

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

Coordinateur : Benoît Wallaert - Unité INSERM U416, Institut Pasteur de Lille

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'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 $\gamma$  contre balançant les effets Th2). Les résultats obtenus ont été les suivants :

- 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

- 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.

- 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.

- 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 anticorps neutralisant anti-IL-4 ou anti-IL-13 n'inhibent pas la production de MDC induite par l'association DEP-PAH/Derp 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 Derp 1 et la voie CD80 dans l'amplification de la production de MDC par le diesel.

- 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

- 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.

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

Nous avons évalué leur expression en ARNm sur la population totale de CMN de sujets allergiques, ne distinguant pas les différentes sous-populations. 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 des récepteurs pro Th1 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.

Pour évaluer la fonctionnalité de cette augmentation des récepteurs chimiokines 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. 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 chez les sujets normaux le recrutement de cellules Th2 par l'induction de PARC et l'inhibition d'IP-10

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). 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. 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 mais active la production de PARC de manière IL-13 dépendante. 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 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).

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.

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.