

APR PRIMEQUAL 2

Effets des particules diesel sur le développement de la réaction inflammatoire allergique

Mots-clés : Asthme, allergie, diesel, chimiokines, cellules Th-2

Résumé du projet de recherche et résultats attendus :

Différents facteurs peuvent être impliqués dans la recrudescence des maladies respiratoires allergiques, observée au cours des 20 dernières années. Les particules diesel sont capables d'augmenter la synthèse d'IgE, un des marqueurs de la réaction allergique, et pourraient entraîner une aptitude accrue de l'appareil respiratoire à développer ou potentialiser une sensibilité allergique à divers allergènes. La maladie asthmatique est caractérisée par l'afflux au niveau bronchique de lymphocytes Th-2 responsables de la sécrétion de cytokines favorisant la synthèse d'IgE (IL-4) et le recrutement d'éosinophiles (IL-5). Le but de ce travail est de démontrer que les particules diesel, et plus particulièrement les hydrocarbures polyaromatiques, sont capables d'induire le recrutement préférentiel de lymphocytes Th2 par le biais d'une production accrue de chimiokines, molécules connues pour leur capacité d'attraction des cellules inflammatoires. Ces aspects seront évalués d'une part in vitro sur des cellules de sujets allergiques exposées au diesel et à l'allergène relevant, d'autre part in vivo, dans un modèle de souris SCID humanisées allergiques et soumises à une exposition aux particules diesel. Le résultat attendu est la démonstration de la capacité du diesel à induire des chimiokines pro-Th-2, favorisant la recrudescence des maladies allergiques.

Responsables scientifiques

Benoît Wallaert

PU-PH

Universitaire

Unité INSERM 416, Institut Pasteur de Lille

BP 245

59019 Lille Cedex

Tel : 03 20 44 50 36

Fax : 03 20 44 66 93

E mail : b.wallaert@nordnet.fr

Anne Tsicopoulos

CR1, pneumologue

INSERM

Tel : 03 20 87 78 80

Fax : 03 20 87 73 45

E mail : anne.tsicopoulos@pasteur-lille.fr

Organismes partenaires : Institut Pasteur de Lille, INSERM U 416, CHRU de Lille

1. Justifications du projet de recherche

a) Situation actuelle du sujet, bibliographie

L'appareil respiratoire est la *cible privilégiée des polluants atmosphériques*. Dix à 14 mille litres d'air transitent chaque jour par nos voies aériennes, et la zone d'échange alvéolaire déployée couvrirait de 80 à 100 m², ce qui en fait la plus large surface de contact entre notre organisme et l'environnement dans lequel nous vivons. Différents facteurs peuvent être impliqués dans la recrudescence des maladies respiratoires allergiques, observée au cours des dernières années. L'augmentation de la charge allergénique a été suggérée comme une explication possible; cependant il semble peu probable qu'elle soit responsable de la prévalence accrue des maladies allergiques (Emmanuel, 88). Par contre, des études épidémiologiques ont montré un lien entre les polluants atmosphériques et l'accroissement de l'incidence et de la morbidité des maladies allergiques des voies aériennes (Corbo, JACI,93; Bascom, ARRD, 1991). Un des composants majeurs de la pollution inhalée dans les zones industrialisées est constitué par les particules de diesel et leurs hydrocarbures polycycliques aromatiques. Le parc automobile français est en augmentation constante, avec une progression des véhicules diesel très importante : de un peu moins de 9% en 1981, ils sont passés à 30% du parc automobile en 1994. La France est le pays comportant le plus fort taux de diesélisation en Europe.

L'asthme est une affection fréquente caractérisée par une inflammation bronchique et une réponse bronchospastique anormale aux allergènes et aux irritants traduisant une réactivité anormale de la bronche de l'asthmatique. L'asthme est fréquent (4-6% de la population française), parfois sévère (2000 morts par an en France) et coûteux (8 milliards de francs par an environ). Les deux éléments majeurs de la physiopathologie de l'asthme sont une production accrue d'IgE spécifiques de l'allergène capable d'activer les cellules effectrices de type mastocyte et basophile, et une expression préférentielle par les lymphocytes d'un profil de cytokines de type Th-2 (IL-4 et IL-5) qui est responsable de l'accroissement de la production d'IgE et du recrutement et de l'activation des éosinophiles, cellules impliquées dans les dommages de l'épithélium respiratoire. L'on sait que les particules diesel sont capables d'augmenter la synthèse d'IgE in vitro, mais également in vivo dans des modèles animaux (Diaz-Sanchez, JCI, 94; Takenaka, JACI, 1995, Takafuji, JACI, 87). Le diesel augmente également la production de cytokines en particulier de type Th-2, et active directement les cellules effectrices de la réaction allergique telles que les éosinophiles (Diaz Sanchez, JACI, 96, Terada, IAAI 97). Ces particules pourraient entraîner une aptitude accrue de l'appareil respiratoire à développer ou potentialiser une sensibilité allergique à divers allergènes, expliquant la fréquence accrue de l'asthme.

Dans le laboratoire, nous nous sommes intéressés *à l'effet du diesel sur la première étape de la réaction inflammatoire allergique* qui est l'attraction des cellules au site de la réaction inflammatoire par des molécules chimiotactiques, les chimiokines. Parmi celles-ci, nous avons étudié l'IL-8 surtout actif sur les neutrophiles, le MCP-1 actif sur les monocytes, et le RANTES actif sur les lymphocytes, monocytes et éosinophiles. Il a été montré que les hydrocarbures de particules diesel (DEP-PAH) sont capables d'activer les cellules mononucléées (CMN) de sujet normaux qui relarguent de l'IL-8 et du RANTES alors qu'il y a une inhibition de la production de MCP-1. L'analyse fonctionnelle des surnageants de CMN stimulées par le diesel montre que dans un test de chimiotaxie ces surnageants attirent de façon importante les neutrophiles et les eosinophiles, confirmant que l'induction de la production de chimiokines est un des mécanismes impliqués dans le recrutement de cellules inflammatoires et ce même chez des sujets non allergiques (Fahy, JACI,99). Dans un second temps, nous avons analysés les mêmes paramètres mais chez des sujets allergiques. En état de base les mêmes résultats sont observés en terme de relargage de chimiokines. Or, quand on stimule les CMN par l'allergène relevant et le diesel, on constate une très importante potentialisation de la production de ces chimiokines qui peut être multipliée par 5. L'étude des voies d'activation cellulaire a montré que la production des chimiokines induite par le diesel est dépendante des MAP kinases et en particulier des kinases p38 et erk 1/2 (Fahy, AJRMB, 2000).

L'amplification de la production de chimiokines en conjonction avec l'allergène pourrait en partie expliquer les exacerbations cliniques de l'asthme en relation avec la pollution.

Certaines chimiokines ont la particularité de recruter de façon préférentielle les sous-populations lymphocytaires Th-2 (productrices d'IL-4 et d'IL-5 impliquées dans l'asthme) ou Th-1 (productrices d'IL-2 et d'IFN- γ contre balançant les effets Th-2). Ce recrutement préférentiel est lié à l'existence à leur surface de récepteurs pour certaines chimiokines en particulier CCR3, CCR4 et CCR8 sur les Th-2 et CCR5 et CXCR3 sur les Th-1. Les ligands préférentiels de ces récepteurs, permettant l'attraction de ces sous populations, sont l'éotaxine pour le CCR3, le MDC et le TARC pour le CCR4, l'I-309 pour le CCR8, et l'IP-10 et le MIG pour le CXCR3 (Syrbe, SSI, 1999). D'autres chimiokines présentent un intérêt notamment le PARC ou Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine. Celle-ci est produite par les cellules mononucléées et les macrophages et est chimiotactique pour les lymphocytes mais pas pour les monocytes. De plus PARC a la particularité d'être inductible par les cytokines de type 2 notamment l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10; il est par contre inhibé par les cytokines de type 1 telles l'IFN- γ (Politz, cytokine, 2000).

Nous nous proposons donc d'étudier l'effet du diesel sur notamment les chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules Th-2, ce qui pourrait favoriser le développement de la réaction allergique.

2. Plan de Recherche détaillé

a) Objectif général, résultats attendus, aspects innovants

L'étude proposée a pour but de préciser si les particules de diesel associées ou non à l'allergène peuvent, par le biais des phagocytes mononucléés, attirer *directement* des lymphocytes de type Th-2 (impliqués dans le développement de la réaction allergique) par l'induction de chimiokines.

Si cette hypothèse est confirmée, comme le laisse présager quelques résultats préliminaires, il s'agirait de la première démonstration d'un effet du diesel sur la production de chimiokines pro-Th-2. Il s'agirait d'un argument supplémentaire en faveur de l'implication de la pollution par le diesel dans la recrudescence actuelle des maladies allergiques.

b) Sites et cas retenus

L'étude sera réalisée au sein de l'unité INSERM 416 dirigée par A.B. Tonnel située à l'Institut Pasteur de Lille. Les patients allergiques ou non seront recrutés au Centre Hospitalier et Universitaire de Lille, dans le service de la Clinique des maladies respiratoires, à l'hôpital Calmette.

c) Programme de travail

1. Induction de chimiokines pro Th-2 par les cellules mononucléées (CMN) stimulées par le diesel (1ère année)

Plusieurs chimiokines seront évaluées : l'eotaxine, TARC, MDC, I-309 et PARC pour leurs propriétés pro-Th-2. Un effet inhibiteur sur la production de chimiokines pro-Th-1, telles l'IP-10 et le MIG, sera également recherché.

Les CMN de sujets allergiques et de sujets témoins, à une concentration de 2×10^6 /ml seront stimulées en présence d'allergène et/ou d'extraits de diesel (DEP-PAHs) pendant le temps optimal déterminé dans des expériences préliminaires. Les surnageants des cultures seront récupérés, aliquotés et congelés jusqu'à leur dosage par ELISA utilisant des kits commerciaux (R & D, UK). Les cellules seront lysées en présence de Trizol, permettant la récupération des ARN totaux

correspondants. L'expression de l'ARN messager pour les diverses chimiokines sera évaluée en utilisant une technique de RT-PCR après mise au point des conditions optimales de PCR pour chaque chimiokine.

2. Mécanisme impliqué (1ère année)

Certaines cytokines sont capables d'induire des chimiokines ainsi que l'expression de leur récepteurs. C'est notamment le cas de l'IL-4 et de l'IL-13 qui induisent la production d'éotaxine, de MDC et de PARC. L'IFN- γ a l'effet inverse sur ces chimiokines alors qu'il induit l'expression d'IP-10 et MIG. Afin de voir si l'effet du diesel sur l'induction de chimiokines au niveau des CMN passe par une production de cytokines des anticorps neutralisants de ces différentes cytokines seront utilisés. Des études cinétiques seront également effectuées avec évaluation des cytokines et chimiokines impliquées en protéine et en ARN messager.

3. Effet fonctionnel de l'induction de ces chimiokines sur l'attraction in vitro des sous-populations lymphocytaires Th-1 ou Th-2 (1ère année)

Deux types de lymphocytes Th-1 ou Th-2 seront utilisés, d'une part des sous-populations différenciées à partir du sang périphérique par un cocktail de cytokines, d'autre part des clones Th-1 ou Th-2 fournis grâce à une collaboration avec Hans Yssel (U454 INSERM, Montpellier). Des cellules CD4⁺CD45RO⁻ purifiées à partir du sang périphérique seront stimulées par un anticorps anti-CD3 et incubées soit en présence d'IL-4 et d'anti IL-12 pour la différenciation Th2, soit en présence d'IL-12 et d'anti-IL-4 pour la différenciation Th-1. Après 10 jours de culture, leur profil de cytokines sera évalué en cytométrie de flux (secretion assay Miltenyi) et par dosage ELISA (Biosource international) afin de vérifier leur polarisation. Quant aux clones lymphocytaires Th-1 et Th-2 obtenus à partir de la peau, ils seront directement testés en chimiotaxie vis-à-vis de surnageants de CMN ou de macrophages alvéolaires stimulés par le diesel. La technique classique de la chambre de Boyden sera utilisée pour ces tests in vitro.

4. Analyse du type de récepteur chimiokinique impliqué (2nde année)

- *Analyse de l'expression des récepteurs de chimiokines par FACS*

Après stimulation de façon cinétique en présence de diesel plus ou moins allergène, les CMN seront analysées en cytométrie de flux pour l'expression des récepteurs spécifiques des Th-1, le CCR5 et

le CXCR3 et pour les récepteurs spécifiques des Th-2 le CCR3, CCR4 et CCR8. L'analyse des récepteurs se fera sur les populations lymphocytaires et monocytaires isolées visuellement par leurs propriétés de taille et de densité.

- *Analyse de l'expression d'ARN messager des récepteurs*

Sur les mêmes cultures les cellules seront lysées en trizol et l'ARN extrait. Les différents récepteurs seront évalués par RT-PCR de façon semi-quantitative. Ceci permettra d'apprécier si les variations observées à la surface sont le résultat d'une modification endogène de synthèse ou si elles sont liées à une interaction avec le ligand naturel.

- *Participation fonctionnelle des récepteurs dans le recrutement Th-1/Th-2*

Deux types d'approche pourront être utilisées. D'une part l'existence pour certains récepteurs d'anticorps neutralisants permettra d'évaluer leur implication dans l'effet chimioattractant des surnageants de CMN ou de macrophages stimulés par le diesel, sur les sous-populations Th-1/Th-2 par les tests de chimiotaxie précédemment décrits. D'autre part nous disposons au laboratoire de vecteurs d'expression contenant les cDNA codant pour le CCR1, CCR2, CCR3, CCR4 et CCR5 (fournis par le NIH AIDS Reagent reference program). La transfection de ces vecteurs dans une cellule eucaryote permet d'obtenir des cellules exprimant uniquement le récepteur considéré. Ces transfectants seront utilisés pour tester l'effet chimioattractant des surnageants sur chaque récepteur individuellement.

5. Attraction in vivo des sous populations lymphocytaires Th-1 ou Th-2 dans le modèle de la souris SCID humanisée après inhalation de particules diesel (2nde année)

Les souris CB17 *scid/scid* homozygotes pour la mutation *scid* (Bosma, Nature, 1983) ne possèdent pas de lymphocytes T et B matures fonctionnels. Cette mutation aboutit à un réarrangement aberrant des gènes à la fois du récepteur lymphocytaire T pour l'antigène et des immunoglobulines. Ces souris tolèrent donc le non soi et sont incapables de rejeter des transplants allogéniques ou xénogéniques. Elles représentent de ce fait un modèle de choix de reconstitution immunologique.

Les expériences menées dans le laboratoire montrent que des souris SCID reconstituées avec des cellules de patients allergiques et stimulées par voie intra-péritonéale ou par voie d'inhalation développent une synthèse d'IgE humaines (Pestel, JI, 94). Quand ces souris sont stimulées par voie d'aérosol, un infiltrat de cellules humaines est observé au niveau pulmonaire (Duez, EJI, 96).

Grâce au modèle de la souris SCID humanisée allergique, il est possible d'analyser in vivo, plusieurs aspects de la réponse allergique humaine face à la pollution par les particules diesel. Les souris SCID allergiques sont stimulées par l'allergène spécifique par voie aérienne. Pour uniformiser la distribution de l'allergène et des particules diesel la voie intratrachéale sera utilisée pour les deux expositions. Après traitement avec un Ac anti NK facilitant le développement des cellules humaines, les souris seront reconstituées avec des sous-populations lymphocytaires T polarisées in vitro vers un profil Th-1 ou Th-2 selon les modalités précédemment décrites et provenant d'un donneur allergique, et immédiatement stimulées par voie intratrachéale par l'allergène spécifique et les particules de diesel.

Quatre groupes de 10 souris chacun seront évalués : 2 groupes recevant l'allergène ou les particules de diesel seules, un groupe recevant les 2 produits, et un groupe ne recevant aucun produit. L'effet de l'exposition aux particules diesel sera évalué sur la quantification de l'infiltrat cellulaire pulmonaire apprécié par immunocytochimie pour différents marqueurs humains (lymphocytes CD4, CD8, leucocytes CD45, basophiles, marqueurs d'activation lymphocytaires, éosinophiles), et sur l'expression des ARN messagers au niveau pulmonaire codant pour les cytokines de type 1 (IFN- γ et IL-2) ou 2 (IL-4 et IL-5). Ceci permettra d'évaluer si le diesel recrute effectivement plus de cellules Th-2 que Th-1 dans un modèle in vivo proche de l'homme.

d) Composition et responsabilité de chaque partenaire

- CHRU de Lille, Clinique des maladies respiratoires

B Wallaert : recrutement des patients et responsable scientifique

- Institut Pasteur de Lille (A Capron, directeur)

: rémunération d'un technicien, mise à disposition de frais de fonctionnement

- U416 INSERM (AB Tonnel, directeur), lieu de réalisation des travaux

A Tscopoulos : responsable scientifique

II. DIFFICULTES RENCONTREES

Les parties in vitro ont été menées selon le projet présenté en 2001 et se sont étalées sur l'année 2002 et 2003. Cependant le financement des projets ayant été retardé (prévu du 22/01/2003 au 21/01/2005), l'étudiante qui s'occupait de ce programme a passé sa thèse en Septembre 2003, et avait juste commencé les expériences in vivo sur les souris SCID. Des vacances étaient prévues pour la suite du programme, cependant elles avaient été demandées pour un niveau thèse, et il nous

a fallu un an pour trouver quelqu'un avec le profil correspondant (Chang Ying, étudiante en thèse chinoise). C'est la raison pour laquelle, nous avons demandé une prolongation du programme d'un an jusqu'au 21/01/2006. Cette personne n'ayant pas la qualification pour travailler sur les animaux, elle a poursuivi le programme par une partie qui n'avait pas été énoncée dans la demande initiale à savoir l'effet des particules diesel sur la génèse des maladies allergiques (voir résultats).

Au total, le projet présenté a été réalisé en entier pour la partie *in vitro*, partiellement pour la partie *in vivo*, mais une étude supplémentaire a été rajoutée.

III RESULTATS

On note depuis une vingtaine d'année une recrudescence des maladies allergiques dont un des facteurs favorisant pourrait être l'exposition au diesel. La réaction allergique est caractérisée par l'afflux au niveau bronchique de lymphocytes Th-2

, responsables de la sécrétion de cytokines favorisant la synthèse d'IgE (IL-4) et le recrutement d'éosinophiles (IL-5).

L'objectif de ce travail est d'apprécier si les particules de diesel et plus particulièrement les hydrocarbures aromatiques, pouvait induire le recrutement préférentiel de lymphocytes Th2, cellules fortement impliquées dans les maladies allergiques et notamment l'asthme.

L'intérêt de notre étude s'est focalisé sur l'effet dérégulateur des émissions diesel sur la modulation d'expression de chimiokines, qui ont la particularité de recruter de façon préférentielle les sous populations lymphocytaires Th2 (productrices d'IL-4 et d'IL-5 impliqués dans l'asthme) ou Th1 (productrices d'IL-2 et d'IFN γ contre balançant les effets Th2).

Notre travail sur les modulations de l'expression de chimiokines par le diesel combiné ou non à l'allergène a permis de réunir toute une série de résultats ayant donné lieu à 2 publications dans des journaux spécialisés et une en cours de soumission.

Nous avons choisi de travailler avec des extraits organiques des particules de diesel, réalisés avec un solvant (le dichlorométhane), car si le corps carboné de ces particules apparaît important pour les possibles effets cancérigènes ou dans les études conduites *in vitro* avec des cellules de structure, il semble bien que ce soit ces hydrocarbures adsorbés qui soient responsables de la plupart des effets sur les paramètres de la réaction inflammatoire (Boland, 99).

Nous avons adopté les doses de 50 à 100 ng de DEP-PAHs/ml (ou 50 à 100 ng/million de cellules mononucléées ou de macrophages alvéolaires) dans l'ensemble de nos travaux. On peut se poser la question de la pertinence physiologique d'une telle concentration. Une étude menée à Tokyo

a calculé que la concentration moyenne annuelle en DEPs est de $24 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (soit 40% de la masse particulaire totale) (Yoshizumi, 89). On peut considérer, au vu de leur taille moyenne, que 25% des particules de diesel se déposent dans le système respiratoire (Heyder, 87). Puisque nous respirons 15 à 20 m^3 d'air par jour, nous sommes susceptibles de voir environ 0.1 mg de DEPs se déposer dans nos voies respiratoires (il est intéressant de noter qu'à Los Angeles, cette valeur est estimée à 0.3mg (Diaz-Sanchez, 94), ce qui est assez concordant). Puisque les DEP-PAHs représentent près de 40% de la masse des DEPs récupérées sur les filtres (Takenaka, 95), on peut obtenir une valeur de $40 \mu\text{g}$ par période de 24h. Un individu moyen possède environ 1 milliard de macrophages dans ses poumons. On obtient donc une valeur de 40 ng de DEP-PAHs par million de macrophages, ce qui est tout à fait dans l'ordre de grandeur des concentrations utilisées dans cette étude. Pour les cellules mononucléées, ce calcul s'avère beaucoup plus difficile à réaliser, mais le fait que l'on obtienne une dose-réponse avec des concentrations croissantes de DEP-PAHs permet de penser que l'on se trouve à des niveaux physiologiquement représentatifs.

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

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

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

Les chimiokines sont des molécules pluripotentes, avec de multiples cibles cellulaires, responsables pour une large part du recrutement des cellules de l'immunité et de leur activation à un stade très précoce de la réaction inflammatoire. Nous pensons que les altérations du métabolisme des chimiokines par le diesel sont un des mécanismes par lesquels le diesel a une action directe sur les cellules immunitaires, induisant et exacerbant ainsi la réponse inflammatoire.

Pour les travaux utilisant l'allergène majeur de dermatophagoides pteronyssinus, Der p 1, nous avons opté pour une dose de 100 ng/ml. Cette protéine est purifiée sur colonne d'affinité en utilisant un anticorps spécifique, à partir d'extraits d'acariens. Elle est ensuite passée sur colonne de polymixine B afin d'éliminer les possibles contaminations en LPS. La concentration choisie peut facilement être rencontrée lors d'une exposition naturelle (Rusznak, 99).

1) Le diesel favorise le recrutement de lymphocytes Th-2 par les CMN et macrophages alvéolaires (MA) de patients allergiques en régulant différenciellement la production de MDC et d'IP-10

Dans cette première partie de notre projet, nous nous sommes focalisés sur la chimiokine MDC (attirant les Th2 par le CCR4) et IP-10 (attirant les Th1 par le CXCR3). Les patients sélectionnés présentaient tous un asthme allergique aux acariens .

a) Le diesel potentialise sélectivement la production de MDC induite par l'allergène et diminue le relargage d'IP-10 par les CMN et MA.

La production de MDC et d'IP-10 a été évaluée au niveau de CMN ou de MA de sujets allergiques stimulés in vitro par Derp 1 plus ou moins associé aux DEP-PAH. Les DEP-PAH seuls diminuent la production constitutive d'IP-10, mais n'ont pas d'effet sur la production de MDC. Cependant quand ils sont associés à la stimulation allergénique, les DEP-PAH potentialise la production de MDC induite par Derp 1. Ces effets sont également retrouvés en au niveau de l'expression des ARN messagers, montrant que la régulation par le diesel agit aussi bien au niveau transcriptionnel que traductionnel.

b) La double stimulation diesel et allergène induit une activité chimiotactique pour les cellules Th2

L'effet chimiotactique global des surnageants cellulaires a été testé en chimiotaxie et il s'avère que la double stimulation DEP-PAH et Derp 1 permet le recrutement de clones Th-2 mais pas Th-1. Le recrutement des cellules Th-2 est partiellement inhibé par un anticorps anti-MDC laissant à penser que d'autres facteurs pro-Th-2 sont impliqués. Cependant la production de TARC et d'éotaxine (deux autres chimiokines pro-Th2) ne sont pas modifiés par le diesel.

Ces données suggèrent que le diesel pourrait intensifier une réaction allergique en cours, en partie en l'augmentant la production de MDC favorisant ainsi le recrutement des Th-2.

c) La potentialisation de la production de MDC par le diesel passe par la voie CD28 mais pas par les cytokines.

Le mécanisme d'induction de MDC nécessite la présence de l'allergène : dans un premier temps nous avons testé l'hypothèse d'un mécanisme passant par les cytokines de type Th-2. En effet l'IL-4 et l'IL-13 sont des facteurs d'induction de MDC, et l'allergène est capable de stimuler la production d'IL-4. Des expériences de cinétique ont montré qu'il n'y avait pas de variation d'ARNm pour l'IL-4 ou l'IL-13 avant l'apparition de MDC. De plus des anticorps neutralisant anti-IL-4 ou anti-IL-13 n'inhibent pas la production de MDC induite par l'association DEP-PAH/Dep 1. Les chimiokines peuvent également être induites par la voie CD28 qui est aussi utilisée par l'allergène, or il s'avère qu'une protéine de fusion (CTLA-4-Ig) bloquant la voie CD28 inhibe la production de MDC amplifiée par les DEP-PAH. La voie CD28 au niveau des lymphocytes T peut être activée par plusieurs ligands, notamment CD80 et CD86 exprimés au niveau des cellules présentatrices d'antigène. Des inhibiteurs spécifiques de ces deux ligands ont été utilisés et montrent que c'est la voie CD86 qui est impliquée dans l'induction de MDC par Dep 1 et la voie CD80 dans l'amplification de la production de MDC par le diesel.

Au total, le diesel agit en régulant la production de chimiokines particulières amplifiant la polarisation Th-2 soit directement comme par l'augmentation de MDC soit indirectement en diminuant la production de chimiokines pro-Th-1 (comme l'IP-10), et pourrait donc exacerber la réaction allergique et par là même la sévérité des symptômes. Il est intéressant de noter que ces effets sont aussi retrouvés au niveau des macrophages alvéolaires, qui constituent une des premières cellules en contact avec la pollution extérieure, dysrégulation qui se produit donc directement au niveau pulmonaire.

Ce travail a été publié en 2002 dans le *Journal of Immunology* :

Fahy O, Senechal S, Pene J, Scherpereel A, Lassalle P, Tonnel AB, Yssel H, Wallaert B, Tsicopoulos A.

Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by differentially regulating macrophage-derived chemokine and IFN-gamma-induced protein-10 production.

J Immunol. 2002 Jun 1;168(11):5912-9.

Il a également fait l'objet d'une présentation dans un congrès international et a été publié sous forme d'abstract

Senechal S, Fahy O, Pene J, Tonnel AB, Yssel H, Wallaert B, Tsicopoulos A.

Diesel exposure favours Th-2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by dysregulating MDC and IP-10 production.

J. Allergy Clin. Immunol., 2002, 109 :A164

2) L'exposition au diesel chez le sujet allergique favorise la polarisation Th-2 en induisant des chimiokines pro Th2 et en permettant la clearance des chimiokines Th-1

La seconde partie de ces travaux s'est attachée à rechercher les autres facteurs pouvant expliquer l'attraction des cellules Th-2, puisque le MDC seul ne suffit pas à expliquer la totalité de cet effet. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'I-309, chimiokine attirant les Th-2 par le récepteur CCR8, et au MIG, chimiokine attirant les Th-1 par le CXCR3. D'autres chimiokines présentent un intérêt notamment le PARC ou Pulmonary and Activation-Regulated Chemokine. Celle-ci est produite par les cellules mononucléées et les macrophages et est chimiotactique pour les lymphocytes mais pas pour les monocytes. De plus PARC a la particularité d'être inductible par les cytokines de type 2 notamment l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-10; elle est par contre inhibée par les cytokines de type 1.

a) Le diesel mais pas l'allergène induit le relargage d'I-309 par les CMN de patients asthmatiques, mais les deux stimuli favorisent la production de MIG et de PARC.

Parmi les chimiokines associées au profil Th-2, l'I-309 est induit exclusivement par le diesel et de façon prolongée, l'allergène n'ayant aucun effet. Les deux stimuli induisent la production de PARC après 48 hr de stimulation, et de façon contradictoire on note une augmentation de MIG présente uniquement à 24 hr. Malgré la présence de la chimiokine pro-Th-1 MIG, l'effet fonctionnel est une attraction de cellules Th-2 que ce soit pour des surnageants après 24 ou 48 hr de stimulation, qui est fortement diminuée par un mélange d'anticorps neutralisants anti-MDC et anti I-309, montrant que ces deux chimiokines sont majoritairement responsables de l'effet pro-Th-2.

b) Le diesel uprégule les récepteurs de chimiokines associés aux lymphocytes Th-1 mais pas Th-2

Notre hypothèse était que le diesel pourrait également favoriser le recrutement de cellules Th-2, soit en augmentant l'expression des récepteurs de chimiokines exprimés sur les cellules Th-2 (CCR3, CCR4 et CCR8), soit en diminuant l'expression des récepteurs de chimiokines exprimés sur les cellules Th-1 (CXCR3, CCR5, et CXCR6).

Nous avons évalué leur expression en ARNm sur la population totale de CMN de sujets allergiques, ne distinguant pas les différentes sous-populations. Par contre pour leur

expression en surface, nous avons utilisé un triple marquage afin de distinguer les monocytes, des lymphocytes.

Aucune modulation d'expression n'a été observée à la surface des monocytes, que ce soit celle de CCR4, CCR5 et CXCR3 qui sont tous 3 exprimés à la surface de ce type cellulaire.

Nous n'avons observé aucune hausse d'expression des récepteurs associés à un profil Th2, notamment en réponse à l'allergène, probablement du au fait que les cellules Th2 représentent qu'un faible pourcentage des cellules circulantes, ne permettant pas l'observation de variations significatives, dans notre étude.

Etonnamment, l'expression CXCR3 et CCR5 est augmentée au niveau des cellules T stimulées par le diesel, ceci de façon tardive, mais n'est pas modulée par l'allergène, suggérant un mécanisme spécifique d'une activation par le diesel, mais ce mécanisme reste à déterminer.

Pour évaluer la fonctionnalité de cette augmentation des récepteurs chimiokiniques de type Th-1, les lymphocytes T stimulés 48 heures par le diesel ont testés en chimiotaxie vis-à-vis des ligands du CXCR3, le MIG et l'IP-10. De façon surprenante, il apparaît que ces lymphocytes ne sont pas attirés par ces ligands, bien qu'ils migrent de façon normale à d'autres chimiokines telles que le SDF-1. Ces résultats montrent que le récepteur CXCR3 bien qu'augmenté en expression de surface est en fait déconnecté de la voie de transduction induisant la migration cellulaire. Ce phénomène a été décrit précédemment comme un mécanisme d'élimination de manière à capturer le ligand correspondant (D'Amico, Frascaroli et al. 2000). Ceci pourrait expliquer la disparition de MIG à 48 heures, par capture tardive, permettant un effet favorable du diesel sur l'activité chimiotactique sélective vis-à-vis des cellules Th2. Cette augmentation du CXCR3, pourrait ainsi contribuer à une hausse de la clairance des chimiokines pro-Th1, ce qui expliquerait la diminution de production de ces chimiokines à 48h.

Le diesel favorise la balance vers la polarisation Th-2 chez le sujet allergique en induisant la production de chimiokines pro-Th-2 mais aussi en favorisant la clearance des chimiokines pro-Th-1 par le biais d'une augmentation des récepteurs chimiokiniques de type Th-1.

Au total, le diesel met donc en jeu plusieurs mécanismes de régulation, pour favoriser une réponse de type Th2, chez des sujets allergiques :

- D'une part, l'augmentation et l'induction de la production de chimiokines associées au profil Th2, telles que MDC, I-309 et PARC,
- D'autre part, l'inhibition de synthèse de la chimiokine pro-Th1 IP-10

- Enfin, l'induction d'un mécanisme de rétrocontrôle, par augmentation de l'expression des récepteurs de chimiokines, permettant de capturer la chimiokine Th1 MIG, produite malgré tout.

Ainsi, le diesel pourrait affecter différentes étapes de la réaction allergique, en modulant la synthèse de diverses chimiokines attirant spécifiquement les cellules Th2 :

- **Le déclenchement de la réaction allergique**, en accentuant à lui seul la production d'I-309,
- **son amplification**, par le renforcement de la synthèse de MDC induite par l'allergène
- **sa continuité**, par la production tardive de PARC.

Ce travail a été publié dans l'*American Journal of Critical Care and Respiratory Medicine*

Senechal S, de Nadai P, Ralainirina N, Scherpereel A, Vorng H, Lassalle P, Tonnel AB, Tsicopoulos A, Wallaert B.

Effect of diesel on chemokines and chemokine receptors involved in helper T cell type 1/type 2 recruitment in patients with asthma.

Am J Respir Crit Care Med. 2003 Jul 15;168(2):215-21. Epub 2003 Apr 30.

Cette étude a un autre intérêt qui est que pour la première fois en ce qui concerne les chimiokines à potentialité Th-2, le diesel seul a un effet en absence de l'allergène, ce qui laisse à penser que ces phénomènes pourraient également survenir chez le sujet non allergique. Ce volet a constitué la dernière partie rajoutée dans ce projet afin de déterminer si le diesel pouvait favoriser une réaction immune de type Th-2 chez des sujets non allergiques.

3) Effets du diesel *in vivo* dans un modèle de souris SCID humanisée

Grâce au modèle de la souris SCID humanisée, il est possible d'analyser *in vivo*, plusieurs aspects de la réponse allergique humaine face à la pollution par les particules de diesel.

Afin d'évaluer *in vivo* l'effet du diesel, nous avons dans un premier temps, testé divers moyens pour administrer les particules de diesel de façon homogène au niveau pulmonaire. Après plusieurs essais infructueux, une méthode particulière d'injection intratrachéale s'est révélée reproductible et donnant une uniformité de distribution des particules de diesel au niveau pulmonaire.

Des expériences préliminaires sur 36 souris ont été effectuées afin de déterminer la dose de diesel et la cinétique optimales d'induction d'une réponse inflammatoire pulmonaire humaine par voie intratrachéale.

a) Matériel et méthodes

Reconstitution des souris

Des souris C.B. 17 âgées de 5 semaines, élevées dans des conditions stériles strictes (en isolateur) à l'Institut Pasteur de Lille, ont été utilisées dans cette étude. Dans cette étude préliminaire, après un traitement avec un anticorps anti-NK facilitant le développement des cellules humaines, les souris SCID sont reconstituées avec 10×10^6 cellules mononucléées de donneur sain, non allergique, par voie péritonéale, les CMN ayant été purifiées sur gradient de Ficoll.

Schéma expérimental

Afin de déterminer le temps et la dose optimaux de recrutement, des expériences cinétiques et de dose réponse ont été effectuées. Les doses de 50, 125 et 200 μg de particules de diesel ont été administrées, deux fois par semaine à raison d'une, deux ou trois semaines, la première injection se faisant simultanément à la reconstitution des souris. De plus, pour chaque temps, une souris servant de contrôle, a reçu le tampon de dilution des particules de diesel soit du PBS 50 nM à pH 7,4, avec 0,05 % de Tween 80.

Dans ces expériences, 12 groupes de trois souris ont donc été utilisés : trois souris par condition.

Sacrifice des souris et prélèvements d'organes

Les souris sont sacrifiées à une, deux ou trois semaines, les poumons sont récupérés et fixés en PFA 4%, pour étude en immunohistochimie. Les différents fragments obtenus après division des segments pulmonaires (partie supérieure, partie médiane et partie inférieure), ont été inclus dans une résine (OCT) qui est solidifiée par congélation dans l'azote liquide. Les blocs sont gardés à -80°C .

Immunohistochimie

L'infiltrat pulmonaire a été évalué en immunohistochimie sur des coupes transversales des parties médianes de poumon réalisées au cryostat et coupée à 6 μm . Les sections sont ensuite incubées pendant 30 min à température ambiante, avec des anticorps dirigés contre divers marqueurs spécifiques humains: CD45 (Becton Dickinson) reconnaissant les leucocytes, CD68 (Dako) reconnaissant les macrophages et monocytes, HLA DR (Dako) reconnaissant les cellules exprimant cette molécule de classe II à leur surface.

Après 2 lavages en PBS (Tampon phosphate, contenant 10% de Tris HCl 0,5M pH 7,6 et 10% NaCl 1,5M), l'anticorps secondaire, anticorps polyclonal de lapin dirigé contre des Ig de souris est incubé

pendant 30 min. Après 2 lavages en TBS (5 min), une incubation de 30 min est réalisée avec un complexe phosphate Alcaline antiphosphatase alcaline de souris (APAAP).

La révélation enzymatique finale nécessite du Fast Red comme substrat (coloration rouge). La réaction est arrêtée avec de l'eau distillée. Finalement, les noyaux sont contrecolorés à l'hématoxyline pendant 45 sec. Les lames sont ensuite montées en Glycergel et prêtes pour une observation microscopique.

b) Résultats préliminaires

Ces premières expériences montrent tout d'abord que l'injection intratrachéale de particules de diesel permet une bonne pénétration de ces particules au sein de l'appareil pulmonaire (Figure 1).

Cette exposition de diesel entraîne un recrutement cellulaire par rapport au diluant contrôle. On note au niveau des coupes médianes de poumon un recrutement de leucocytes CD45⁺ (figure 2A) et de monocytes/macrophages CD68⁺ (figure 2B). Par contre, aucun recrutement des cellules HLADR⁺ n'est observé. Le recrutement cellulaire constaté apparaît optimal pour la plus faible dose de 50 µg de particules de diesel. De plus, le diesel affecte de façon dose-dépendante le recrutement cellulaire dès la première semaine, et de manière plus irrégulière les semaines suivantes, la cinétique préconisée pour induire un recrutement pulmonaire est donc d'une semaine.

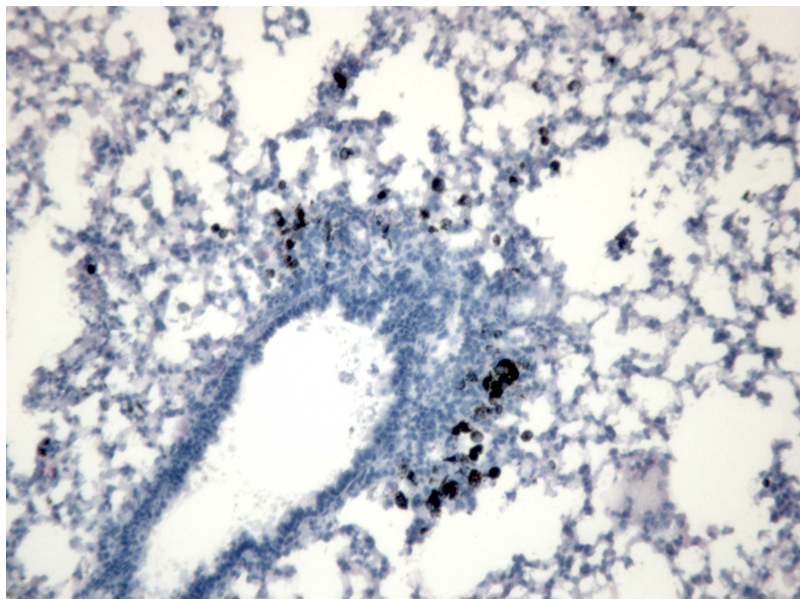


Figure 1 : Photographie d'immunohistochimie d'une section médiane pulmonaire, après injection intratrachéale de particules de diesel, chez une souris SCID humanisée.

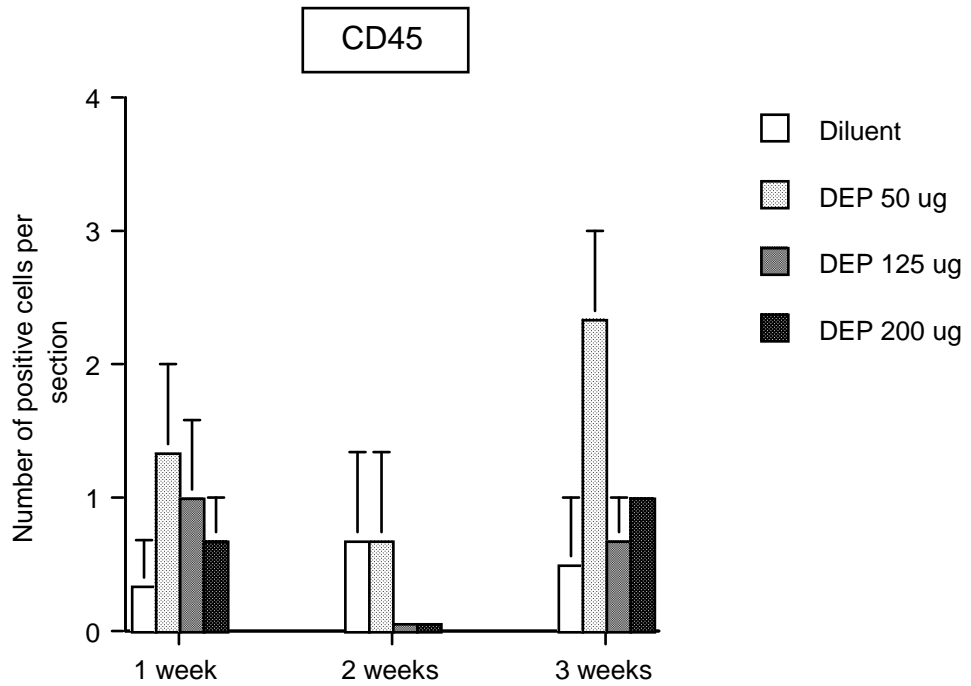
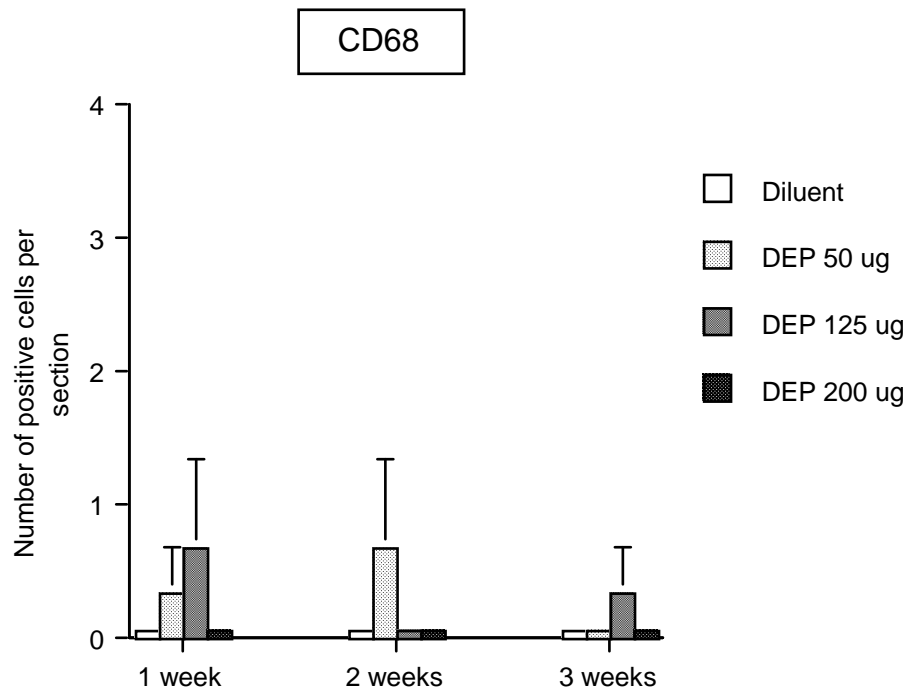
A**B**

Figure 2: Cinétique et dose réponse du recrutement pulmonaire de cellules humaines, après injection intratrachéale de particules de diesel chez une souris SCID humanisée. Les sections médianes pulmonaires murines ont été immunomarquées par des anticorps dirigés contre les leucocytes CD45⁺ humains (A) et contre des monocytes/macrophages CD68⁺ humains (B). Les résultats sont ici exprimés en nombre moyen de cellules positives par coupe pulmonaire, pour 3 souris par condition.

Cette étude préliminaire nous a permis d'apprécier que ces particules de diesel se répartissent uniformément dans tout le poumon et induisent un recrutement de leucocytes et de monocytes-macrophages.

Cependant, ce recrutement reste faible, il faudra donc probablement augmenter la quantité de CMN injectées par souris. En effet, dans cette première étude, nous avons utilisé un faible nombre de cellules (10×10^6) pour pouvoir reconstituer l'ensemble des souris avec des cellules d'un même donneur. La reconstitution optimale et la cinétique ayant été définies, nous pouvons donc utiliser plus de cellules par souris (en général 20×10^6). De plus, ces expériences préliminaires ont été effectuées avec un donneur non allergique, et il est possible qu'avec des donneurs allergiques, le recrutement pulmonaire soit plus important.

En conclusion de cette partie, les premiers résultats étaient encourageants, mais du fait du départ de l'étudiante en thèse qui s'occupait de ce sujet, ce sujet n'a pas été poursuivi. Grâce aux vacances subventionnées par PRIMEQUAL, le projet a été repris un an plus tard, mais sur la partie genèse des réactions allergiques par le diesel.

4) Le diesel favorise chez les sujets normaux le recrutement de cellules Th2 par l'induction de PARC et l'inhibition d'IP-10

Très peu d'études se sont penchées sur la capacité des particules de diesel à induire une réaction allergique de type Th2, sur des sujets non atopiques. Certains travaux montrent que le diesel est capable de générer certains paramètres de la réaction allergique, comme l'induction de médiateurs responsables du recrutement d'éosinophiles (Fahy, Tsicopoulos et al. 1999), de la production d'IgE (Diaz-Sanchez, Dotson et al. 1994), ou encore la libération d'histamine et d'IL-4 par les basophiles (Devouassoux, Saxon et al. 2002).

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet de ces particules sur la modulation d'expression des chimiokines étudiées précédemment chez des CMN des sujets allergiques et recrutant préférentiellement les sous populations lymphocytaires Th2 (MDC, I-309 et PARC) ou Th1 (IP-10 et MIG).

En ce qui concerne les chimiokines associées au profil Th1, les CMN de sujets non atopiques présentent une production spontanée de MIG et d'IP-10, à des taux bien supérieurs à ceux observés pour des CMN de sujets allergiques (Fahy, Senechal et al. 2002; Senechal, De Nadai et al. 2003), suggérant qu'elles puissent participer à la maintenance des réponses

Th1, chez ces sujets non atopiques, comme observé dans d'autres travaux (Gangur, Simons et al. 1999). D'autre part, l'exposition au diesel n'induit aucune modulation d'expression pour MIG, alors qu'il provoque une très forte diminution de la production d'IP-10. Cette baisse de production est observée très tardivement, à 48 heures, suggérant qu'une exposition chronique plus longue soit nécessaire chez ces sujets non atopiques, pour obtenir des effets identiques à ceux observés chez les sujets allergiques. Ceci suggère donc que comme chez les sujets atopiques, le diesel puisse favoriser indirectement une réponse Th2 chez les sujets non atopiques, en diminuant la synthèse de chimiokine pro-Th1, IP-10. Cela montre aussi que la dérégulation de l'IP-10 est bien directement liée au diesel et pas au statut génétique du sujet.

En ce qui concerne les chimiokines associées au profil Th2, l'exposition au diesel n'a aucun effet sur la production d'I-309 et de MDC, par des CMN de sujets allergiques, cependant, nous avons observé une hausse de la synthèse d'I-309 suite à une stimulation diesel chez des sujets allergiques. Ces résultats suggèrent que cette production d'I-309 induite par le diesel, ne soit pas due aux particules de diesel elles-mêmes, mais à une prédisposition génétique liée à leur statut d'allergique.

D'autre part, malgré l'absence de production de chimiokines pro-Th2 connues (I-309 et MDC) (Andrew, Chang et al. 1998; Imai, Nagira et al. 1999; Inngjerdingen, Damaj et al. 2000; Haque, Fallon et al. 2001), l'exposition au diesel de CMN de sujets normaux, provoque un recrutement accru de cellules polarisées Th2, et non Th1, laissant à penser, qu'il y a d'autres chimiokines impliquées que celles déjà connues pour attirer les cellules Th2. Du fait de la présence de PARC dans les surnageants cellulaires, nous avons évalué si cette chimiokine pouvait être à l'origine de cette attraction.

En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisant anti-PARC inhibe fortement l'attraction spécifique de ces cellules Th2 polarisées. Ces résultats suggèrent donc que le récepteur du PARC, encore inconnu, soit exprimé à la surface des cellules Th2, et non pas seulement à la surface de ces cellules T naïves, comme rapporté dans la littérature (Adema, Hartgers et al. 1997), et que le PARC soit un nouveau médiateur impliqué dans le développement des réactions allergiques de type Th2. Ceci a été confirmé récemment dans notre laboratoire (de Nadai et al, 2005).

Par ailleurs nous avons recherché le mécanisme d'induction de la production de PARC par les CMN de sujets non allergiques. Il s'avère que le diesel est capable d'induire de l'IL-13, mais pas d'IL-4 ou d'IL-10, cytokines capables d'induire la production de PARC. Par ailleurs, l'utilisation d'un Ac neutralisant anti-IL-13 inhibe la production de PARC induite par le diesel.

D'autre part, cette expression de PARC induite par le diesel, observée aussi bien chez des sujets non atopiques, que chez des sujets allergiques (Senechal, De Nadai et al. 2003), suggère que la production de PARC puisse être une des voies utilisées par le diesel pour favoriser une réponse Th2.

Ces résultats montrent que le diesel peut induire des dérégulations de chimiokines pro-Th2 (PARC) et pro-Th1 (IP-10), chez des sujets non atopiques, et pourrait ainsi directement générer une réaction de type Th2.

Ces résultats sont en cours de rédaction, et le papier va être soumis à publication à *J Allergy Clin Immunol*.

Ces résultats ont également été présentés à un congrès international :

S Sénéchal, Chang Ying, P de Nadai, C Chenivresse, H Vorng, AB Tonnel, B Wallaert, A Tsicopoulos

Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells from non atopic subjects by differentially regulating CCL18 and CXCL10 production.

Keystone symposium on leukocyte trafficking : cellular and molecular mechanisms

Taos, NM, March 1-6th 2005, A329

Conclusion

La pollution atmosphérique urbaine est à la fois gazeuse et particulaire, et les tendances industrielles actuelles font des moteurs diesel les principales sources de particules dans l'air. Ces émissions diesel sont duales : Les particules de carbone présentent à leur surface de multiples composés adsorbés, dont les représentants de la famille des hydrocarbures polyaromatiques. Ces particules diesel et leurs composés organiques associés sont probablement impliqués dans la recrudescence récente des manifestations pathologiques allergiques.

Dans ce travail, nous avons voulu évaluer l'impact des extraits organiques de particules diesel sur la phase d'initiation et sur l'orientation de la réponse inflammatoire allergène-dépendante, en analysant les dérégulations d'une famille de médiateurs responsables du recrutement cellulaire, les chimiokines.

Nous avons pu montrer que l'exposition de cellules mononucléées et de macrophages alvéolaires de sujets présentant un asthme allergique, aux extraits organiques de diesel induit une dérégulation marquée de la synthèse et de la production de chimiokines aboutissant à favoriser le recrutement des cellules de type Th2, cellules clés de la réaction inflammatoire allergique. Plusieurs mécanismes sont impliqués, d'une part une induction de chimiokines pro-Th2 (MDC, I-309 et PARC), et une diminution de chimiokines pro Th-1 (IP-10), et d'autre part une surexpression de récepteurs chimiokiniques pro-Th1 (CCR5 et CXCR3) permettant l'élimination des ligands correspondants. De plus chez des sujets non allergiques, les extraits organiques de diesel sont également capables de favoriser un profil Th2 par l'induction d'IL-13 et par la même de la chimiokine pro-Th2 PARC.

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

REFERENCES

- Adema, G. J., F. Hartgers, et al. (1997). "A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells." Nature **387**(6634): 713-7.
- Andrew, D. P., M. S. Chang, et al. (1998). "STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13." J Immunol **161**(9): 5027-38.
- Boland, S., A. Baeza-Squiban, et al. (1999). "Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production." Am J Physiol **276**(4 Pt 1): L604-13.
- D'Amico, G., G. Frascaroli, et al. (2000). "Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys." Nat Immunol **1**(5): 387-91.
- Diaz-Sanchez, D., A. R. Dotson, et al. (1994). "Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms." J Clin Invest **94**(4): 1417-25
- Devouassoux, G., A. Saxon, et al. (2002). "Chemical constituents of diesel exhaust particles induce IL-4 production and histamine release by human basophils." J Allergy Clin Immunol **109**(5): 847-53.
- Fahy, O., A. Tsicopoulos, et al. (1999). "Effects of diesel organic extracts on chemokine production by peripheral blood mononuclear cells." J Allergy Clin Immunol **103**(6): 1115-24
- Fahy, O., S. Senechal, et al. (2002). "Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by differentially regulating macrophage-derived chemokine and IFN-gamma-induced protein- 10 production." J Immunol **168**(11): 5912-9.
- Gangur, V., F. E. Simons, et al. (1999). "IP-10 mediated reinforcement of human type 1 cytokine synthesis to environmental allergens among non-atopic subjects." Int Arch Allergy Immunol **118**(2-4): 387-90.
- Haque, N. S., J. T. Fallon, et al. (2001). "The chemokine receptor CCR8 mediates human endothelial cell chemotaxis induced by I-309 and Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vMIP-I and by lipoprotein(a)-stimulated endothelial cell conditioned medium." Blood **97**(1): 39-45.
- Heyder, J., J. Gebhart and G. Rudolph. (1987). Deposition of particles in the respiratory tract in the size range 0.005-15 mm. J Aerosol Sci; Vol.5: pp. 811-25.
- Imai, T., M. Nagira, et al. (1999). "Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen- presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine." Int Immunol **11**(1): 81-8.
- Inngjerdigen, M., B. Damaj, et al. (2000). "Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309." J Immunol **164**(8): 4048-54.

de Nadai P, Charbonnier AS, Chenivresse C, Sénéchal S, Gilet J, Vorng H, Gosset P, Wallaert B, Tonnel AB, Lassalle P, Tsicopoulos A. (2005). Involvement of CCL18 in allergic asthma *J Immunol* , en révision favorable

Rusznak, C., R. J. Sapsford, et al. (1999). "Cigarette smoke potentiates house dust mite allergen-induced increase in the permeability of human bronchial epithelial cells in vitro." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(6): 1238-50.

Senechal, S., P. De Nadai, et al. (2003). "Effect of diesel on chemokines and chemokine receptors involved in Th1/Th2 recruitment in asthmatics." Am J Respir Crit Care Med **30**: 30.

Takenaka, H., K. Zhang, et al. (1995). "Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production." J Allergy Clin Immunol **95**(1 Pt 1): 103-15.

Yoshizumi, K., T. Watanabe and K. Ishii. (1989). Assessment of the sources contributed to suspended particulate matters in Tokyo by receptor model. Annu Rep Tokyo Metrop Res Inst Environ; Vol.1: pp. 3-10.