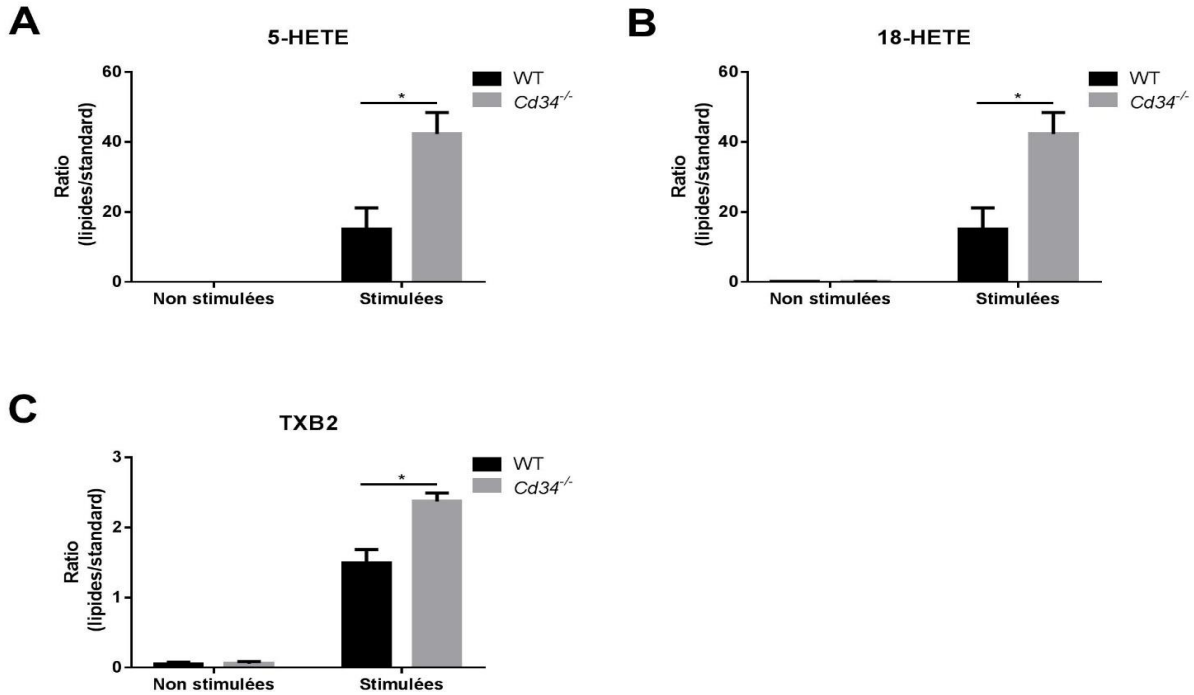


Figure 17 **Sécrétion de lipide par les BMMCs.** Les BMMCs ont été activés à l'aide d'un anti-DNP et d'un DNP. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 heures en présence de 1µg/mL d'anti-DNP pour être sensibilisées, puis elles ont été dégranulées par l'ajout de 20ug/mL de 11-DNP-OVA. La production de lipides a été analysée par MS. A) Analyse du 5-HETE, B) analyse du 18-HETE et C) analyse du TXA₂. n=3 cultures par groupe * p < 0.05

Pour les BMEos, quatre lipides semblent démontrer une différence entre les cultures WT et *Cd34*^{-/-} soit le LTE₄, le 5-12 DIHETE, le 2-AG et les DPA-1-G et 2-G. Le LTE₄ semble être diminué chez les BMEos *Cd34*^{-/-} alors que le 5-12 DIHETE, le 2-AG et le DPA-1-G et 2-G semblent être augmentés. Ainsi, le CD34 semble affecter la production de certains lipides chez les éosinophiles, et ce, de façon distincte selon le lipide.

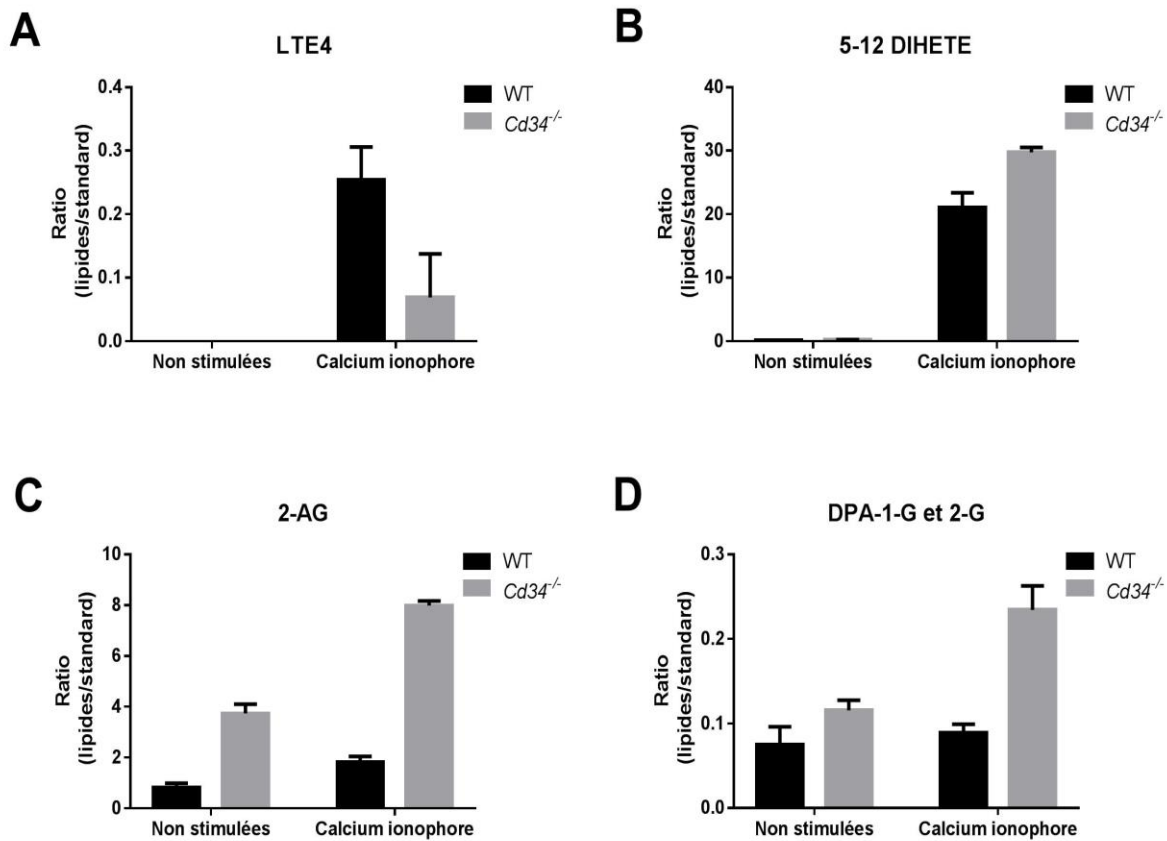


Figure 18 **Sécrétion de lipide par les BMEos.** Les BMEos ont été activés à l'aide de calcium ionophore. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 3mM de calcium ionophore. La production de lipides a été analysée par MS. A) Analyse du LTE₄, B) analyse du 5-12 DIHETE, C) analyse du 2-AG et D) analyse du DPA-1G et 2-G. n=2 cultures par groupe * p < 0.05

4.2.5 Analyse *in vivo* de la production de lipides bioactifs dans l'asthme

À la suite des différences obtenues *in vitro* sur la production de lipides par les mastocytes et les éosinophiles, la production de lipides a été analysée *in vivo* afin de déterminer si ces différences pouvaient y être observées. Puisqu'il était déjà connu, que le CD34 diminue, en contexte d'asthme, le nombre de mastocytes et d'éosinophiles au poumon et augmente le nombre d'éosinophiles dans le sang, [244] la production de lipides a été

analysée dans le poumon et dans le sang en condition normale et en contexte d'asthme allergique. Les mêmes lipides qu'à la section 4.2.4.2 ont été analysés et pour alléger les figures seuls les lipides présentant une différence entre les souris WT et *Cd34^{-/-}* sont présentés.

4.2.5.1 Analyse *in vivo* de la production de lipide dans le poumon

Dans le poumon, la production de PGF_{2a} est plus élevée chez les souris *Cd34^{-/-}* en contexte normal et en contexte d'asthme allergique (Figure 19A). La production de l'acide 13-glutathionyl-14-hydroxy docosahexaénoïque (MCTR1) est également plus élevée chez les souris *Cd34^{-/-}* en contexte d'asthme allergique. Toutefois, il n'y a pas de différence en condition normale (Figure 19B). La production du 12-keto-LTB₄, du 1- et 2-AG et du DPA-1-G et 2-G est pareille chez les deux souris en contexte normal et plus faible chez les souris *Cd34^{-/-}* en contexte d'asthme allergique (Figure 19C, D, E, F et G).

4.2.5.2 Analyse *in vivo* de la production de lipide dans le sérum

Dans le sérum, la production de 2-AG est plus élevée chez les souris *Cd34^{-/-}* en contexte d'asthme et semblable en condition normale (Figure 20A). La production de DPA-1-G et 2-G est également semblable en condition normale. Toutefois, elle est plus faible chez les souris *Cd34^{-/-}* en contexte d'asthme allergique (Figure 20B). Finalement, l'acide 13-hydroxyoctadécanoïque (13-HODE) est plus faible chez les souris *Cd34^{-/-}* en condition normale et revient au même niveau entre les deux souris en contexte d'asthme allergique (Figure 20C).

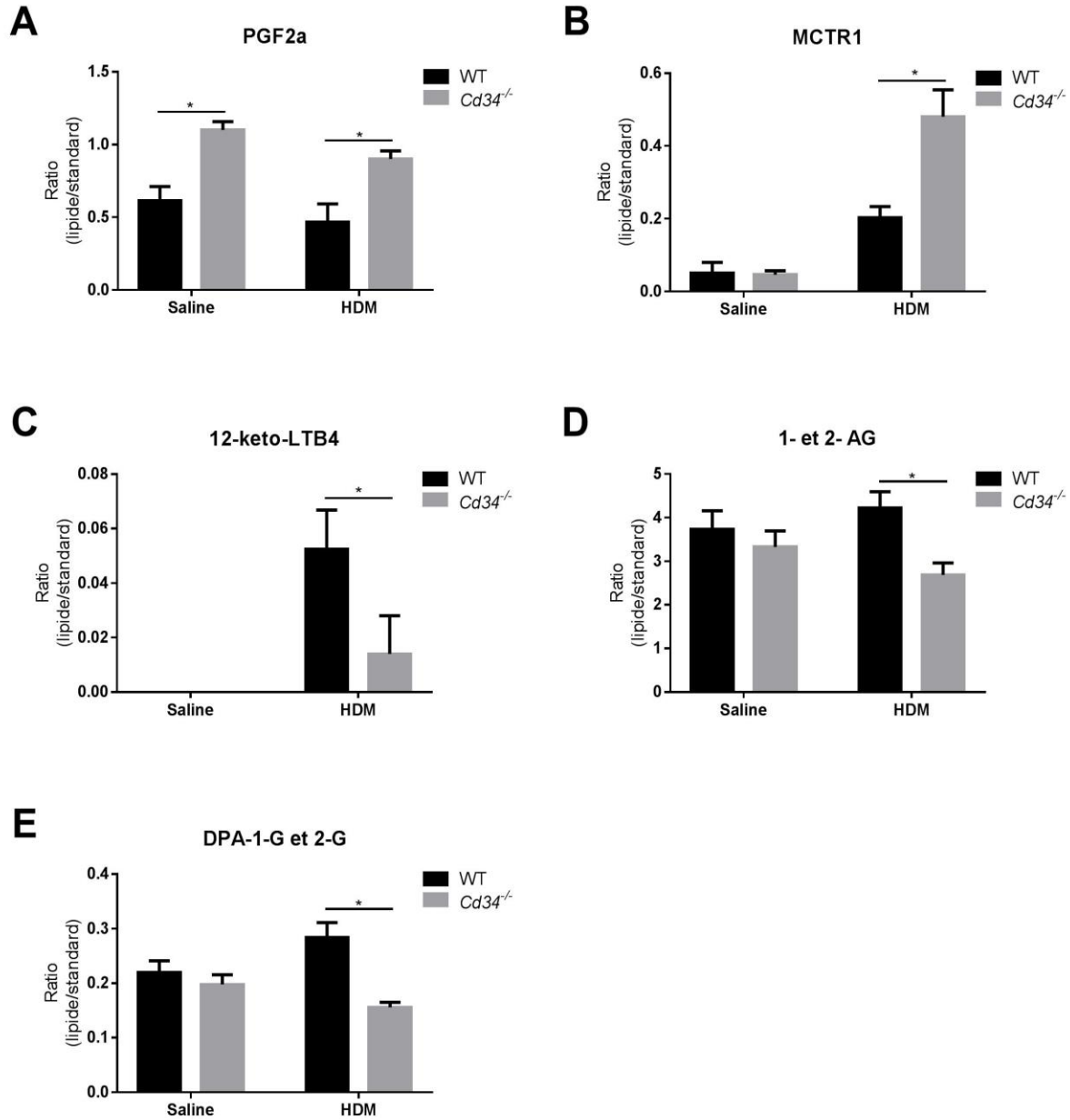


Figure 19 Analyse in vivo de la production de lipide dans le poumon. Des souris WT et *Cd34*^{-/-} ont été exposées à 50 μ L d'HDM 1 μ g/mL de façon intranasale durant 10 jours consécutifs. Des souris WT et *Cd34*^{-/-} contrôles ont été exposées à 50 μ L de saline. Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière instillation. Les poumons des souris ont été congelés avec de l'azote liquide puis transformé en poudre. 0.1mg de poumon a été pesé et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse des lipides en MS. A) Analyse de la PGF_{2a}, B) analyse du MCTR1, C) analyse du 12-keto-LTB₄, D) analyse du 1- 2- AG et E) analyse du DPA-1-G et 2-G

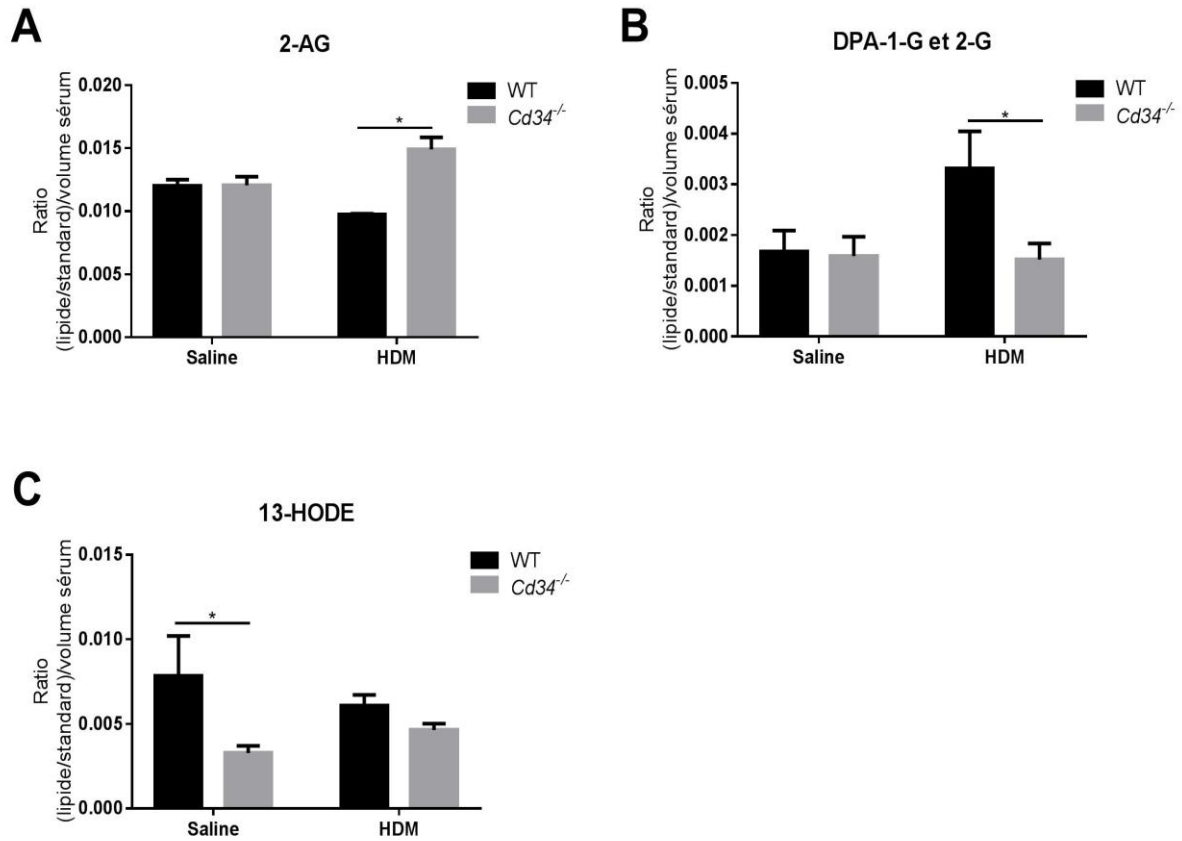


Figure 20 **Analyse in vivo de la production de lipide dans le sérum.** Des souris WT et *Cd34*^{-/-} ont été exposées à 50 μ L d'HDM 1 μ g/mL de façon intranasale durant 10 jours consécutifs. Des souris WT et *Cd34*^{-/-} contrôles ont été exposées à 50 μ L de saline. Les souris ont été euthanasiées 24 heures après la dernière instillation. Le sang des souris a été récupéré par ponction cardiaque puis centrifugé 15 minutes à 500g. Le sérum a, ensuite, été récupéré et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse des lipides en MS. A) Analyse du 2-AG, B) analyse du DPA-1-G et 2-G et C) analyse du 13-HODE.

Chapitre V: Discussion et conclusion

Les cellules immunitaires expriment à leur surface plusieurs molécules qui sont essentielles à leur fonctionnement. La plupart de ces molécules exercent plusieurs fonctions distinctes pour une même cellule et, parfois, différentes fonctions selon le type de cellules qui l'exprime ou le contexte inflammatoire. Pour certaines molécules, leurs rôles demeurent très peu étudiés. Dans ce mémoire, nous avons étudié l'impact de la modulation de l'expression du CD103 sur des fonctions des DCs et l'impact de l'expression du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles. Dans la prochaine section, nous vous présentons la discussion et les perspectives de l'étude du CD103, suivi de la discussion et des perspectives de l'étude du CD34 puis une conclusion générale.

5.1 Étude de l'impact de la modulation de l'expression du CD103 par le LPS et le TNF sur des fonctions des DCs

5.1.1 Populations de DCs modulées par le GM-CSF, le LPS et le TNF

Pour étudier l'impact de la modulation du CD103 sur les DC1, il était important de vérifier que le modèle de modulation avec le GM-CSF, le LPS et le TNF modulait uniquement le CD103 sur les cellules XCR1⁺, le marqueur spécifique des DC1. Heureusement, l'analyse par cytométrie des différentes populations exprimant ou non le CD103 et le XCR1 a démontré que le CD103 était seulement modulé sur les cellules XCR1⁺. Ainsi, notre modèle de modulation nous permettait d'étudier l'impact de la modulation du CD103 spécifiquement sur les DCs d'intérêts soit les DC1.

5.1.2 Impact de la modulation du CD103 sur la capacité d'activation des lyT, la migration et l'adhésion des DCs

Tout d'abord, nous avons déterminé si l'expression du CD103 avait un impact sur certaines fonctions des DC1 suite à sa modulation. En effet, l'utilisation de l'analyse MFI sur les différentes populations de DCs nous a permis de comparer le niveau d'expression des différents marqueurs de fonction entre les populations malgré la présence d'une population majoritaire selon les conditions. Ainsi, un même niveau d'expression d'un marqueur de fonction sur les deux populations XCR1⁺ nous indiquait que l'expression du CD103 ne semblait pas avoir d'impact sur cette fonction. Seule la fonction d'adhésion à l'épithélium des DC1 semble être affectée par la modulation du CD103 par le GM-CSF, le LPS et le TNF. L'expression du CD80, du CD86, du CD40 et du CCR7 est surtout augmentée en présence de LPS et de TNF, c'est pourquoi nous nous intéressons plus particulièrement à l'expression de ces marqueurs chez les différentes populations dans ces conditions. Puisque les deux populations XCR1⁺ expriment les molécules de co-stimulation soit de façon équivalente, plus faiblement ou plus fortement selon la présence de LPS ou de TNF, nous pensons que la capacité d'activation globale des DCs XCR1⁺ n'est pas affectée par l'expression du CD103. Ensuite, en présence de LPS ou de TNF, les deux populations XCR1⁺ expriment autant le CCR7. Ainsi, l'expression du CD103 ne semble pas affecter la capacité de migration des DCs en contexte inflammatoire. Finalement, l'expression d'E-Cadhérine est modulée de la même façon que le CD103 par le GM-CSF, le LPS et le TNF et ce seulement sur la population CD103⁺XCR1⁺. Ainsi, l'expression d'E-Cadhérine est différente entre les deux populations XCR1⁺ ce qui suggère un impact de la modulation du CD103 sur l'adhésion à l'épithélium des DC1. L'exposition des DCs au LPS et au TNF induit une perte d'expression du CD103 et de l'E-Cadhérine ce qui est surprenant puisque nous pensions observer une compensation de la perte du CD103 par l'expression de l'E-Cadhérine. En effet, puisque l'E-Cadhérine peut s'auto-liaison, nous pensions observer une augmentation de l'expression d'E-Cadhérine suite à l'exposition au LPS et au TNF afin que les DCs puissent conserver leur capacité d'adhésion à l'épithélium. De plus, une augmentation de l'expression de l'E-Cadhérine a été observée chez les souris *Cd103*^{-/-} ce qui soutenait notre hypothèse.

L'analyse des différents marqueurs sur les cellules CD103⁻XCR1⁻, nous a permis de comparer les DC1 et les DC2. Il est intéressant de noter que les cellules XCR1⁺ expriment surtout le CD86 et que les cellules XCR1⁻ expriment surtout le CD80. Le CD80 et le CD86 lient le même ligand pour l'activation des lyT. La différence entre les deux molécules semble être surtout au niveau de l'ag qui est présenté par la DCs. Le CD80 serait plus impliqué dans l'induction des Th1 et le CD86 dans l'induction de Th2. [255] Puisque les DCs CD103⁺ et les DCs CD11b⁺ induisent différents lyT selon le contexte, [79, 118, 256] l'impact de ce résultat reste à être élaboré. Une autre différence est observée entre les DC1 et les DC2. Chez les DC1 l'expression de l'E-Cadhérine est dépendante de l'expression du CD103. Toutefois, chez les cellules XCR1⁻, l'E-Cadhérine peut être exprimé sans le CD103. Puisque les cellules XCR1⁻ ne peuvent pas exprimer le CD103, leur expression d'E-Cadhérine ne peut pas être dépendante du CD103 ce qui expliquerait cette différence. Ceci pourrait également expliquer l'augmentation de l'expression de l'E-Cadhérine observé chez les souris *Cd103*^{-/-}. Puisqu'elles ne peuvent pas exprimer le CD103, leur expression de l'E-Cadhérine n'est pas dépendante de l'expression du CD103.

Les molécules exprimées par la population majoritaire dans chaque condition consistent également en un résultat intéressant à analyser. En présence de GM-CSF seul, la population majoritaire (CD103⁺XCR1⁺) n'exprime pas le CCR7 ni les molécules de co-stimulation mais elle exprime fortement le CD103 et l'E-Cadhérine. En présence de LPS ou de TNF, la population majoritaire (CD103⁻XCR1⁺) exprime le CCR7 et les molécules de co-stimulation mais n'exprime pas le CD103 ni l'E-Cadhérine. Ainsi, le GM-CSF favorise une population adhérente alors que le LPS et le TNF favorisent une population activée et non adhérente. L'activation des DCs par le LPS ou le TNF est déjà connue dans la littérature. Toutefois, ce qui est intéressant dans ces résultats c'est la différence entre les molécules d'adhésion.

En conclusion, les DCs arrivent au poumon sous forme de pré-DCs qui n'expriment pas le CD103. [72] Nous pensons qu'en condition normale, la présence de GM-CSF au poumon augmente l'expression du CD103 et de l'E-Cadhérine sur les DC1 afin qu'elles puissent adhérer à l'épithélium et capter facilement de nouveaux ag et, qu'en condition d'inflammation aiguë au LPS, la présence de LPS et de TNF au poumon active les DCs et

empêche l'augmentation du CD103 et de l'E-Cadhérine afin que les DCs activées puissent repartir plus rapidement au LN sans adhérer à l'épithélium (Figure 21). Les perspectives de ce projet sont, tout d'abord, de vérifier *in vivo* si la présence de LPS et de TNF au poumon affecte réellement l'adhésion à l'épithélium des DCs et leur location au poumon afin de confirmer notre hypothèse. Ensuite, nous voulons déterminer l'influence de la modulation du CD103 sur les DC1 dans différents contextes inflammatoires comme les infections aux bactéries à Gram négatif et le cancer. En effet, comme démontré à la figure 21, nous pensons que le LPS empêche l'augmentation du CD103 pour que les DCs puissent repartir plus rapidement au LN, ainsi, en contexte d'infection à une bactérie à Gram négatif l'absence ou la diminution du CD103 permettrait d'éliminer plus rapidement l'infection. Toutefois, dans un contexte comme le cancer où les DCs doivent adhérer à la tumeur pour capter des ag, nous pensons que la présence ou l'augmentation du CD103 serait favorable. En effet, il est prouvé que les cellules tumorales expriment l'E-Cadhérine [257], ainsi, plus il y a de DCs qui expriment le CD103, plus il y a de DCs qui adhèrent à la tumeur et plus d'ag tumorales différents sont captés. Nous voulons, tout d'abord, confirmer nos hypothèses à l'aide de souris *Cd103^{-/-}*, puis moduler le CD103 de façon favorable au contexte (diminuer le CD103 en contexte d'infection et augmenter le CD103 en contexte de cancer) chez des souris WT. Finalement, nous voulons vérifier si le CD103 peut être modulé à la surface des DCs pulmonaires humaines afin de déterminer si le CD103 pourrait bel et bien être utilisé comme cible thérapeutique dans diverses maladies pulmonaires comme les infections et le cancer.

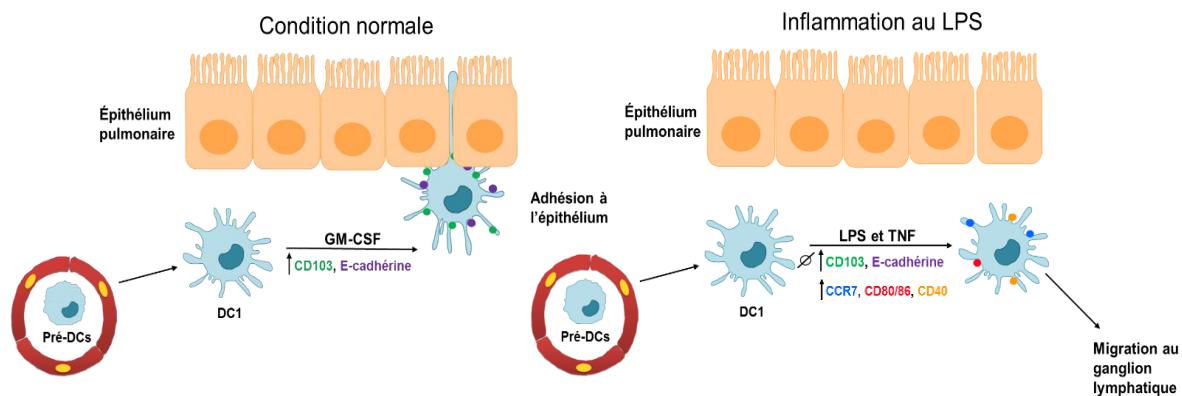


Figure 21 Conclusions de l'impact de la modulation du CD103 sur les fonctions de DCs

5.2 Étude de l'impact du CD34 sur des fonctions des mastocytes et des éosinophiles dans l'asthme allergique

5.2.1 Impact du CD34 sur la migration des mastocytes au poumon

Nous avons tenté de marquer en cytométrie les mastocytes du poumon afin de confirmer le résultat obtenu dans une étude précédente. Dans cette étude, ils ont démontré une diminution du nombre de mastocytes recrutés au poumon en contexte d'asthme allergique chez les souris *Cd34^{-/-}*. Malheureusement, les résultats de notre marquage ne sont pas concluants. En effet, malgré l'utilisation de huit souris par groupes, les résultats présentent de grandes barres d'erreur. Notre marquage de mastocyte étant très faible, il y a beaucoup de différence entre les souris. Puisque le nombre de mastocytes au poumon est faible, nous avons marqué les cellules obtenues à la suite de la digestion de l'arbre bronchique complet. De plus, pour augmenter le pourcentage des mastocytes, nous avons sélectionné les cellules CD45⁺ afin d'éliminer les cellules structurales et nous avons utilisé le B220 et CD90.2 afin d'éliminer les lymphocytes. Malgré cela, notre pourcentage de mastocytes demeure très faible. Les mastocytes étant associés aux cellules endothéliales et épithéliales, nous pensons qu'ils restent pris dans la matrice non digérée ce qui expliquerait notre difficulté à les marquer. Il faudrait, donc, trouver une technique de digestion qui permettrait de digérer la matrice ou d'en libérer les mastocytes afin d'avoir un meilleur marquage.

5.2.2 Impact du CD34 sur la capacité de dégranulation des mastocytes et des éosinophiles

L'exposition de trachée aux dégranulats de BMMC et de BMEos en bain d'organe permettait d'analyser l'impact des médiateurs sécrétés sur le muscle lisse, mais, également, d'observer une différence dans la dégranulation des cultures WT et *Cd34^{-/-}*. La différence obtenue entre les deux cultures de BMMC suggère qu'il y a une différence de dégranulation entre les mastocytes qui expriment le CD34 et les mastocytes qui ne l'expriment pas. Cette

différence peut être expliquée par le nombre de médiateurs relâchés et/ou dans le contenu des médiateurs relâchés. La quantité de médiateurs relâchés a été étudiée en analysant la capacité de dégranulation des mastocytes. Les résultats démontrent une plus faible capacité de dégranulation chez les BMMCs *Cd34^{-/-}*. Ce résultat est très intéressant puisqu'il concorde avec le plus faible maintien de la contraction du muscle lisse par les dégranulats des BMMCs *Cd34^{-/-}*.

Aucune différence n'est observée sur la contraction du muscle lisse entre les dégranulats de BMEos WT et *Cd34^{-/-}* ce qui suggère que le CD34 n'influence pas la dégranulation des éosinophiles. Pour la quantité de médiateurs relâchés, les résultats concordent puisqu'ils démontrent qu'il n'y a pas de différence de dégranulation entre les cultures WT et *Cd34^{-/-}*.

Toutefois, il serait important de doser les deux médiateurs utilisés pour évaluer la capacité de dégranulation des cultures à l'état de base des cellules soit avant la dégranulation afin de confirmer que le CD34 affecte bel et bien la capacité de dégranulation des cellules et non la production des médiateurs lors du développement des cellules.

5.2.3 Impact du CD34 sur la production de lipides bioactifs dans l'asthme

Pour évaluer le contenu des médiateurs relâchés, nous avons commencé par analyser la production de lipides bioactifs des BMMCs et des BMEos. Pour les BMMCs, trois lipides ont montré une différence significative. Le 5-HETE, le 18-HETE et le TXA₂ sont produits en plus grande quantité par les mastocytes *Cd34^{-/-}*. Ces résultats sont surprenants puisque nous avons démontré une plus faible dégranulation chez les mastocytes *Cd34^{-/-}* et que ces médiateurs lipidiques favorisent l'HRB ce qui va à l'encontre de la perte de réactivité des souris *Cd34^{-/-}*. En effet, le 5-HETE est pro-inflammatoire et il induit la bronchoconstriction du muscle lisse [258] et le 18-HETE [259] et le TXA₂ [260] induisent une vasoconstriction. Toutefois, puisque les cellules ont été lysées et analysées au MS avec les dégranulats nous avons analysé la production des lipides et non leur sécrétion, donc, avec la diminution de

dégranulation des mastocytes *Cd34^{-/-}*, la quantité de ces lipides dans l'environnement n'est peut-être pas significativement différente. De plus, l'impact de cette augmentation de production n'est pas observé *in vivo*.

Pour les BMEos, il s'agit de résultats préliminaires puisque l'expérience a seulement été répétée deux fois. Certaines tendances intéressantes sont, toutefois, observées sur quatre lipides bioactifs. La diminution de la production du LTE₄ chez les BMEos *Cd34^{-/-}* est un résultat surprenant puisque le LTE₄ est un bronchoconstricteur et que nous n'observons aucune différence sur la contraction du muscle lisse entre les dégranulats de BMEos WT et *Cd34^{-/-}*. Ainsi, les résultats suggèrent que les différences observées sur la production de lipides ne sont pas suffisantes pour induire une différence sur la contraction du muscle lisse. Le 2-AG est un endocannabinoïde, une famille de lipides reconnue pour réguler les fonctions des cellules immunitaires. [261] De plus, le 2-AG est connu pour induire la migration des éosinophiles [262] ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la production du 2-AG par les éosinophiles *Cd34^{-/-}* puisqu'en absence du CD34 les éosinophiles ont une plus faible capacité de migration.

L'influence du CD34 sur la production du 2-AG est également observable *in vivo* ce qui est très intéressant. En effet, une augmentation du 2-AG est observée dans le sérum des souris *Cd34^{-/-}* exposées au HDM ce qui concorde avec l'augmentation du 2-AG qui semble être observé chez les BMEos *Cd34^{-/-}* puisque les éosinophiles chez les souris *Cd34^{-/-}* exposées à un allergène sont pris dans le sang ce qui expliquerait, également, la diminution du 2-AG observée au poumon. On observe une diminution du DPA-1-G et 2-G dans le sérum ce qui ne concorde pas avec les résultats *in vitro*. Toutefois, il s'agit de résultats préliminaires. Au poumon, le DPA-1-G et 2-G est diminué chez les souris *Cd34^{-/-}* exposées au HDM. Ce résultat peut être difficilement relié à la perte de réactivité des souris *Cd34^{-/-}* puisque le rôle de ces acides gras contenant un glycérol demeure très peu étudié. L'augmentation au poumon du MCTR1 chez les souris *Cd34^{-/-}* pourrait être impliquée dans la perte de réactivité puisque le MCTR1 est impliqué dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire. [263]

Il est important de noter que ces résultats demeurent préliminaires. Plusieurs nouvelles expérimentations et analyses seront nécessaires pour bien comprendre ces résultats et trouver leur implication dans la perte de réactivité des souris *Cd34^{-/-}* exposées à un

allergène. En effet, l'impact de la surexpression ou de la diminution d'expression de ces lipides devra être étudié dans l'inflammation et sur le muscle lisse afin d'établir un lien entre ces résultats et la perte de réactivité. De plus, l'analyse du contenu en médiateurs demeure incomplète puisque les mastocytes et les éosinophiles ne sécrètent pas seulement des lipides. Le contenu en médiateurs préformés et en cytokines devra, donc, être analysé.

En conclusion, certains de nos résultats suggèrent que l'inflammation est une piste prometteuse pour expliquer la perte de réactivité des souris *Cd34^{-/-}* exposées à un allergène. En effet, la plus faible dégranulation des mastocytes *Cd34^{-/-}* implique un plus faible maintien de la contraction d'une trachée ce qui concorde avec la perte de réactivité chez les souris *Cd34^{-/-}* exposées à un allergène puisque l'HRB est reliée à une contraction excessive du muscle lisse. De plus, il est très intéressant d'observer une concordance entre la production du 2-AG et du DPA 1-G et 2-G *in vitro* et *in vivo*. Cette concordance semble être une deuxième piste prometteuse qui demande à être approfondie. Toutefois, l'asthme étant un phénomène très complexe et impliquant plusieurs composantes, nous pensons que la perte de réactivité implique plusieurs facteurs interreliés. En effet, il pourrait s'agir d'une synergie entre les différents éléments observés dans ce projet auquel s'ajoute peut-être la différence au niveau du mucus observée entre des souris WT et *Cd34^{-/-}* exposées au HDM. [246] D'autres éléments du remodelage des voies respiratoires comme l'altération de l'épithélium sont peut-être également impliqués. Les perspectives de ce projet sont, tout d'abord, d'établir une meilleure technique de digestion afin d'améliorer le marquage de mastocytes au poumon et de répéter les résultats préliminaires comme le dosage de lipides en MS chez les BMEos et *in vivo*. Ensuite, puisque le 2-AG et le DPA-1-G et 2-G semblent être la piste lipidique la plus prometteuse et que cela demeure inconnu, nous voulons déterminer quels sont les effets sur la contraction du muscle lisse de ces lipides. Il est également important d'analyser le contenu en médiateurs préformés et en cytokines des cultures d'autant plus que plusieurs de ces médiateurs comme l'histamine sont connus pour avoir un impact sur le muscle lisse. Finalement, puisque nous pensons que la perte de réactivité implique plusieurs éléments, nous voulons exposer des trachées aux dégranulats de mastocytes et d'éosinophiles en même temps afin de déterminer s'il a un effet synergique sur le muscle lisse.

5.3 Conclusions

En conclusion, la modulation du CD103 semble influencer l'adhésion à l'épithélium des DC1 ce qui pourrait être utilisé dans différents contextes comme les infections et le cancer. En effet, diminuer l'adhérence des DC1 en diminuant l'expression du CD103 en contexte d'infection serait favorable alors que dans le cancer, il serait favorable d'augmenter l'expression du CD103 pour augmenter l'adhérence des DC1 aux tumeurs.

L'influence du CD34 sur l'inflammation pulmonaire dans l'asthme semble être une piste prometteuse pour expliquer la perte de réactivité des souris *Cd34^{-/-}* exposées à un allergène. Toutefois, nous pensons que cette perte est causée par un ensemble de facteurs interreliés ce qui implique qu'il reste encore beaucoup de recherche à effectuer avant d'expliquer ce phénomène.

L'inflammation pulmonaire est modulée par un très grand nombre de cellules, mais également par l'expression et/ou la modulation de toutes les molécules de surface que ces cellules expriment ce qui en fait un phénomène très complexe, mais également très intéressant à étudier.

Bibliographie

1. Kopf, M., C. Schneider, and S.P. Nobs, *The development and function of lung-resident macrophages and dendritic cells*. Nature Immunology, 2015. **16**(1): p. 36-44.
2. Moldoveanu, B., et al., *Inflammatory mechanisms in the lung*. J Inflamm Res, 2009. **2**: p. 1-11.
3. Murphy, K., et al., *Janeway's immunobiology*. 9th edition ed. 2017, New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group. xx, 904 pages.
4. Oliveira, E.S., et al., *Implications of dealing with airborne substances and reactive oxygen species: what mammalian lungs, animals, and plants have to say?* Integrative and Comparative Biology, 2007. **47**(4): p. 578-591.
5. Pier, G.B., M. Grout, and T.S. Zaidi, *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of Pseudomonas aeruginosa from the lung*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(22): p. 12088-93.
6. Schutte, B.C. and P.B. McCray, Jr., *[beta]-defensins in lung host defense*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 709-48.
7. Adler, K.B., et al., *INTERACTIONS BETWEEN RESPIRATORY EPITHELIAL-CELLS AND CYTOKINES - RELATIONSHIPS TO LUNG INFLAMMATION*, in *Cells and Cytokines in Lung Inflammation*, M. Chignard, et al., Editors. 1994. p. 128-145.
8. Kowalski, M.P., et al., *Host resistance to lung infection mediated by major vault protein in epithelial cells*. Science, 2007. **317**(5834): p. 130-2.
9. Kuroki, Y., M. Takahashi, and C. Nishitani, *Pulmonary collectins in innate immunity of the lung*. Cellular Microbiology, 2007. **9**(8): p. 1871-1879.
10. Sertl, K., et al., *DENDRITIC CELLS WITH ANTIGEN-PRESENTING CAPABILITY RESIDE IN AIRWAY EPITHELIUM, LUNG PARENCHYMA, AND VISCERAL PLEURA*. Journal of Experimental Medicine, 1986. **163**(2): p. 436-451.
11. Sorokin, S.P., et al., *MACROPHAGE DEVELOPMENT .2. EARLY ONTOGENY OF MACROPHAGE POPULATIONS IN BRAIN, LIVER, AND LUNGS OF RAT EMBRYOS AS REVEALED BY A LECTIN MARKER*. Anatomical Record, 1992. **232**(4): p. 527-550.
12. Bradding, P. and S.T. Holgate, *Immunopathology and human mast cell cytokines*. Crit Rev Oncol Hematol, 1999. **31**(2): p. 119-33.
13. Bender, A.T., et al., *Selective up-regulation of PDE1B2 upon monocyte-to-macrophage differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(2): p. 497-502.
14. Suzuki, T., C.W. Chow, and G.P. Downey, *Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(6-7): p. 1348-61.
15. Liu, Y.J., *Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity*. Cell, 2001. **106**(3): p. 259-62.
16. Steinman, R.M., et al., *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J Exp Med, 2000. **191**(3): p. 411-6.

17. GeurtsvanKessel, C.H., et al., *Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1621-34.
18. Aldridge, J.R., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(13): p. 5306-5311.
19. Stone, K.D., C. Prussin, and D.D. Metcalfe, *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S73-80.
20. Malaviya, R., et al., *Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha*. Nature, 1996. **381**(6577): p. 77-80.
21. Bonfanti, R., et al., *PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1109-12.
22. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
23. Moser, R., J. Fehr, and P.L. Bruijnzeel, *IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals*. J Immunol, 1992. **149**(4): p. 1432-8.
24. Ebisawa, M., et al., *Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. I. Role of endothelial and eosinophil adhesion molecules in IL-1 beta-induced transendothelial migration*. J Immunol, 1992. **149**(12): p. 4021-8.
25. Marshall, J.S. and D.M. Jawdat, *Mast cells in innate immunity*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(1): p. 21-7.
26. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 173-82.
27. Moraes, T.J., J.H. Zurawska, and G.P. Downey, *Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury*. Curr Opin Hematol, 2006. **13**(1): p. 21-7.
28. Shamri, R., J.J. Xenakis, and L.A. Spencer, *Eosinophils in innate immunity: an evolving story*. Cell Tissue Res, 2011. **343**(1): p. 57-83.
29. Woerly, G., et al., *Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(4): p. 769-79.
30. Nonaka, M., et al., *Distinct immunohistochemical localization of IL-4 in human inflamed airway tissues. IL-4 is localized to eosinophils in vivo and is released by peripheral blood eosinophils*. J Immunol, 1995. **155**(6): p. 3234-44.
31. Clark, G.J., et al., *The role of dendritic cells in the innate immune system*. Microbes Infect, 2000. **2**(3): p. 257-72.
32. Idoyaga, J., et al., *Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction*. J Clin Invest, 2013. **123**(2): p. 844-54.
33. Walsh, K.P. and K.H. Mills, *Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation*. Trends Immunol, 2013. **34**(11): p. 521-30.
34. Sun, B. and Y. Zhang, *Overview of orchestration of CD4+ T cell subsets in immune responses*. Adv Exp Med Biol, 2014. **841**: p. 1-13.
35. Raphael, I., et al., *T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 5-17.
36. Barnes, P.J., *Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(3): p. 183-92.
37. Barnes, P.J., *The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3546-56.

38. Nemazee, D., *Mechanisms of central tolerance for B cells*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(5): p. 281-294.
39. Rothstein, D.M. and G. Camirand, *New insights into the mechanisms of Treg function*. Curr Opin Organ Transplant, 2015. **20**(4): p. 376-84.
40. Gulzar, N. and K.F. Copeland, *CD8+ T-cells: function and response to HIV infection*. Curr HIV Res, 2004. **2**(1): p. 23-37.
41. Alberts, B., *Biologie moléculaire de la cellule*. 4e éd ed. 2004, Paris: Flammarion Médecine-Sciences. xxxiv, 1463, [85] p.
42. Kaisho, T. and S. Akira, *Toll-like receptor function and signaling*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(5): p. 979-87; quiz 988.
43. Madigan, M.T., *Brock biology of microorganisms*. 13th ed ed. 2012, Boston: Benjamin Cummings. xxviii, 1043, [77] p.
44. Woese, C.R., *Bacterial evolution*. Microbiol Rev, 1987. **51**(2): p. 221-71.
45. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. Clin Microbiol Rev, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
46. Alexander, C. and E.T. Rietschel, *Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity*. Journal of Endotoxin Research, 2001. **7**(3): p. 167-202.
47. Semerano, L. and M.C. Boissier, *[Monoclonal antibodies in chronic autoimmune inflammatory diseases]*. Med Sci (Paris), 2009. **25**(12): p. 1108-12.
48. Donham, K., et al., *Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings*. Br J Ind Med, 1989. **46**(1): p. 31-7.
49. Thelin, A., O. Tegler, and R. Rylander, *Lung reactions during poultry handling related to dust and bacterial endotoxin levels*. Eur J Respir Dis, 1984. **65**(4): p. 266-71.
50. Kennedy, S.M., et al., *Cotton dust and endotoxin exposure-response relationships in cotton textile workers*. Am Rev Respir Dis, 1987. **135**(1): p. 194-200.
51. Rylander, R., P. Haglind, and M. Lundholm, *Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton workers in an experimental cardroom*. Am Rev Respir Dis, 1985. **131**(2): p. 209-13.
52. Milton, D.K., et al., *Worker exposure to endotoxin, phenolic compounds, and formaldehyde in a fiberglass insulation manufacturing plant*. Am Ind Hyg Assoc J, 1996. **57**(10): p. 889-96.
53. Thorne, P.S. and J.A. DeKoster, *Pulmonary effects of machining fluids in guinea pigs and mice*. Am Ind Hyg Assoc J, 1996. **57**(12): p. 1168-72.
54. Liebers, V., T. Bruning, and M. Raulf-Heimsoth, *Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans*. Am J Ind Med, 2006. **49**(6): p. 474-91.
55. Chen, H., C. Bai, and X. Wang, *The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine*. Expert Rev Respir Med, 2010. **4**(6): p. 773-83.
56. Poltorak, A., et al., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998. **282**(5396): p. 2085-8.
57. Qureshi, S.T., et al., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 615-25.
58. Vaure, C. and Y. Liu, *A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 316.

59. Andonegui, G., et al., *Endothelium-derived toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs (Retracted Article. See vol 112, pg 1264, 2003)*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **111**(7): p. 1011-1020.
60. Matute-Bello, G., C.W. Frevert, and T.R. Martin, *Animal models of acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(3): p. L379-99.
61. Wright, J.L., M. Cosio, and A. Churg, *Animal models of chronic obstructive pulmonary disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(1): p. L1-15.
62. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
63. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro*. J Exp Med, 1974. **139**(2): p. 380-97.
64. Male, D.K., *Immunology*. 7th ed ed. 2006, [London]: Mosby Elsevier. x, 552 p.
65. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
66. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 79-83.
67. Caux, C., et al., *B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1841-7.
68. Diao, J., et al., *In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7196-206.
69. Diao, J., et al., *Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1826-33.
70. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
71. Auffray, C., et al., *CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 595-606.
72. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-7.
73. Onai, N., et al., *Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1207-16.
74. Kingston, D., et al., *The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis*. Blood, 2009. **114**(4): p. 835-43.
75. Varol, C., et al., *Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 171-80.
76. Merad, M., et al., *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 563-604.
77. Aliberti, J., et al., *Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha + dendritic cells*. Blood, 2003. **101**(1): p. 305-10.

78. Edelson, B.T., et al., *Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells*. J Exp Med, 2010. **207**(4): p. 823-36.
79. Schlitzer, A., et al., *IRF4 Transcription Factor- Dependent CD11b(+) Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 970-983.
80. Hambleton, S., et al., *IRF8 mutations and human dendritic-cell immunodeficiency*. N Engl J Med, 2011. **365**(2): p. 127-38.
81. Tailor, P., et al., *The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse*. Blood, 2008. **111**(4): p. 1942-5.
82. Hildner, K., et al., *Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity*. Science, 2008. **322**(5904): p. 1097-100.
83. Ginhoux, F., et al., *The origin and development of nonlymphoid tissue CD103(+) DCs*. Journal of Experimental Medicine, 2009. **206**(13): p. 3115-3130.
84. Kashiwada, M., et al., *NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8alpha(+) dendritic cell development*. Blood, 2011. **117**(23): p. 6193-7.
85. Hacker, C., et al., *Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 380-6.
86. Spits, H., et al., *Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1775-84.
87. Watchmaker, P.B., et al., *Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice*. Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 98-108.
88. Wu, L., et al., *RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha-dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells*. Immunity, 1998. **9**(6): p. 839-47.
89. Lewis, K.L., et al., *Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine*. Immunity, 2011. **35**(5): p. 780-91.
90. Caton, M.L., M.R. Smith-Raska, and B. Reizis, *Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen*. J Exp Med, 2007. **204**(7): p. 1653-64.
91. Ichikawa, E., et al., *Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3909-14.
92. Suzuki, S., et al., *Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11bhighCD8alpha- dendritic cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8981-6.
93. Bajana, S., et al., *IRF4 promotes cutaneous dendritic cell migration to lymph nodes during homeostasis and inflammation*. J Immunol, 2012. **189**(7): p. 3368-77.
94. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.
95. Mildner, A., S. Yona, and S. Jung, *A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells*. Adv Immunol, 2013. **120**: p. 69-103.
96. Reizis, B., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 163-83.

97. Mildner, A. and S. Jung, *Development and Function of Dendritic Cell Subsets*. *Immunity*, 2014. **40**(5): p. 642-656.
98. Traver, D., et al., *Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor*. *Science*, 2000. **290**(5499): p. 2152-4.
99. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. *Blood*, 2001. **97**(11): p. 3333-41.
100. Wu, L., et al., *Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3376-82.
101. Ardavin, C., et al., *Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population*. *Nature*, 1993. **362**(6422): p. 761-3.
102. Luche, H., et al., *The earliest intrathymic precursors of CD8alpha(+) thymic dendritic cells correspond to myeloid-type double-negative 1c cells*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(8): p. 2165-75.
103. Greter, M., et al., *GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 1031-46.
104. Iijima, N., L.M. Mattei, and A. Iwasaki, *Recruited inflammatory monocytes stimulate antiviral Th1 immunity in infected tissue*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(1): p. 284-289.
105. Williams, M., et al., *Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny*. *Nat Rev Immunol*, 2014. **14**(8): p. 571-8.
106. Murphy, T.L., et al., *Transcriptional Control of Dendritic Cell Development*. *Annu Rev Immunol*, 2016. **34**: p. 93-119.
107. Gurka, S., et al., *Mouse Conventional Dendritic Cells Can be Universally Classified Based on the Mutually Exclusive Expression of XCR1 and SIRPalpha*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 35.
108. Bachem, A., et al., *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1273-81.
109. Crozat, K., et al., *The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010. **207**(6): p. 1283-92.
110. Dorner, B.G., et al., *Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells*. *Immunity*, 2009. **31**(5): p. 823-33.
111. Crowley, M., et al., *The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus*. *Cell Immunol*, 1989. **118**(1): p. 108-25.
112. Vremec, D., et al., *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells*. *J Exp Med*, 1992. **176**(1): p. 47-58.
113. Satpathy, A.T., et al., *Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(9): p. 937-48.
114. Tussiwand, R., et al., *Klf4 expression in conventional dendritic cells is required for T helper 2 cell responses*. *Immunity*, 2015. **42**(5): p. 916-28.

115. Sung, S.S.J., et al., *A major lung CD103 (alpha(E))-beta(7) integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins.* Journal of Immunology, 2006. **176**(4): p. 2161-2172.
116. Helft, J., et al., *Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice.* Immunological Reviews, 2010. **234**: p. 55-75.
117. del Rio, M.L., et al., *Development and functional specialization of CD103+dendritic cells.* Immunological Reviews, 2010. **234**: p. 268-281.
118. Plantinga, M., et al., *Conventional and Monocyte-Derived CD11b(+) Dendritic Cells Initiate and Maintain T Helper 2 Cell-Mediated Immunity to House Dust Mite Allergen.* Immunity, 2013. **38**(2): p. 322-335.
119. Beatty, S.R., C.E. Rose, Jr., and S.S. Sung, *Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation.* J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1882-95.
120. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism.* J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
121. del Rio, M.L., et al., *CD103- and CD103+ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4+ and CD8+ T cells.* J Immunol, 2007. **178**(11): p. 6861-6.
122. Sancho, D., et al., *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity.* Nature, 2009. **458**(7240): p. 899-903.
123. Desch, A.N., et al., *CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen.* J Exp Med, 2011. **208**(9): p. 1789-97.
124. Bevan, M.J., *Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming.* J Immunol, 1976. **117**(6): p. 2233-8.
125. Gooding, L.R. and C.B. Edwards, *H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes.* J Immunol, 1980. **124**(3): p. 1258-62.
126. Ochsenbein, A.F., et al., *Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies.* Science, 1999. **286**(5447): p. 2156-9.
127. Huang, A.Y., et al., *In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter.* Immunity, 1996. **4**(4): p. 349-55.
128. Belz, G.T., et al., *Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(23): p. 8670-5.
129. Kim, T.S. and T.J. Braciale, *Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses.* PLoS One, 2009. **4**(1): p. e4204.
130. Conejero, L., et al., *Lung CD103+ dendritic cells restrain allergic airway inflammation through IL-12 production.* JCI Insight, 2017. **2**(10).
131. Roberts, E.W., et al., *Critical Role for CD103(+)/CD141(+) Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma.* Cancer Cell, 2016. **30**(2): p. 324-36.
132. Salmon, H., et al., *Expansion and Activation of CD103(+) Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition.* Immunity, 2016. **44**(4): p. 924-38.

133. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
134. Albelda, S.M. and C.A. Buck, *Integrins and other cell adhesion molecules*. FASEB J, 1990. **4**(11): p. 2868-80.
135. Cheresh, D.A., *Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion*. Clin Lab Med, 1992. **12**(2): p. 217-36.
136. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
137. Bosman, F.T., *Integrins: cell adhesives and modulators of cell function*. Histochem J, 1993. **25**(7): p. 469-77.
138. Haack, H. and R.O. Hynes, *Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage*. Dev Biol, 2001. **233**(1): p. 38-55.
139. Vacca, A., et al., *alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells*. Exp Hematol, 2001. **29**(8): p. 993-1003.
140. Kinashi, T., *Overview of integrin signaling in the immune system*. Methods Mol Biol, 2012. **757**: p. 261-78.
141. Jaensson, E., et al., *Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2139-49.
142. Johansson-Lindbom, B., et al., *Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1063-73.
143. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin, *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 935-47.
144. Lehmann, J., et al., *Expression of the integrin alpha E beta 7 identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13031-6.
145. Uss, E., et al., *CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8+ T cells*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 2775-83.
146. Feng, Y., et al., *CD103 expression is required for destruction of pancreatic islet allografts by CD8(+) T cells*. J Exp Med, 2002. **196**(7): p. 877-86.
147. Zhao, D., et al., *In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease*. Blood, 2008. **112**(5): p. 2129-38.
148. Agace, W.W., et al., *T-lymphocyte-epithelial-cell interactions: integrin alpha(E)(CD103)beta(7), LEEP-CAM and chemokines*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(5): p. 563-8.
149. Bernatchez, E., et al., *Pulmonary CD103 expression regulates airway inflammation in asthma*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **308**(8): p. L816-26.
150. Bernatchez, E., et al., *Hypersensitivity pneumonitis onset and severity is regulated by CD103 dendritic cell expression*. PLoS One, 2017. **12**(6): p. e0179678.
151. Schlickum, S., et al., *Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion*. Blood, 2008. **112**(3): p. 619-25.
152. Cepek, K.L., et al., *Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin*. Nature, 1994. **372**(6502): p. 190-3.

153. Taraszka, K.S., et al., *Molecular basis for leukocyte integrin alpha(E)beta(7) adhesion to epithelial (E)-cadherin*. J Exp Med, 2000. **191**(9): p. 1555-67.
154. Siegmund, K., et al., *Migration matters: regulatory T-cell compartmentalization determines suppressive activity in vivo*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3097-104.
155. Sathe, P., et al., *The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5184-92.
156. Zhan, Y., et al., *GM-CSF increases cross-presentation and CD103 expression by mouse CD8(+) spleen dendritic cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2585-95.
157. Edelson, B.T., et al., *Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e25660.
158. Jackson, J.T., et al., *Id2 expression delineates differential checkpoints in the genetic program of CD8alpha+ and CD103+ dendritic cell lineages*. EMBO J, 2011. **30**(13): p. 2690-704.
159. Bousquet, J., N. Khaltaev, and A.A. Cruz, *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases : a comprehensive approach*. 2007, Geneva: World Health Organization. vii, 146 p.
160. Bahadori, K., et al., *Economic burden of asthma: a systematic review*. BMC Pulm Med, 2009. **9**: p. 24.
161. Boulet, L.-P., et al., *Physiopathologie respiratoire appliquée*. 2013, [Québec]: Presses de l'Université Laval. xxv, 350 pages.
162. Wenzel, S.E., *Asthma: defining of the persistent adult phenotypes*. Lancet, 2006. **368**(9537): p. 804-13.
163. Bel, E.H., *Clinical phenotypes of asthma*. Curr Opin Pulm Med, 2004. **10**(1): p. 44-50.
164. Olin, J.T. and M.E. Wechsler, *Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment*. BMJ, 2014. **349**: p. g5517.
165. Kudo, M., Y. Ishigatsubo, and I. Aoki, *Pathology of asthma*. Frontiers in Microbiology, 2013. **4**: p. 16.
166. Fanta, C.H., *Asthma*. N Engl J Med, 2009. **360**(10): p. 1002-14.
167. Holgate, S.T., *Innate and adaptive immune responses in asthma*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 673-83.
168. Pegorier, S., et al., *Eosinophil-derived cationic proteins activate the synthesis of remodeling factors by airway epithelial cells*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4861-9.
169. Piliponsky, A.M., et al., *Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation*. Mol Immunol, 2002. **38**(16-18): p. 1369.
170. Medecine. U. S. N. L. O. Asthma. . 08-12-17]; Available from: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000990.htm>. .
171. Bergeron, C., W. Al-Ramli, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. Proc Am Thorac Soc, 2009. **6**(3): p. 301-5.
172. Gour, N. and M. Wills-Karp, *IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease*. Cytokine, 2015. **75**(1): p. 68-78.
173. Park, K.S., et al., *SPDEF regulates goblet cell hyperplasia in the airway epithelium*. J Clin Invest, 2007. **117**(4): p. 978-88.
174. Chen, G., et al., *SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production*. J Clin Invest, 2009. **119**(10): p. 2914-24.

175. Cairns, J.A. and A.F. Walls, *Mast cell tryptase stimulates the synthesis of type I collagen in human lung fibroblasts*. J Clin Invest, 1997. **99**(6): p. 1313-21.
176. Al-Muhsen, S., J.R. Johnson, and Q. Hamid, *Remodeling in asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **128**(3): p. 451-62; quiz 463-4.
177. Makinde, T., R.F. Murphy, and D.K. Agrawal, *Immunomodulatory role of vascular endothelial growth factor and angiotensin-1 in airway remodeling*. Curr Mol Med, 2006. **6**(8): p. 831-41.
178. Cockcroft, D.W. and B.E. Davis, *Mechanisms of airway hyperresponsiveness*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **118**(3): p. 551-9; quiz 560-1.
179. Brannan, J.D. and M.D. Loughheed, *Airway hyperresponsiveness in asthma: mechanisms, clinical significance, and treatment*. Front Physiol, 2012. **3**: p. 460.
180. Woolcock, A.J., C.M. Salome, and K. Yan, *The shape of the dose-response curve to histamine in asthmatic and normal subjects*. Am Rev Respir Dis, 1984. **130**(1): p. 71-5.
181. Bosse, Y., et al., *It's not all smooth muscle: non-smooth-muscle elements in control of resistance to airflow*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 437-62.
182. West, A.R., et al., *Airway contractility and remodeling: links to asthma symptoms*. Pulm Pharmacol Ther, 2013. **26**(1): p. 3-12.
183. Ozier, A., et al., *The pivotal role of airway smooth muscle in asthma pathophysiology*. J Allergy (Cairo), 2011. **2011**: p. 742710.
184. Rydell-Tormanen, K., et al., *Smooth muscle in tissue remodeling and hyper-reactivity: airways and arteries*. Pulm Pharmacol Ther, 2013. **26**(1): p. 13-23.
185. Chin, L.Y., et al., *Mechanical properties of asthmatic airway smooth muscle*. Eur Respir J, 2012. **40**(1): p. 45-54.
186. Bosse, Y., et al., *Smooth muscle hypercontractility in airway hyperresponsiveness: innate, acquired, or nonexistent?* J Allergy (Cairo), 2013. **2013**: p. 938046.
187. Bosse, Y., *Asthmatic airway hyperresponsiveness: the ants in the tree*. Trends Mol Med, 2012. **18**(11): p. 627-33.
188. Shore, S.A., *Airway smooth muscle in asthma--not just more of the same*. N Engl J Med, 2004. **351**(6): p. 531-2.
189. Wagers, S.S., et al., *Intrinsic and antigen-induced airway hyperresponsiveness are the result of diverse physiological mechanisms*. J Appl Physiol (1985), 2007. **102**(1): p. 221-30.
190. Nials, A.T. and S. Uddin, *Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge*. Dis Model Mech, 2008. **1**(4-5): p. 213-20.
191. Blanchet, M.R., M. Gold, and K.M. McNagny, *Mutant mice and animal models of airway allergic disease*. Methods Mol Biol, 2014. **1178**: p. 295-308.
192. Blanchet, M.R., M.J. Gold, and K.M. McNagny, *Mouse models to evaluate the function of genes associated with allergic airway disease*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012. **12**(5): p. 467-74.
193. Kumar, R.K., C. Herbert, and P.S. Foster, *The "classical" ovalbumin challenge model of asthma in mice*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(6): p. 485-94.
194. Roche, N., T.C. Chinet, and G.J. Huchon, *Allergic and nonallergic interactions between house dust mite allergens and airway mucosa*. Eur Respir J, 1997. **10**(3): p. 719-26.

195. Keglwich, L., et al., *Proteolytic Activity Present in House-Dust-Mite Extracts Degrades ENA-78/CXCL5 and Reduces Neutrophil Migration*. J Allergy (Cairo), 2014. **2014**: p. 673673.
196. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Mast cell ontogeny: an historical overview*. Immunol Lett, 2014. **159**(1-2): p. 11-4.
197. Suda, T., J. Suda, and M. Ogawa, *Single-cell origin of mouse hemopoietic colonies expressing multiple lineages in variable combinations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(21): p. 6689-93.
198. Chen, C.C., et al., *Identification of mast cell progenitors in adult mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(32): p. 11408-13.
199. Arinobu, Y., et al., *Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18105-10.
200. Jamur, M.C., et al., *Identification and characterization of undifferentiated mast cells in mouse bone marrow*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4282-9.
201. Dahlin, J.S. and J. Hallgren, *Mast cell progenitors: origin, development and migration to tissues*. Mol Immunol, 2015. **63**(1): p. 9-17.
202. Walsh, J.C., et al., *Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates*. Immunity, 2002. **17**(5): p. 665-76.
203. Shelburne, C.P., et al., *Stat5 expression is critical for mast cell development and survival*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1290-7.
204. Chabot, B., et al., *The proto-oncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus*. Nature, 1988. **335**(6185): p. 88-9.
205. Copeland, N.G., et al., *Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles*. Cell, 1990. **63**(1): p. 175-83.
206. Rivera, J., et al., *New insights on mast cell activation via the high affinity receptor for IgE*. Adv Immunol, 2008. **98**: p. 85-120.
207. Gilfillan, A.M. and J. Rivera, *The tyrosine kinase network regulating mast cell activation*. Immunol Rev, 2009. **228**(1): p. 149-69.
208. Galoppin, L. and C. Ponvert, *Histamine*. Revue Francaise D Allergologie Et D Immunologie Clinique, 1997. **37**(7): p. 865-880.
209. Cairns, J.A. and A.F. Walls, *Mast cell tryptase is a mitogen for epithelial cells. Stimulation of IL-8 production and intercellular adhesion molecule-1 expression*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 275-83.
210. Brightling, C.E., et al., *Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1699-705.
211. Carroll, N.G., S. Mutavdzic, and A.L. James, *Increased mast cells and neutrophils in submucosal mucous glands and mucus plugging in patients with asthma*. Thorax, 2002. **57**(8): p. 677-82.
212. Berger, P., et al., *Tryptase-stimulated human airway smooth muscle cells induce cytokine synthesis and mast cell chemotaxis*. FASEB J, 2003. **17**(14): p. 2139-41.
213. Lazaar, A.L., et al., *Mast cell chymase modifies cell-matrix interactions and inhibits mitogen-induced proliferation of human airway smooth muscle cells*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 1014-20.
214. Kay, A.B., *The early history of the eosinophil*. Clin Exp Allergy, 2015. **45**(3): p. 575-82.

215. Uhm, T.G., B.S. Kim, and I.Y. Chung, *Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma*. Allergy Asthma Immunol Res, 2012. **4**(2): p. 68-79.
216. Zhang, D.E., et al., *Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 569-74.
217. Hirasawa, R., et al., *Essential and instructive roles of GATA factors in eosinophil development*. J Exp Med, 2002. **195**(11): p. 1379-86.
218. Nerlov, C. and T. Graf, *PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors*. Genes Dev, 1998. **12**(15): p. 2403-12.
219. Rosenberg, H.F., S. Phipps, and P.S. Foster, *Eosinophil trafficking in allergy and asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(6): p. 1303-10; quiz 1311-2.
220. Hogan, S.P., et al., *Eosinophils: biological properties and role in health and disease*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(5): p. 709-50.
221. Blanchard, C. and M.E. Rothenberg, *Biology of the eosinophil*. Adv Immunol, 2009. **101**: p. 81-121.
222. Gleich, G.J., D.A. Loegering, and J.E. Maldonado, *Identification of a major basic protein in guinea pig eosinophil granules*. J Exp Med, 1973. **137**(6): p. 1459-71.
223. Olsson, I. and P. Venge, *Cationic proteins of human granulocytes. II. Separation of the cationic proteins of the granules of leukemic myeloid cells*. Blood, 1974. **44**(2): p. 235-46.
224. Carlson, M.G., C.G. Peterson, and P. Venge, *Human eosinophil peroxidase: purification and characterization*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1875-9.
225. Olsen, R.L. and C. Little, *Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood*. Biochem J, 1983. **209**(3): p. 781-7.
226. Durack, D.T., et al., *Purification of human eosinophil-derived neurotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(8): p. 5165-9.
227. Gleich, G.J. and C.R. Adolphson, *The eosinophilic leukocyte: structure and function*. Adv Immunol, 1986. **39**: p. 177-253.
228. Halwani, R., et al., *Eosinophils induce airway smooth muscle cell proliferation*. J Clin Immunol, 2013. **33**(3): p. 595-604.
229. Kay, A.B., *The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma*. Trends Mol Med, 2005. **11**(4): p. 148-52.
230. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *Novel functions of the CD34 family*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 22): p. 3683-92.
231. Furness, S.G. and K. McNagny, *Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis*. Immunol Res, 2006. **34**(1): p. 13-32.
232. Alfaro, L.A., et al., *CD34 promotes satellite cell motility and entry into proliferation to facilitate efficient skeletal muscle regeneration*. Stem Cells, 2011. **29**(12): p. 2030-41.
233. Drew, E., et al., *CD34 is a specific marker of mature murine mast cells*. Exp Hematol, 2002. **30**(10): p. 1211-8.
234. Radinger, M., et al., *Eotaxin-2 regulates newly produced and CD34 airway eosinophils after allergen exposure*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **113**(6): p. 1109-16.
235. Ladeby, R., et al., *Proliferating resident microglia express the stem cell antigen CD34 in response to acute neural injury*. Glia, 2005. **50**(2): p. 121-31.

236. Cheng, J., et al., *Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34*. Blood, 1996. **87**(2): p. 479-90.
237. Blanchet, M.R., et al., *CD34 is required for dendritic cell trafficking and pathology in murine hypersensitivity pneumonitis*. Am J Respir Crit Care Med, 2011. **184**(6): p. 687-98.
238. Dao, M.A., J. Arevalo, and J.A. Nolta, *Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution*. Blood, 2003. **101**(1): p. 112-8.
239. Fackler, M.J., et al., *Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells*. Blood, 1995. **85**(11): p. 3040-7.
240. Nielsen, J.S. and K.M. McNagny, *CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery*. Microcirculation, 2009. **16**(6): p. 487-96.
241. Drew, E., et al., *CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution*. Immunity, 2005. **22**(1): p. 43-57.
242. Drew, E., et al., *CD34 expression by mast cells: of mice and men*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1885-7.
243. Doyonnas, R., et al., *Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4170-8.
244. Blanchet, M.R., et al., *CD34 facilitates the development of allergic asthma*. Blood, 2007. **110**(6): p. 2005-12.
245. Blanchet, M.R., et al., *Loss of CD34 leads to exacerbated autoimmune arthritis through increased vascular permeability*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1292-9.
246. Lortie, K., et al., *CD34 Differentially Regulates Contractile and Non-contractile Elements of Airway Reactivity*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2017.
247. Zeng, R., et al., *Retinoic acid regulates the development of a gut-homing precursor for intestinal dendritic cells*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(4): p. 847-56.
248. Mach, N., et al., *Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand*. Cancer Res, 2000. **60**(12): p. 3239-46.
249. Fischer, A.H., et al., *Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4986.
250. Sorgi, C.A., et al., *Dormant 5-lipoxygenase in inflammatory macrophages is triggered by exogenous arachidonic acid*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 10981.
251. Delgado, E., et al., *Mature dendritic cells respond to SDF-1, but not to several beta-chemokines*. Immunobiology, 1998. **198**(5): p. 490-500.
252. Jiang, A., et al., *Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 610-24.
253. Siddiqui, K.R., S. Laffont, and F. Powrie, *E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 557-67.
254. Wen, T., et al., *Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 6067-72.
255. Sansom, D.M., C.N. Manzotti, and Y. Zheng, *What's the difference between CD80 and CD86?* Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 314-9.

256. Furuhashi, K., et al., *Mouse lung CD103+ and CD11bhigh dendritic cells preferentially induce distinct CD4+ T-cell responses*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **46**(2): p. 165-72.
257. Kowalski, P.J., M.A. Rubin, and C.G. Kleer, *E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases*. Breast Cancer Res, 2003. **5**(6): p. R217-22.
258. Copas, J.L., P. Borgeat, and P.J. Gardiner, *THE ACTIONS OF 5-HETE, 12-HETE, AND 15-HETE ON TRACHEOBRONCHIAL SMOOTH-MUSCLE*. Prostaglandins Leukotrienes and Medicine, 1982. **8**(2): p. 105-114.
259. Chadderdon, S.M., et al., *Vasoconstrictor eicosanoids and impaired microvascular function in inactive and insulin-resistant primates*. International Journal of Obesity, 2016. **40**(10): p. 1600-1603.
260. Kidson-Gerber, G., et al., *Serum Thromboxane B-2 Compared to Five Other Platelet Function Tests for the Evaluation of Aspirin Effect in Stable Cardiovascular Disease*. Heart Lung and Circulation, 2010. **19**(4): p. 234-242.
261. Turcotte, C., et al., *Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites*. Journal of Leukocyte Biology, 2015. **97**(6): p. 1049-1070.
262. Oka, S., et al., *Involvement of the cannabinoid CB2 receptor and its endogenous ligand 2-arachidonoylglycerol in oxazolone-induced contact dermatitis in mice*. Journal of Immunology, 2006. **177**(12): p. 8796-8805.
263. Dalli, J., et al., *Maresin conjugates in tissue regeneration biosynthesis enzymes in human macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(43): p. 12232-12237.