



**UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES FONCTIONNELLES  
SERVICE DE BIOCHIMIE**

**Caractérisation ontogénique, phénotypique et fonctionnelle des  
macrophages interstitiels pulmonaires après exposition à des  
composés bactériens**

**Ontogenic, phenotypic and functional characterization of lung interstitial  
macrophages after exposure to bacterial compounds**

**Catherine SABATEL**

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
Docteur en Sciences Vétérinaires**

**ANNEE ACADEMIQUE 2017-2018**

## Remerciements

Au terme de ce travail j'aimerais remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à son aboutissement. Réaliser cette thèse m'aura donné la chance de rencontrer des personnes remarquables et de générer des souvenirs inoubliables.

Tout d'abord, j'aimerais exprimer toute ma gratitude envers le Professeur Fabrice Bureau pour m'avoir accordé sa confiance et donné l'opportunité d'intégrer son laboratoire. Fabrice, merci pour ta créativité scientifique qui m'a permise de travailler sur différents projets très intéressants qui tentent toujours de répondre à des questions biologiques importantes ; travailler dans ces circonstances est une source de motivation énorme. Un tout grand merci pour ton encadrement sans faille qui m'a permis de terminer ce doctorat malgré les aléas de la science et tout en étant à l'écoute, compréhensif et soucieux de mes souhaits. Merci pour tes encouragements et ton discours toujours positif qui me faisaient chaque fois ressortir de ton bureau beaucoup plus motivée qu'en y entrant. Merci pour tes nombreux conseils dans tous les domaines ; ta rigueur et ton souci de la justice seront toujours un exemple à suivre. Je dirais tout simplement que j'ai eu beaucoup de chance de travailler sous ta supervision et de profiter de tes qualités humaines, scientifiques et intellectuelles remarquables. Fabrice, merci du fond du cœur pour tout ce que tu m'as apporté.

Je voudrais ensuite remercier le Dr Christophe Desmet pour son encadrement dans la première partie de ma thèse. Merci pour ton enthousiasme scientifique en toutes circonstances et pour avoir toujours une explication aux observations scientifiques qui découlent de nos manip ; ta connaissance exceptionnelle de la littérature m'a plus d'une fois laissée perplexe. Merci également pour ton aide précieuse et indispensable aux analyses statistiques de ce projet.

Je voudrais également remercier le Dr Thomas Marichal pour ses encouragements, ses nombreux conseils et pour son aide dans la réalisation de ce projet. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité mais également pour ton enthousiasme et la réactivité dont tu fais preuve qui amènent une certaine dynamique dans l'équipe. Merci également de m'avoir formée à certaines manip, à l'art des figures sur illustrator et à diverses fonctionnalités informatiques en général.

J'aimerais ensuite remercier tous les membres, actuels ou anciens, du labo. Merci pour tous les bons moments partagés que ce soit au labo ou en dehors, pour les soirées et les quelques voyages organisés qui resteront des souvenirs inoubliables.

Merci aux anciens, Sabine, Agnieszka, Hughes, Barbara, Marie, Thomas, Claire, Ann-Steph, et Cédric de m'avoir si bien accueillie et intégrée au laboratoire. Merci pour la bonne ambiance ainsi que pour les nombreux fous rires et discussions animées du vendredi après-midi. Merci à Marie pour ses vocalises et pour son brin de folie qui mettait une si bonne ambiance.

Je remercie tout particulièrement Claire, pour m'avoir initiée et formée à la plupart des manip. Merci pour ta bonne humeur quotidienne, tes conseils avisés et ton franc-parler. Travailler avec toi a été riche en apprentissage et vraiment très agréable. Je garderai un très bon souvenir de nos longues journées de tri malgré le réveil aux petites heures du matin.

Je voudrais adresser un énorme merci à Laurence pour son aide et le travail inestimable qu'elle a fourni dans cette étude. Ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils judicieux grâce à tes nombreuses connaissances et compétences techniques font de toi une collègue en or ! Merci pour ton

oreille attentive et pour avoir partagé « la dernière ligne droite » de ce projet avec moi qui a du coup été beaucoup plus supportable.

Merci à Dimitri pour sa gentillesse, sa disponibilité et ses grandes connaissances en génétique. Merci pour ton humour, ton attitude très zen et ta présence apaisante dans le bureau. Claudia, merci pour ta bonne humeur pétillante et pour nous avoir fait tant rire avec ton incapacité à mentir. Gene, merci pour ton sourire permanent et ta gentillesse. Merci pour tes encouragements et pour ton aide très précieuse dans certaines manip du projet. Un tout grand merci à Cédric pour sa disponibilité et son aide indispensable au bon fonctionnement du labo. Merci pour ta gentillesse, tes nombreuses blagues et la bonne ambiance qui en découle.

Un merci tout particulier à Cora, mon 2<sup>e</sup> binôme, devenue maintenant une véritable amie. Merci pour ta joie de vivre, ton optimisme permanent et pour tous ces fous rires partagés. Merci pour toutes nos discussions, pour les potins échangés mais aussi pour tes encouragements et tes conseils avisés dans tous les domaines qui sont toujours utiles et m'ont grandement aidée.

Merci également à Adeline pour sa bonne humeur, son franc-parler et son entrain. Merci pour nos petites discussions de voisine de bureau où on se racontait nos vies. Thibaut, merci pour ta serviabilité et ta gentillesse. Merci de m'avoir montré toutes les facettes de ta personnalité qui resteront des souvenirs mémorables parmi tant d'autres partagés. Merci à Stef pour sa gentillesse et ses connaissances en statistiques. Pierre, merci pour ton humour et tes compétences bien utiles en informatique. Merci à Sophie pour sa bonne humeur et pour ne pas être la dernière à mettre l'ambiance notamment grâce à quelques phrases désormais cultes. Merci à Joey pour son humour assez particulier et à Aude pour sa gentillesse. Dorien, merci pour ton calme en toute circonstance. Merci à Jérôme pour sa bonne humeur permanente. Dommage que tu ne montes plus au Sart Tilman, la forêt est bien moins rangée maintenant... Merci à Céline, mon dernier binôme en date, pour son entrain et pour l'autonomie et l'initiative dont elle fait preuve. Maude, merci pour ta gentillesse et ta motivation. Merci à Nathalie pour ses conseils et ses découvertes culinaires assez surprenantes. Merci également à Qiang pour sa bonne humeur.

Je remercie également mes collègues du service de pneumologie et de génétique fonctionnelle. Merci à Catherine et Monique pour la bonne ambiance et l'organisation de chouettes sorties. Merci à Laora pour sa sympathie. Merci aux membres du laboratoire de physio pour leur accueil toujours chaleureux. Un merci tout particulier à Ilham et Raja pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur patience et leur aide inestimable dans tous les détails administratifs dont il faut parfois faire face. Merci à Linda et Irene pour leur sympathie.

Merci à Raafat et Sandra pour leur aide en imagerie et cytométrie. Raafat, merci pour les heures passées aux FACS, pour ton aide très précieuse lorsque ceux-ci sont récalcitrants et pour l'organisation de sorties gastronomiques. Merci à l'équipe du Professeur Didier Cataldo pour leur expertise et leur aide pour l'étude de la fonction pulmonaire chez la souris. Merci à toute l'équipe de l'animalerie de faire leur possible pour contenter nos demandes et nous permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles. Merci à la plateforme immuno-histologie et à la coordination du giga pour leur aide.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, les Professeurs Renaud Louis et Didier Cataldo pour leurs remarques et leurs conseils tout au long de ma thèse. Merci également aux membres de mon jury de thèse pour le temps consacré à l'évaluation de mon travail, leurs conseils qui ont permis l'amélioration de ce manuscrit et la discussion intéressante lors de ma défense privée. Je

remercie l'ensemble des collaborateurs qui ont apporté une aide technique ou matérielle permettant à l'aboutissement de l'article scientifique publié dans Immunity.

Je tiens également à remercier mes amis pour leur présence, leur soutien et tous les bons moments partagés tout au long de ces années.

Merci à ma belle-famille pour leur gentillesse et leur accueil toujours chaleureux. Merci à Vincent pour son humour et ses découvertes musicales.

J'aimerais également remercier chaleureusement ma famille. Un tout grand merci à mes grands-parents pour leur générosité et leur soutien ainsi qu'à mes beaux-frères, Ludo et Phil, pour leur humour et pour tout ce qu'ils font pour moi. Céline et Hélène, merci pour tout, pour vos encouragements, vos conseils, pour tous les moments partagés et notre complicité. Merci d'être toujours là pour moi. Merci à Diane, mon petit rayon de soleil. Enfin, un énorme merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenue et encouragée en toute circonstance. Merci de m'avoir permis et donné la possibilité de concrétiser mes envies. Merci du fond du cœur pour tout...

Je finirai par Julien. Merci pour ta gentillesse, ton caractère si doux et toutes ces petites attentions dont tu fais preuves à mon égard ; merci d'illuminer mes journées et de me rendre la vie si belle. Merci pour ton humour et pour toujours parvenir à me faire rire, une réelle bouffée d'oxygène. Enfin, merci pour cette merveilleuse année passée à tes côtés qui, je l'espère, n'est que le début d'une longue série...

## Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALR	AIM2-like receptor
AP-1	Activator protein 1
ARN	Acide ribonucléique
AT	Angiotensine II
BCL	B-cell lymphoma
BCR	B cell receptor
BSA	Bovine serum albumin
CCF4-AM	Coumarin-cephalosporin-fluorescein (4)-acetoxymethyl
CD	Cellule dendritique
CFU	Colony-forming unit
Clo-Lips	Liposomes contenant du clodronate
CLR	C-type lectin receptor
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CREB	cAMP response element binding
CT	Contrôle
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
DAMP	Damage-associated molecular pattern
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

---

FBS	Sérum fœtal bovin
FC	Fold change
FcεRI	Récepteur Fc de haute affinité
FcεRII	Récepteurs Fc de faible affinité
FoxP3	Forkhead box P3
FRET	Energie de fluorescence par résonance
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GSEA	Gene set enrichment analysis
HDM	House dust mites
H&E	Hématoxyline-éosine
HMGB1	High mobility group box protein-1
HRB	Hyperréactivité bronchique
HRP	Peroxydase de raifort
HSC	Hematopoietic stem cell
Hsp	Heat shock proteins
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
ILC	Cellule lymphoïde innée
i.n.	Intranasal
i.p.	Intrapéritonéal
IRF	Interferon response factor
i.t.	Intratrachéal

---

iTreg	T régulateur induit
i.v.	Intraveineuse
J	Jour
JAK	Janus kinase
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LBP	LPS-binding protein
LLBA	Liquide de lavage bronchoalvéolaire
LN	Ganglion
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
MA	Macrophage alvéolaire
MACS	Magnetism-activated cell sorting
MALP-2	Macrophage-activating lipopeptide 2 KDa
MAP	Mitogen-activated protein
MD-2	Myeloid differentiation protein
MDSC	Myeloid-derived suppressor cell
MI	Macrophage interstitiel
MI <sub>CpG</sub>	Macrophage interstitiel induit par les CpG
MI <sub>LPS</sub>	Macrophage interstitiel induit par le LPS
MI <sub>SS</sub>	Macrophage interstitiel à l'état basal
M-MDSC	Myeloid-derived suppressor cell monocyttaire
MPS	Mononuclear phagocyte system
Myd88	Myeloid differentiation primary response 88
NFAT	Nuclear factor of activated T cells

---

NK	Natural Killer
NKT	Lymphocyte T Natural Killer
NLR	NOD-like receptor
NO	Oxyde d'azote
nTreg	T régulateur naturel
ODN	Oligodésoxynucléotides
OVA	Ovalbumine
Pam3CSK4	Pam3CysSerLys4
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PAS	Periodic acid schiff
PBS	Phosphate buffer saline
PBS-Lips	Liposomes contenant du PBS
PCA	Principal component analysis
pDC	Cellule dendritique plasmacytoïde
PFU	Plaqué-forming unit
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PMN-MDSC	Myeloid-derived suppressor cell polymorphonuclée
Poly I :C	Acide polyinosinique-polycytidylique
PRR	Pattern recognition receptor
qRT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction en temps réel
R848	Resiquimod
RLR	RIG-I-like receptor
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
s.c.	Sous-cutané



STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Macrophage associé aux tumeurs
TCR	T cell receptor
T <sub>FH</sub>	T Follicular helper
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T helper
TIR	Toll-interleukine 1 récepteur
TIRAP	TIR-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
Treg	T régulateur
TRIF	TIR domain-containing adaptator inducing IFN- $\beta$
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin
TNF	Tumor necrosis factor

# Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	1
<b>Résumé</b> .....	5
<b>Summary</b> .....	6
<b>Introduction</b> .....	7
<b>1 Les réponses immunes</b> .....	7
1.1 Immunité innée.....	7
1.1.1 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) .....	7
1.1.2 Les récepteurs de l'immunité innée .....	8
1.1.3 Les cellules de l'immunité innée .....	15
1.2 Immunité adaptative .....	16
1.2.1 Activation du lymphocyte T CD4 <sup>+</sup> .....	16
1.2.2 Différents lymphocytes Th.....	18
1.2.2.1 Lymphocytes Th1 .....	19
1.2.2.2 Lymphocytes Th2 .....	20
1.2.2.3 Lymphocytes Th17 .....	20
1.2.2.4 Lymphocytes T Follicular helper .....	21
1.2.2.5 Lymphocytes Th9 .....	21
1.2.2.6 Lymphocytes Th22 .....	21
1.2.3 Lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	21
1.2.4 Lymphocytes B et réponse humorale.....	22
<b>2 L'asthme allergique</b> .....	23
2.1 Définition.....	23
2.2 Pathophysiologie .....	23
2.2.1 Sensibilisation allergique .....	23
2.2.2 Réexposition à l'allergène .....	24
2.2.3 Autres acteurs de la réponse allergique.....	26
2.2.4 Remodelage des voies aériennes.....	27
2.3 Epidémiologie .....	28
2.4 Étiologie.....	28
2.4.1 Facteurs génétiques.....	28
2.4.2 Autres facteurs impliqués.....	29
2.4.2.1 Exposition aux allergènes.....	29
2.4.2.2 La pollution .....	29
2.4.2.3 Le tabac .....	29

2.4.2.4	L'obésité et le régime alimentaire.....	29
2.4.2.5	Les virus .....	30
2.4.2.6	L'exposition aux microorganismes .....	30
2.5	Traitements .....	30
2.5.1	Traitements symptomatiques.....	30
2.5.2	Immunothérapie.....	31
2.5.2.1	Effet protecteur des CpG.....	31
2.5.2.2	Utilisation thérapeutique des CpG .....	32
3	Contrôle des réponses immunes.....	33
3.1	Les cellules dendritiques.....	33
3.2	Les lymphocytes T régulateurs.....	34
3.3	Les macrophages .....	34
3.3.1	Hétérogénéité.....	34
3.3.2	Classification .....	36
3.3.3	Ontogénie .....	37
3.3.4	Macrophages immunosuppresseurs .....	43
3.3.4.1	Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) .....	43
3.3.4.2	Macrophages associés aux tumeurs (TAMs).....	43
3.3.4.3	Cellules myéloïdes régulatrices CD11b <sup>+</sup> GR-1 <sup>int</sup> F4/80 <sup>+</sup> .....	43
3.3.4.4	Macrophages producteurs d'IL-10.....	44
3.3.4.4.1	Macrophages de l'intestin.....	44
3.3.4.4.2	Macrophages du poumon .....	44
3.3.4.4.2.1	Macrophages alvéolaires.....	45
3.3.4.4.2.2	Macrophages interstitiels .....	46
	<b>Objectifs</b> .....	48
	<b>Section expérimentale - Matériel et méthodes</b> .....	49
1	Animaux expérimentaux .....	49
2	Réactifs et anticorps .....	49
3	Techniques relatives à la cytométrie en flux .....	50
3.1	Obtention des différents types cellulaires .....	50
3.2	Marquage FACS.....	51
3.3	Phénotypage et tri cellulaire.....	51
3.4	Identification des cellules isolées .....	51
3.5	Quantification du nombre de monocytes/macrophages .....	51
4	Evaluation de la production d'IL-10 .....	52
4.1	Souris ITIB IL-10-β-lactamase rapportrices .....	52

---

4.2	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)</i> .....	52
5	Techniques relatives à l'identification des monocytes tissulaires.....	53
5.1	Déplétion des monocytes/macrophages vasculaires .....	53
5.2	Immunohistochimie .....	53
5.3	Marquage <i>in vivo</i> des leucocytes vasculaires .....	53
6	Exposition à des ligands de TLRs et à des pathogènes .....	54
6.1	Exposition des voies aériennes à des ligands de TLRs.....	54
6.2	Exposition des voies aériennes à des pathogènes .....	54
6.3	Traitement aux CpG .....	54
6.3.1	Administration <i>in vivo</i> .....	54
6.3.2	Stimulation <i>ex vivo</i> des monocytes tissulaires aux CpG.....	54
7	Modèles d'asthme .....	55
7.1	Modèles aux extraits d'acariens (HDM).....	55
7.1.1	Modèles de sensibilisation.....	55
7.1.2	Modèles de challenge allergénique.....	55
7.2	Modèle à l'ovalbumine (OVA) .....	56
7.3	Evaluation de la réponse allergique.....	56
7.3.1	Mesure de l'hyperréactivité bronchique.....	56
7.3.2	Lavage bronchoalvéolaire et cytologie .....	56
7.3.3	Histologie pulmonaire.....	56
7.3.4	Production de cytokines par les cellules ganglionnaires .....	57
7.3.5	Maturation et migration des CD8.....	57
7.3.6	Quantification des IgE .....	57
8	Greffe de moelle compétitive et parabiose .....	58
9	Evaluation de la prolifération cellulaire .....	58
10	Western blot.....	58
11	Etude transcriptomique.....	59
11.1	Obtention d'ARNm .....	59
11.2	Microarray.....	59
11.3	Analyses bioinformatiques.....	59
12	RT-PCR en temps réel.....	60
13	Splénectomies .....	61
14	Chemokine array .....	61
15	Inhibition des chémokines .....	61
16	Analyses statistiques.....	62
	<b>Section expérimentale - Résultats</b> .....	<b>63</b>

---

1	Visualisation des monocytes et macrophages pulmonaires murins .....	63
1.1	Stratégie de cytométrie en flux simplifiée pour identifier les monocytes et macrophages pulmonaires .....	63
1.2	Identification d'une population de monocytes tissulaires .....	68
2	Les CpG induisent une expansion des MI dépendante du TLR9 .....	71
3	Les MI induits par les CpG protègent d'une sensibilisation à l'encontre d'allergènes inhalés .....	76
4	Les MIs induits par les CpG médient les effets immunothérapeutiques des CpG sur un asthme établi .....	80
5	Les CpG augmentent la population de MI principalement à partir de monocytes CCR2 indépendants .....	85
6	Les monocytes pulmonaires et spléniques sont les précurseurs des MI <sub>CpG</sub> .....	89
6.1	Différenciation des MI <sub>CpG</sub> à partir de monocytes pulmonaires .....	89
6.2	Différenciation des MI <sub>CpG</sub> à partir de monocytes spléniques .....	95
	<b>Discussion - Perspectives</b> .....	99
	<b>Bibliographie</b> .....	107
	<b>Annexes</b> .....	125

---

# Résumé - Abstract

---

## Résumé

La muqueuse respiratoire est continuellement exposée à des antigènes inoffensifs ainsi qu'à des molécules immunostimulatrices d'origine microbienne. Selon la théorie du « soi/non soi » et la théorie du « danger », cette exposition devrait normalement conduire au développement de réponses immunes non désirées à l'encontre de ces antigènes inhalés telles que des réactions allergiques médiées par des lymphocytes Th2. Ce n'est toutefois pas le cas chez la plupart des individus. La théorie de l'hygiène stipule d'ailleurs que vivre dans un environnement riche en composés microbiens protège des allergies respiratoires, ce qui implique l'existence de mécanismes suppresseurs déclenchés par ces stimuli au niveau du poumon. Dans cette étude, nous avons montré que l'ADN bactérien synthétique riche en motifs CpG non méthylés (CpG) a la capacité unique d'augmenter fortement la population de macrophages interstitiels (MI) régulateurs pulmonaires à partir de monocytes CCR2 indépendants résidants dans le tissu pulmonaire ou mobilisés à partir de la rate. De plus, les MI induits par les CpG ont démontré un profil hypersuppresseur car ils produisaient de plus grandes quantités d'IL-10 que leurs homologues présents à l'état basal. L'utilisation de modèles murins d'inflammation allergique des voies aériennes, nous a permis de montrer que le transfert adoptif de MI isolés à partir de souris traitées aux CpG récapitulait les effets protecteurs des CpG lors d'une administration avant la sensibilisation ou le challenge allergénique. Cette protection induite par les MI était dépendante de l'IL-10 car les MI *Il10*<sup>-/-</sup> induits par les CpG ne possédaient pas d'effet régulateur. L'expansion des MI régulateurs pulmonaires à partir de monocytes pulmonaires et spléniques CCR2 indépendants suite à une exposition aux CpG constituerait donc un mécanisme possible par lequel une exposition à un environnement riche en composés microbiens protège du développement de l'asthme.

## Summary

Respiratory mucosal surfaces are continuously exposed to harmless antigens and immunostimulatory molecules of microbial origin. According to the « self/non self » and « danger » theories, this should normally result in the development of unwanted immune responses towards these inhaled antigens such as Th2-mediated allergic responses. This is however not the case in most people. The hygiene hypothesis postulates that living in an environment rich in microbial components paradoxically protects from airway allergy, implying the existence in the lung of suppressive mechanisms triggered by these immunogenic signals. In this study, we showed that synthetic bacterial DNA rich in unmethylated CpG motifs (CpG) has the unique ability to significantly increase the population of lung interstitial regulatory macrophages (IM) from CCR2-independent monocytes residing in the lung or mobilized from the spleen. Moreover these CpG-induced IM demonstrated a hypersuppressive profile as they produced more IL-10 than their steady state counterparts. Using mice models of airway allergy we showed that the transfert of IM isolated from CpG-treated mice recapitulated the protective effects of CpG when administered before allergen sensitization or challenge. This IM-mediated protection was dependant from IL-10 as CpG-induced *Il10*<sup>-/-</sup> IM had no protective effect. The expansion of pulmonary regulatory IM from CCR2-independent pulmonary and splenic monocytes upon CpG exposure could be a possible mechanism by which exposure to an environment rich in microbial products protects against asthma.



---

# Introduction

---

# Introduction

## 1 Les réponses immunes

Face à un agent pathogène, le système immunitaire génère rapidement une réponse immunitaire dite innée pour empêcher la croissance et la dissémination de l'agent infectieux. Cette réponse est suivie, chez les vertébrés, d'une réponse immunitaire spécifique à l'agent pathogène et qui conduira à son élimination.

### 1.1 Immunité innée

La branche innée du système immunitaire représente donc la première ligne de défense à l'encontre des pathogènes. La détection de la présence d'agents infectieux permet l'activation des cellules de l'immunité innée. Celles-ci éradiquent ou contiennent temporairement l'infection et initient la réponse immunitaire dite adaptative.

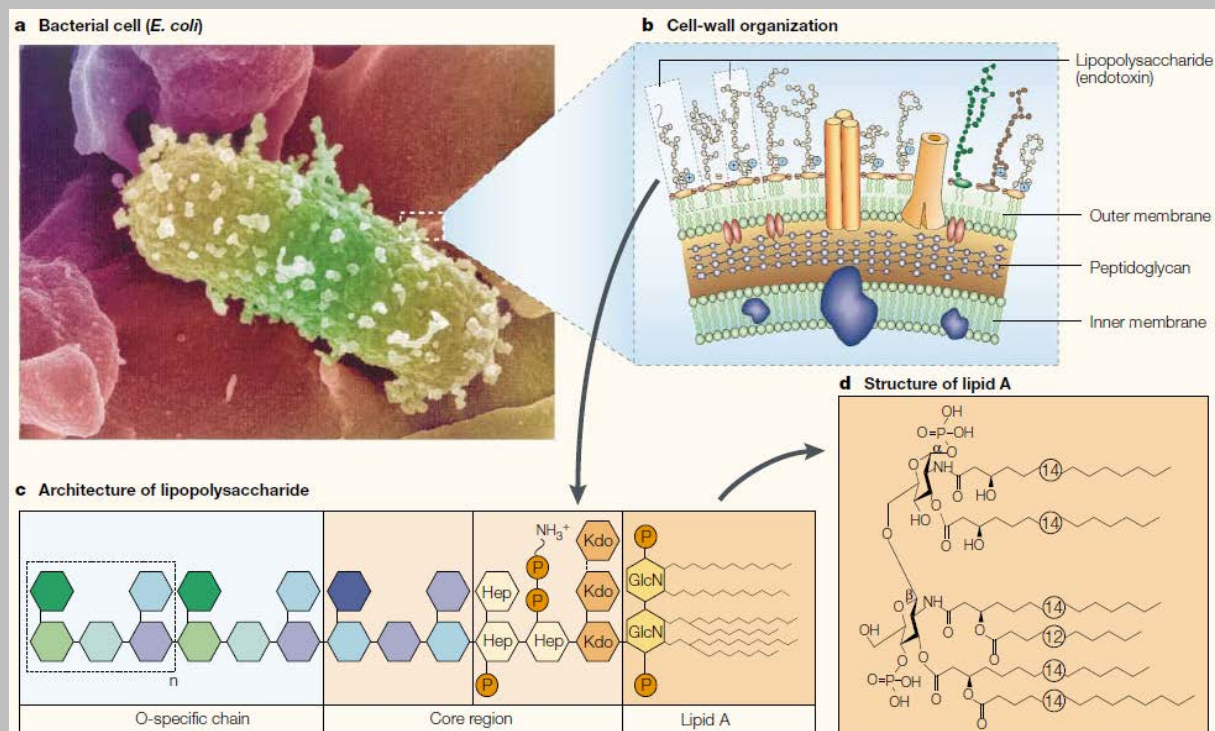
#### *1.1.1 Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*

La détection de pathogènes se fait via la reconnaissance de structures moléculaires spécifiques de pathogènes appelés *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) par le système immunitaire inné. Les PAMPs comprennent des motifs conservés au sein des microorganismes d'une même classe et sont uniquement présent chez ces microorganismes, ce qui permet de les distinguer des molécules de l'hôte (appelées également molécules du soi).

Les PAMPs bactériens sont le plus souvent des composants de la paroi cellulaire comme le lipopolysaccharide (LPS, **encadré 1**), le peptidoglycane, les acides lipoteichoïques et des lipoprotéines. Les champignons sont le plus souvent détectés via le  $\beta$ -glucane, présent dans la paroi des cellules fongiques. La reconnaissance des virus peut également se faire à partir de leur enveloppe externe, cependant comme tous les composés viraux sont synthétisés à l'intérieur de la cellule hôte, les principales cibles pour leur reconnaissance par le système immunitaire sont les acides nucléiques viraux (Medzhitov, 2007).

Encadré 1 | **Lipopolysaccharide**

Le lipopolysaccharide (LPS) est le constituant principal de la membrane externe de la paroi des bactéries gram négatives. Il est composé d'un domaine hydrophobe, appelé lipide A (ou endotoxine), d'un cœur d'oligosaccharides non répétés et d'un polysaccharide distal, appelé antigène O. Le lipide A, qui est principalement responsable de l'activité immunologique du LPS, est composé d'un squelette de deux glucosamines phosphorylées sur lesquelles sont fixés des chaînes lipidiques (Park and Lee, 2013). Le cœur oligosaccharidique est conceptuellement divisé en deux régions : le cœur intérieur à proximité du lipide A et le cœur extérieur qui fournit un site d'attachement à l'antigène O. Ce dernier possède une grande diversité dont la structure définit la spécificité sérologique de l'organisme qui le porte à sa surface (Raetz and Whitfield, 2002).



(D'après Beutler and Rietschel, 2003)

### 1.1.2 Les récepteurs de l'immunité innée

Contrairement à la réponse adaptative, la réponse innée implique un nombre limité de récepteurs, les *Pattern recognition receptors* (PRRs) capables de reconnaître des PAMPs mais également des molécules dérivées de l'hôte provenant de cellules endommagées appelées *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Tartey and Takeuchi, 2017).

Les PRRs possèdent une large spécificité pour des structures moléculaires conservées au sein des microorganismes, au contraire des récepteurs de l'immunité adaptative qui sont hautement spécifiques (Medzhitov, 2007). L'activation des PRRs induit une cascade de signalisation qui conduit

à l'activation de facteurs de transcription et à la transcription de leurs gènes cibles (Takeuchi and Akira, 2010).

On distingue actuellement 5 familles de PRRs, les *Toll-like receptors* (TLRs), les *C-type lectin receptors* (CLRs), les *NOD-like receptors* (NLRs), les *RIG-I-like receptors* (RLRs), et les *AIM2-like receptors* (ALRs). Ces familles de récepteurs peuvent être séparées en 2 grands groupes : les récepteurs associés à une membrane et les récepteurs intracellulaires. Le premier groupe comprend les TLRs et les CLRs qui sont présents à la surface de la cellule ou sur un endosome et détectent ainsi les ligands microbiens présents dans l'espace extracellulaire ou l'endosome. Les NLRs, RLRs et ALRs forment le deuxième groupe et sont localisés dans le cytoplasme où ils détectent la présence de pathogènes intracellulaires (Brubaker et al., 2015). Les TLRs sont détaillés ci-après car ils seront utiles pour la bonne compréhension de ce travail.

### **Toll-like receptors**

La famille des TLRs est la mieux caractérisée des PRRs. Ce sont des glycoprotéines de membrane caractérisés par une extrémité N-terminale riche en répétitions de leucines, une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique Toll-interleukine 1 (IL-1) récepteur (TIR) requis pour la transduction du signal (Kawai and Akira, 2010). Treize TLRs différents, numérotés de 1 à 13, ont actuellement été identifiés chez les mammifères, 10 chez l'homme et 12 chez la souris. Le TLR8 n'est pas présent chez la souris tandis que les TLRs 11, 12 et 13 ne sont pas présents chez l'homme (Tartey and Takeuchi, 2017).

#### ➤ **Localisation et ligands des TLRs**

Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont localisés sur la membrane plasmique tandis que les TLRs 3, 7, 8 et 9, 10, 11, 12 et 13 sont situés dans les compartiments endosomaux. Chaque TLR reconnaît différents PAMPs et DAMPs. Les TLRs qui reconnaissent des composés bactériens ou fongiques sont localisés à la surface cellulaire tandis que les TLRs qui reconnaissent des acides nucléiques viraux, mais aussi bactériens, sont présents au niveau des membranes intracellulaires (Tartey and Takeuchi, 2017). Cette compartimentalisation est importante car elle permet à l'organisme d'éviter une reconnaissance d'acides nucléiques de l'hôte bien que cela puisse malgré tout arriver (Takeuchi and Akira, 2010).

Le TLR2 détecte différents composants de bactéries, mycoplasmes, champignons ou virus. La reconnaissance de son ligand par le TLR2 s'effectue suite à une dimérisation avec le TLR1 ou le TLR6. Les complexes TLR1/TLR2 et TLR6/TLR2 qui en résultent reconnaissent des ligands distincts, des lipopeptides triacylés et lipopeptides diacylés respectivement (Takeuchi and Akira, 2010). Les 2 ligands principalement utilisés pour l'étude du TLR2 sont le Pam3CSK4 (Pam3CysSerLys4), un lipopeptide synthétique triacylé représentatif de l'extrémité amino-terminale acylée des lipopeptides bactériens et le *Macrophage-activating lipopeptide* 2 KDa (MALP-2) qui a été originellement isolé de

*Mycoplasma fermentas* et qui est maintenant synthétisé. Le Pam3CSK4 lie le complexe TLR1/TLR2 tandis que MALP-2 interagit avec le dimère TLR2/TLR6 (Barrenschee et al., 2010).

Le TLR4 forme un complexe avec la *Myeloid differentiation protein* (MD)-2 et reconnaît le LPS. D'autres protéines accessoires telles que la *LPS-binding protein* (LBP) et le CD14 sont également impliqués dans la liaison du LPS. La LBP est une protéine soluble qui lie le LPS et le CD14 est ancré dans la membrane plasmique par un glycosyl-phosphatidylinositol et suite à sa liaison avec le LBP, permet le transfert du LPS du complexe LPS/LBP au complexe TLR4-MD2 (Brubaker et al., 2015; Park and Lee, 2013). En plus du LPS, le TLR4 serait également impliqué dans la reconnaissance de virus (Kawai and Akira, 2010).

Le TLR5 est présent en grande quantité à la surface des cellules dendritiques de la lamina propria du petit intestin où il reconnaît la flagelline des bactéries flagellées (Akira et al., 2006).

Les TLR11 et TLR12 détectent la présence de bactéries uropathogéniques et des molécules de type profiline dérivées du protozoaire *Toxoplasma gondii* (Tartey and Takeuchi, 2017).

Les TLRs 3, 7, 8, 9 et 13 reconnaissent des acides nucléiques de virus et de bactéries mais également des acides nucléiques endogènes dans certains contextes pathologiques (Akira et al., 2006).

Le TLR3 détecte l'ARN (acide ribonucléique) double brin viral au niveau des endolysosomes. Le TLR3 est également impliqué dans la reconnaissance de l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly I:C), un analogue synthétique de l'ARN double brin (Takeuchi and Akira, 2010).

Les TLRs 7 et 8 reconnaissent de l'ARN simple brin issu des virus à ARN ainsi que des dérivés imidazoquinolines synthétiques tels que le resiquimod (R848) et des analogues à la guanine comme la loxoribine. Le TLR7 reconnaît également l'ARN bactérien. (Akira et al., 2006; Kawai and Akira, 2010).

Le TLR9 détecte l'ADN (acide désoxyribonucléique) non méthylé riche en motifs CpG caractéristique des bactéries mais également présent chez les virus au contraire de l'ADN des vertébrés qui contient peu de motifs CpG, lesquels sont méthylés (Hemmi et al., 2000) (**encadré 2**). L'hémozoïne, un composé issu de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite de la malaria ainsi que l'ADN du parasite lui-même sont également des ligands du TLR9 (Coban et al., 2010; Parroche et al., 2007).

## Encadré 2 | CpG

On appelle CpG des oligodésoxynucléotides contenant des motifs CpG non méthylés caractéristiques de l'ADN bactérien. Il existe des oligodésoxynucléotides synthétiques contenant des motifs CpG non méthylés spécifiques et dont la séquence, le squelette ainsi que la structure secondaire ou tertiaire varient en fonction du type de CpG et peuvent affecter différemment la réponse immunitaire induite par leur liaison au TLR9 (Vollmer and Krieg, 2009). La plupart des cellules immunes n'expriment pas le TLR9 et ne sont donc pas directement activées par les CpG. Les principales cellules connues pour répondre aux CpG suite à leur expression du TLR9 sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) et les lymphocytes B. Le TLR9 est également exprimé par les monocytes et cellules myéloïdes chez la souris (Krieg, 2006).

Les CpG synthétiques peuvent être regroupés en 3 classes :

Classe A :

- possèdent un squelette formé de liens phosphodiester
- forment des complexes très stables à partir de leur extrémité 5' et/ou 3' formée de motifs poly-G
- induisent fortement la sécrétion d'interféron (IFN) $\alpha$  par les pDCs
- induisent faiblement la maturation des pDCs et la prolifération des lymphocytes B
- exemple :

Classe B :

- possèdent un squelette formé de liens phosphorothioates
- ont une structure linéaire qui ne forme pas de complexe
- induisent fortement la prolifération de lymphocytes B et la maturation des pDCs
- induisent faiblement la sécrétion d'IFN $\alpha$  par les pDCs
- exemple :

Classe C :

- possèdent un squelette formé de liens phosphorothioates
- forment des dimères avec leur extrémité 3' palindromique
- induisent des effets intermédiaires et combinés des CpG de classe A et B
- exemple :



(Krieg, 2006; Vollmer et al., 2004)

Le TLR13 agit comme un senseur de l'ARN bactérien ribosomal et serait également lié à la reconnaissance du virus de stomatite vésiculaire (Tartey and Takeuchi, 2017).

Le TLR10 semble fonctionnel chez l'homme mais pas chez la souris suite à l'insertion d'un retrovirus. Cependant son ligand n'a pas été identifié (Takeuchi and Akira, 2010).

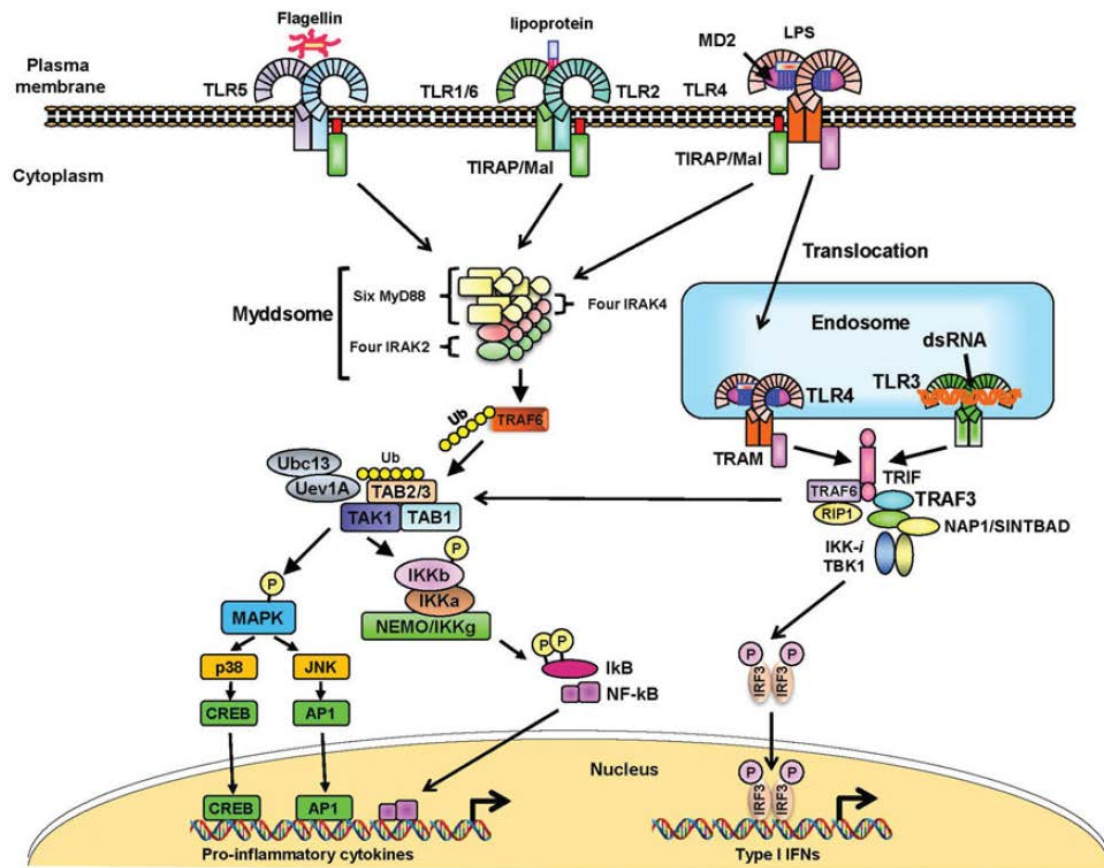
En plus de la détection de ligands dérivés de pathogènes, les TLRs interagissent également avec diverses molécules de l'hôte libérées suite à un stress ou lors de la mort cellulaire telles que les *Heat shock proteins* (Hsp) (Vabulas et al., 2001), *High mobility group box protein-1* (HMGB1) (Park et al., 2004), la protéine A du surfactant (Guillot et al., 2002) et le fibrinogène (Smiley et al., 2001). Des produits dérivés de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine (Okamura et al., 2001) et des oligosaccharides d'acide hyaluronique (Termeer et al., 2002) sont également reconnus par les TLRs.

➤ Voie de signalisation des TLRs

L'activation des TLRs induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Les TLRs 3, 4, 7, 8 et 9 induisent également la production d'IFN de type 1.

La liaison du ligand sur le TLR initie une voie de signalisation intracellulaire qui mène à l'activation transcriptionnelle de différents gènes en fonction du TLR et du type cellulaire impliqué. Les protéines adaptatrices qui interagissent directement avec le TLR sont impliquées dans l'orientation de la cascade enzymatique (Takeuchi and Akira, 2010). Il y a 4 protéines adaptatrices contenant un domaine TIR qui se lient aux TLRs : *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88), *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$*  (TRIF), *TIR-containing adaptor protein* (TIRAP) and *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Comme TIRAP et TRAM interagissent avec MyD88 et TRIF respectivement, les cascades de signalisation induites par les TLRs sont divisées en 2 grandes voies distinctes sur base de l'implication de la molécule adaptatrice MyD88 ou TRIF (Brubaker et al., 2015; Takeuchi and Akira, 2010).

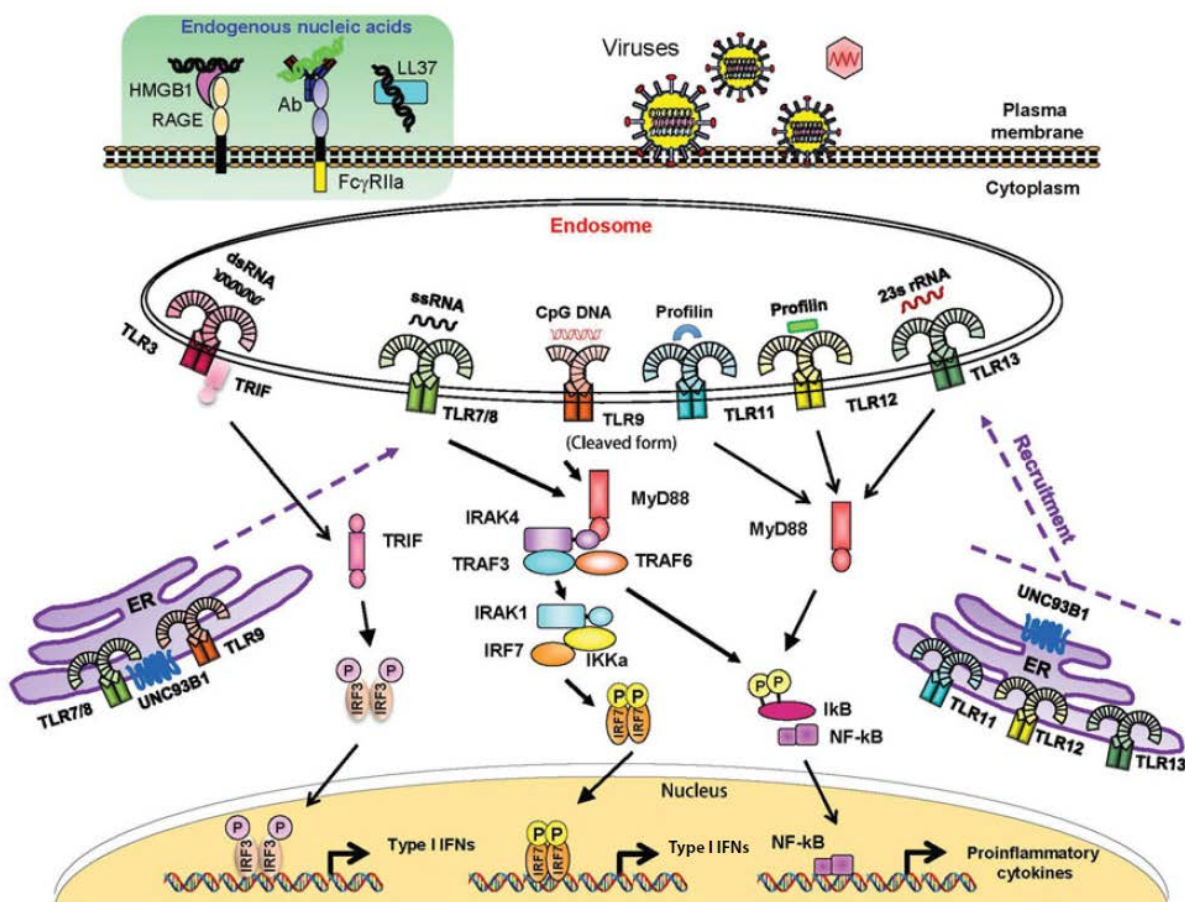
Myd88 est essentiel pour la signalisation de nombreux TLRs à l'exception du TLR3. La voie de signalisation impliquant Myd88 active séquentiellement différentes molécules de signalisation qui mènent à la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B au niveau du noyau où il régule l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines. Cette voie de signalisation conduit également à l'activation des *Mitogen-activated protein* (MAP) kinases qui activent les facteurs de transcription, *activator protein 1* (AP-1) et *cAMP response element binding* (CREB) qui sont importants pour l'induction de gène codant pour des cytokines (Brubaker et al., 2015; Tartey and Takeuchi, 2017) (**figure 1**).



**Figure 1. Voies de signalisations induites par les TLRs localisés à la surface de la cellule.** Les hétérodimères TLR1/TLR6 et TLR2/TLR6, le complexe TLR4/MD2 et le TLR5 reconnaissent respectivement des lipoprotéines, le LPS et la flagelline et recrutent les protéines adaptatrices Myd88 et TIRAP. Un complexe de kinases IRAKs et Myd88 appelé Myddosome est ensuite formé et recrute TRAF6. TRAF6 agit comme une ubiquitine ligase E3 et catalyse la formation d'une chaîne polyubiquitine liée à K63 à sa surface et la génération d'une chaîne polyubiquitine non conjuguée avec le complexe d'ubiquitine ligase E2 formé de Ubc13 et Uev1A. L'ubiquitination active le complexe de TAK1, TAB1 et TAB2/3 qui conduit à la phosphorylation du NF-κB essentiel modulateur (NEMO) et à l'activation d'un complexe IKK. La dégradation de IκB phosphorylé par le système du protéasome permet la translocation de NF-κB jusqu'au noyau où il régule l'expression de gènes codant pour des cytokines. Simultanément, TAK1 active la cascade des MAP kinases conduisant à l'activation de AP-1 et de CREB qui sont également important pour l'induction de gènes codant pour des cytokines. Le LPS induit également la translocation du TLR4 dans un endosome avec TRAM. Le TLR3 est présent dans un endosome et reconnaît de l'ARN double brin. Les TLR3 et 4 activent la voie de signalisation dépendante de TRIF, qui active NF-κB et IRF3 et mène à l'induction de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires et pour des IFN de type I. TRAF6 et RIP1 activent NF-κB tandis que TRAF3 est responsable de la phosphorylation de IRF3 par TBK1/IKK-i. Nucleosome assembly protein 1 (NAP1) et similar to NAP1 TBK1 adaptor (SINTBAD) sont requis pour l'activation de TBK1/IKK-i. IRF3 phosphorylé est transloqué jusqu'au noyau pour induire l'expression de gènes codant pour des IFN de type I. (D'après Tartey and Takeuchi, 2017).



Les TLRs 7, 8 et 9 activent également une voie de signalisation alternative impliquant Myd88 qui conduit à l'activation du facteur de transcription *Interferon response factor* (IRF) 7 et à la production d'IFN de type 1 (Brubaker et al., 2015) (**figure 2**).



**Figure 2. Voies de signalisation induites par les TLRs localisés sur les endosomes.** Les TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 et 13 résident sur des endosomes. La reconnaissance d'ARN double brin par le TLR3 recrute TRIF pour initier la cascade de signalisation qui ensuite active TBK1 pour induire la production d'IFN de type I via IRF3. Simultanément, TRIF peut également interagir avec TRAF6 afin d'activer NF-κB pour la transcription de cytokines proinflammatoires. L'ARN simple brin viral et les CpG sont reconnus par les TLR7 et 9 respectivement. Les virus qui sont entrés dans le cytoplasme sont engloutis dans des autophagosomes et les acides nucléiques viraux sont délivrés à un endolysosome. Un complexe HMGB1-ADN libéré des cellules endommagées est capturé par le récepteur of advanced glycation end products (RAGE). Des autoanticorps reconnaissant de l'ADN ou ARN du soi se lient au FcγRIIa. Un peptide antimicrobien, LL37, s'associe avec l'ADN endogène. Ces protéines sont responsables de la libération des acides nucléiques endogènes aux endolysosomes. La stimulation du ligand facilite le déplacement dépendant de UNC93B1 des TLR7 et 9 du reticulum endoplasmique aux endolysosomes. Un complexe de Myd88, IRAK-4, TRAF6, TRAF3, IRAK-1, IKK-α et IRF7 est recruté au niveau du TLR. La phosphorylation de IRF7 permet sa translocation jusqu'au noyau et l'induction de l'expression de gènes codant pour des IFN de type I. Les TLR11 et 12 reconnaissent des protéines de type profiline et le TLR13 reconnaît l'ARN bactérien simple brin 23s et induit la voie de signalisation de NF-κB via Myd88 et TIRAP. (Adapté de Tartey and Takeuchi, 2017).

La voie de signalisation dépendante de TRIF est activée par le TLR3 et le TLR4 et aboutit à l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF- $\kappa$ B responsables de la production d'IFN de type 1 et de cytokines pro-inflammatoires respectivement (Kawai and Akira, 2010) (**figure 1**).

Le TLR4 est le seul récepteur qui utilise les deux voies de signalisation. Suite à la liaison de son ligand, la voie de signalisation dépendante de Myd88 est d'abord enclenchée depuis la surface cellulaire. Le récepteur est ensuite endocyté et enclenche la voie de signalisation dépendante de TRIF depuis les endosomes (Brubaker et al., 2015) (**figure 1**).

➤ Localisation des TLRs

Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages et les cellules dendritiques (CDs) qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des PAMPs et DAMPs via l'élimination par la phagocytose et la mise en place d'une réponse adaptative respectivement. Des cellules structurales comme les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules endothéliales expriment également des PRRs et contribuent ainsi à l'immunité innée (Takeuchi and Akira, 2010).

### ***1.1.3 Les cellules de l'immunité innée***

Les cellules de l'immunité innée comprennent les CDs, les monocytes, les macrophages, les granulocytes (i.e. éosinophiles, neutrophiles, basophiles, mastocytes), les cellules Natural Killer (NK) et les cellules lymphoïdes innées (ILCs). La détection des agressions tissulaires par ces cellules ou par des cellules structurales, qui peuvent ensuite activer les cellules de l'immunité innée, induit la libération de divers médiateurs menant à une réaction inflammatoire, la phagocytose et l'élimination rapide de l'agent pathogène. Dans certaines situations, ces mécanismes ne sont pas suffisants et l'induction d'une réponse immune adaptative est nécessaire à la protection de l'hôte.

La mise en place de celle-ci nécessite la présentation d'un antigène spécifique de l'agent pathogène aux acteurs principaux de la branche adaptative de l'immunité, les lymphocytes T. Ce processus est réalisé par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigène (CPAs) qui présentent l'antigène à la surface de leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les principales CPAs sont les CDs, les macrophages et les lymphocytes B. Cependant les cellules décrites comme étant les CPAs professionnelles sont les CDs. Elles sont en effet les cellules les plus efficaces en ce qui concerne la capture et le traitement d'antigènes et la stimulation de la prolifération des lymphocytes T (Liu and Nussenzweig, 2010). Les CDs présentes dans les tissus périphériques ont un rôle de sentinelle et sont activées soit directement via la reconnaissance de PAMPs ou de DAMPs par leurs PRRs soit indirectement via des cytokines libérées par d'autres cellules activées. Une fois activées, les CDs mûrissent en augmentant fortement leur expression de CMH et de molécules co-stimulatrices à

leur surface et migrent vers les zones T des organes lymphoïdes secondaires afin de présenter l'antigène aux lymphocytes T naïfs (Vermaelen et al., 2001). L'interaction avec les lymphocytes T naïfs peut mener à des réponses variées selon le type de CD impliqué et son état d'activation. Les CD constituent ainsi le lien entre l'immunité innée et adaptative.

## 1.2 Immunité adaptative

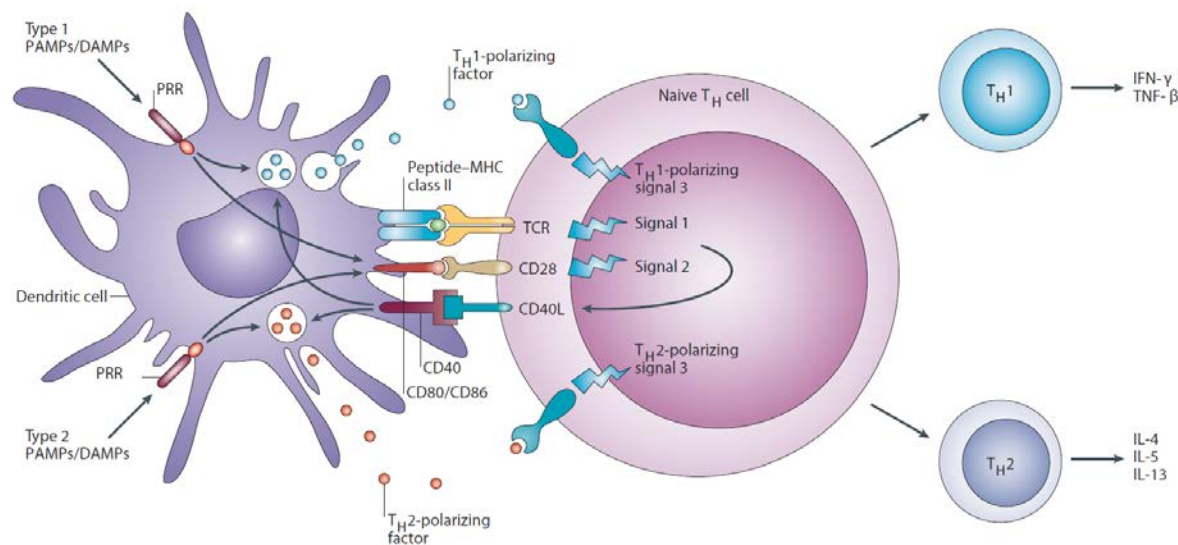
La réponse adaptative, plus lente à se développer que la réponse innée, est médiée par les lymphocytes qui possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques à un antigène particulier. Le nombre important de lymphocytes implique un vaste répertoire très diversifié de récepteurs. Elle est également caractérisée par la mise en place d'une mémoire immunologique qui permettra le développement beaucoup plus rapide de la réponse immunitaire lors d'une réexposition ultérieure au pathogène.

Le développement d'une réponse immune adaptative nécessite l'activation des lymphocytes T  $CD4^+$  également appelé lymphocytes T auxiliaires ou *helper* (Th). Ces lymphocytes jouent un rôle central dans la réponse immune adaptative en aidant les lymphocytes B à produire des anticorps, en maintenant les réponses cytotoxique médiée par les lymphocytes T  $CD8^+$  et en produisant différents types de cytokines nécessaires à la protection contre une très large gamme de microorganismes pathogènes. Ces fonctions sont assurées par différents types de lymphocytes Th dotés de fonctions effectrices et capacités migratoires différentes (Sallusto, 2016).

### 1.2.1 Activation du lymphocyte T $CD4^+$

Comme mentionné ci-dessus, l'activation des lymphocytes T naïfs se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires suite à l'interaction avec une CPA, le plus souvent une cellule dendritique, après sa migration depuis le site d'infection. Les lymphocytes Th activés se différencient en sous-types particuliers de lymphocytes Th et subissent une expansion clonale en lymphocytes effecteurs ou mémoires. Les lymphocytes effecteurs quittent les organes lymphoïdes et migrent dans les tissus périphériques enflammés. Les lymphocytes Th mémoires sont comme leur nom l'indique responsables de la mémoire immunologique.

Trois signaux sont nécessaires pour l'activation du lymphocyte Th naïf (**figure 3**).



**Figure 3. La polarisation du lymphocyte Th nécessite 3 signaux.** Le premier signal est un signal spécifique à l'antigène, transmis via le TCR et déclenché par la reconnaissance de peptides dérivés de pathogènes, internalisés via les PRR et associés au CMH-II. Le deuxième signal est un signal de co-stimulation, principalement induit par la liaison du CD28 au CD80 et CD86 qui sont exprimés par la CD après liaison de PAMPs ou de facteurs tissulaires (TFs) inflammatoires aux PRRs. Le troisième signal est un signal de polarisation qui est induit par divers facteurs solubles ou liés à la membrane cellulaire. Une polarisation optimale requiert souvent une stimulation par le CD40 ligand exprimé par le lymphocyte T après activation par les signaux 1 et 2. (D'après Kapsenberg, 2003).

Le premier signal se fait par l'intermédiaire du récepteur du lymphocyte Th, le *T cell receptor* (TCR). Chaque lymphocyte Th possède un TCR spécifique d'un antigène protéique. Ce dernier ne reconnaît pas l'antigène sous sa forme native mais sous forme de peptides dérivés de la protéine antigénique présentés par le CMH de classe II (CMH-II) de la CPA.

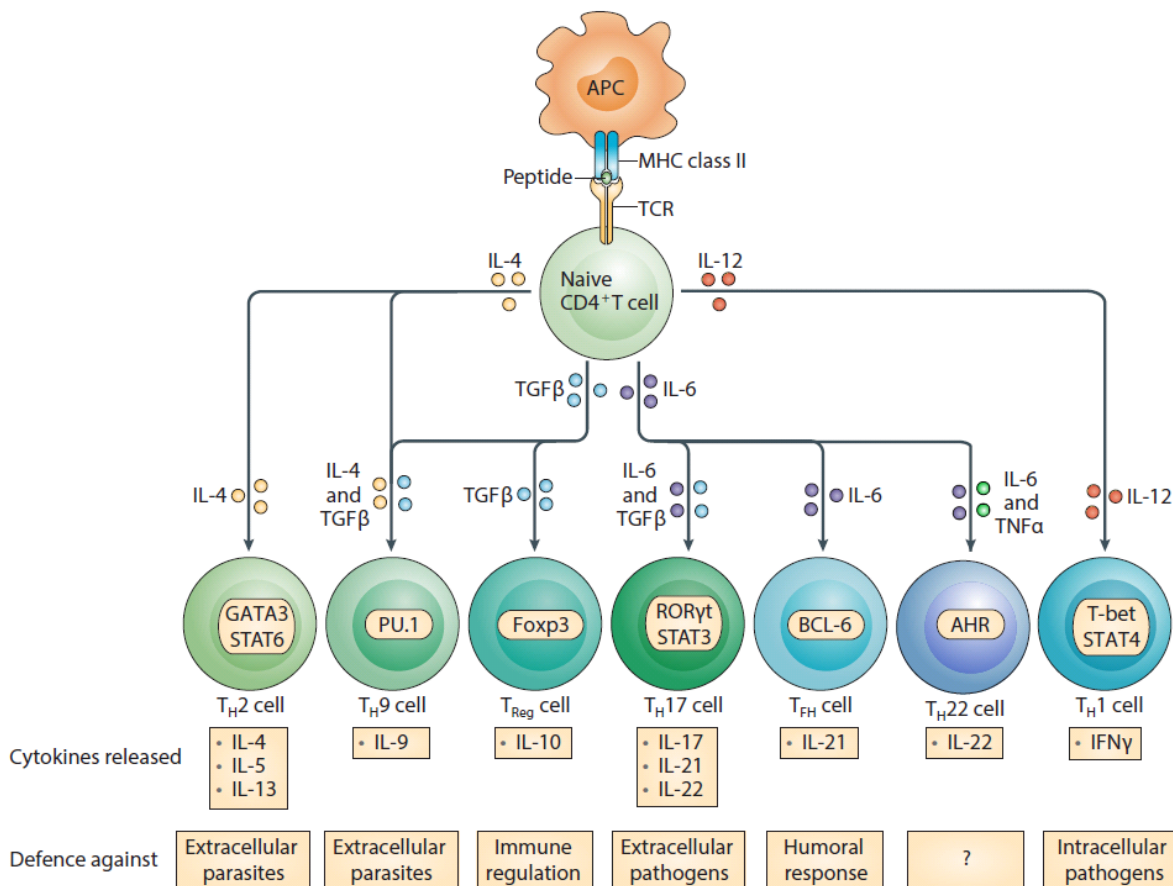
Le deuxième signal est un signal de co-stimulation délivré par la CPA. En absence de ce signal, les lymphocytes Th deviennent anergiques ce qui peut conduire à une tolérance à l'encontre de l'antigène (Kapsenberg, 2003). Ce second signal peut être délivré par une variété de molécules de co-stimulation exprimées à la surface des CPAs mais la voie la plus connue est celle faisant intervenir les molécules de co-stimulation CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) de la CD avec le récepteur CD28 du lymphocyte Th naïf. Les molécules de co-stimulation sont généralement classées en 2 familles : la famille des immunoglobulines (Ig) qui regroupe notamment CD28, ICOS, PD-1, TIM et la famille des récepteurs à *Tumor necrosis factor* (TNF) qui regroupe notamment OX40 et CD27 (Coquet et al., 2015). L'activation au préalable de la CD par des PAMPs ou DAMPs est indispensable pour induire sa maturation et son expression de molécules de co-stimulation. Les conditions d'activation et le degré de maturation de la CD influencent d'ailleurs le signal délivré au lymphocyte Th naïf (Kapsenberg, 2003). Toutefois, les interactions entre le lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et la CD peuvent également faciliter l'expression de molécules de co-stimulation par la CD, notamment pour les CDs résidentes des organes

lymphoïdes secondaires très peu exposées aux pathogènes et donc très peu stimulées par leurs PRRs (Coquet et al., 2015). Les récepteurs de costimulation activent de nombreux régulateurs transcriptionnels tels que NF- $\kappa$ B, AP-1, *Nuclear factor of activated T cells* (NFAT) et c-Maf qui ont des effets modulateurs importants sur les voies de signalisation qui induisent la différenciation du lymphocyte Th naïf (Coquet et al., 2015). Les molécules de costimulation peuvent également avoir un effet inhibiteur. C'est le cas du récepteur *cytotoxic T-lymphocyte antigen* (CTLA)-4 qui possède une affinité plus importante que le CD80 et le CD86 pour le CD28 et empêche donc ainsi la costimulation par ces deux molécules. La liaison du CTLA-4 au CD28 rend le lymphocyte T anergique (Greenwald et al., 2005).

L'environnement cytokinique est également un facteur clé pour l'activation et la différenciation du lymphocyte Th et constitue le troisième signal. Les cytokines fournissent un signal précis pour l'orientation de la différenciation du lymphocyte Th naïf. Ces cytokines stimulent des récepteurs présents à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et activent les *Janus kinases* (JAKs) qui, à leur tour, phosphorylent les facteurs de transcriptions *Signal transducers and activators of transcription* (STATs). Le récepteur cytokinique et la molécule STAT impliquée fournissent le signal unique qui active la différenciation d'un lymphocyte Th spécifique en induisant l'expression de facteurs de transcription spécifiques (Coquet et al., 2015; O'Shea et al., 2011).

### 1.2.2 Différents lymphocytes Th

Sur base de la nature du pathogène rencontré, le système immunitaire induit un type de réponse Th adaptée contre ce pathogène particulier. Pendant de nombreuses années, les sous-populations de lymphocytes Th n'étaient limités qu'à deux grands sous-types connus: les lymphocytes Th1 et Th2. Il est maintenant connu qu'il existe de nombreux autres sous-types de lymphocytes Th qui se définissent sur base de leur capacité à produire certaines cytokines spécifiques et de leur expression de facteurs de transcription particuliers (**figure 4**). Il existe cependant une certaine plasticité dans les réponses Th induites, et le facteur de transcription spécifique d'un sous-type particulier ne sera pas complètement réprimés mais exprimé à un niveau très faible dans un autre sous-type de lymphocyte Th, pouvant mener à une reprogrammation fonctionnelle du lymphocyte T (Sallusto, 2016). L'activation de ces lymphocytes est dans la plupart des cas essentielle pour éliminer l'infection. Cependant dans certaines situations, des lymphocytes Th sont activés à l'encontre de molécules du soi ou d'antigènes inoffensifs menant respectivement à des maladies auto-immunes ou à des allergies.



**Figure 4. Polarisation des différents sous-types de lymphocytes Th.** Représentation schématique des cytokines prototypiques et des voies de signalisation et facteurs de transcription à l'origine de la différenciation des différents types de lymphocyte Th ainsi que des cytokines libérées et de la nature de la réponse générée par les différents Th. (Adapté de Kaplan et al., 2015).

### 1.2.2.1 Lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 sont responsables de la défense de l'hôte à l'encontre des pathogènes intracellulaires et jouent également un rôle dans l'immunité anti-tumorale (Ikeda et al., 2004; Sallusto, 2016). Ces cellules produisent de l'IFN- $\gamma$ , un puissant activateur de macrophages important pour l'élimination de certains pathogènes intracellulaires.

L'IFN- $\gamma$  et l'IL-12p70, un hétérodimère composé des sous-unités IL-12p35 et IL-12p40, sont les cytokines responsables de la polarisation des Th naïfs en Th1 (Seder et al., 1993; Zhu et al., 2010). L'activation de STAT1 par l'IFN- $\gamma$  permet l'expression de T-bet, le facteur de transcription clé des lymphocytes Th1 qui induit la production d'IFN $\gamma$  et du récepteur de l'IL-12p70 à la surface du Th1 (Lighvani et al., 2001). La liaison de l'IL-12p70 à son récepteur active STAT4 qui amplifie également la production de son récepteur et d'IFN- $\gamma$  (Weaver et al., 2007).

### 1.2.2.2 Lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 sont impliqués dans les réponses à l'encontre des helminthes et sont également à l'origine des réponses allergiques telles que l'asthme allergique. Les principales cytokines Th2 qui médient ces réponses sont l'IL-4, IL-5 et l'IL-13 et leurs effets seront décrits plus en détail dans le chapitre consacré à l'asthme allergique.

En plus d'être une cytokine Th2 effectrice importante, l'IL-4 est cruciale à la différenciation des lymphocytes Th2. L'IL-4 active STAT6 qui uprégule l'expression de GATA3, le facteur de transcription caractéristique des Th2 (Paul and Zhu, 2010). Celui-ci contribue à l'autoactivation de sa propre expression et induit des modifications épigénétiques qui conduisent à l'expression des cytokines Th2 (Weaver et al., 2007). Les lymphocytes Th2 peuvent également être induits via l'activation de STAT5 qui est lui-même induit par l'IL-2, l'IL-17 ou le *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP). Une activation forte de STAT5 nécessite des concentrations plus faibles de GATA3 pour induire des lymphocytes Th2 (Paul and Zhu, 2010).

### 1.2.2.3 Lymphocytes Th17

Les lymphocytes Th17 sont abondants au niveau des muqueuses où ils sont responsables de l'élimination des champignons et des bactéries extracellulaires pathogènes. Ils sont également impliqués dans des maladies autoimmunes telles que l'arthrite rhumatoïde ou la maladie de Crohn (Littman and Rudensky, 2010). Ces cellules sont également impliquées dans la pathogénie l'asthme (Robinson, 2010). Les Th17 produisent principalement de l'IL-17 (également appelée IL-17A), IL-17F et IL-22, cytokines impliquées dans le recrutement de neutrophiles, la réparation et le remodelage tissulaire et la production de protéines antimicrobiennes (Littman and Rudensky, 2010). De l'IL-21 est également produite par les Th17 et permettrait la communication avec des cellules immunes ainsi que l'amplification de la réponse Th17 au même titre que l'IFN $\gamma$  et l'IL-4 pour les réponses Th1 et Th2 respectivement (Korn et al., 2009).

Les facteurs requis pour la différenciation des lymphocytes Th17 sont le *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$  et l'IL-6. L'IL-6 et l'IL-21 activent STAT3 qui induit l'expression de l'IL-17 et de l'IL-21 mais également du récepteur à l'IL-23 et du facteur de transcription caractéristique des lymphocytes Th17, ROR $\gamma$ t (Ivanov et al., 2006; Zhu et al., 2010). Ce dernier renforce à son tour la production d'IL-17. L'IL-23 permettrait l'expansion et le maintien de la réponse Th17 (Weaver et al., 2007). Le facteur de transcription *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AHR) est également nécessaire pour la production d'IL-22 (Cochez et al., 2016).

#### 1.2.2.4 Lymphocytes T Follicular helper

Les lymphocytes T Follicular helper ( $T_{FH}$ ) sont localisés au niveau des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires où ils fournissent de l'aide aux lymphocytes B pour la maturation d'affinité, la commutation de classe et la différenciation des lymphocytes B mémoires en plasmocytes notamment via la production d'IL-21 (Crotty, 2011; Eivazi et al., 2016).

Leur différenciation dépend de l'expression du facteur de transcription *B-cell lymphoma* (BCL)-6 qui est uprégulé en présence d'IL-21 et d'IL-6 (Nurieva et al., 2009).

#### 1.2.2.5 Lymphocytes Th9

Les lymphocytes Th9 sont moins bien caractérisés. Ils produisent de l'IL-9 qui a longtemps été considérée comme une cytokine Th2. Comme les Th9 ne sont pas les seules cellules à produire cette cytokine, leur contribution aux différentes réponses immunologiques est donc difficile à déterminer *in vivo*. Cependant ils participeraient à l'immunité protectrice de l'hôte lors des infections aux helminthes et seraient également impliqués dans des maladies immunopathologiques telles que les allergies et la maladie de Crohn (Kaplan et al., 2015).

Leur différenciation nécessiterait de l'IL-4 et du TGF- $\beta$  et le facteur de transcription PU.1 serait nécessaire à leur développement (Chang et al., 2010; Veldhoen et al., 2008).

#### 1.2.2.6 Lymphocytes Th22

Les lymphocytes Th22 sont également très peu décrits suite à leur identification assez récente. Ils seraient principalement présents au niveau de la peau et sont caractérisés par leur production d'IL-22 sans production d'IL-17 ou d'IFN- $\gamma$  (Duhon et al., 2009; Eyerich et al., 2009).

Leur activation dépendrait de l'IL-6 et de TNF- $\alpha$  et le facteur de transcription AHR leur permettrait de réguler leur production d'IL-22 (Duhon et al., 2009; Trifari et al., 2009).

### 1.2.3 Lymphocytes T $CD8^+$

Les lymphocytes T  $CD8^+$ , également appelé lymphocytes T cytotoxiques, médient les réponses immunes face aux pathogènes intracellulaires tels que les virus en induisant la lyse les cellules infectées. Les T  $CD8^+$  naïfs possèdent un TCR capable de reconnaître des peptides antigéniques présentés au niveau du CMH de classe I des cellules infectées. L'activation du lymphocyte T  $CD8^+$  naïf entraîne son expansion clonale et une différenciation en lymphocyte effecteur dont la fonction principale est d'induire la lyse des cellules cibles en libérant des granzymes et perforines (Harty et al., 2000; Williams and Bevan, 2007). Bien que le CMH-I soit normalement limité à la présentation d'antigènes endogènes, des CPAs professionnelles peuvent néanmoins présenter au



niveau de leur CMH-I des antigènes exogènes collectés dans des tissus non lymphoïdes et activer les T CD8<sup>+</sup> naïfs dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce phénomène est appelé cross-présentation (Kurts, 2000).

### ***1.2.4 Lymphocytes B et réponse humorale***

Les lymphocytes B sont les principaux médiateurs de la réponse humorale. La reconnaissance antigénique des lymphocytes B se fait grâce à leur récepteur *B cell receptor* (BCR), une Ig encrée à leur surface. Cette liaison est nécessaire à leur activation qui requiert également la reconnaissance de peptides antigéniques sur le CMH-II du lymphocyte B par le lymphocyte T<sub>FH</sub> pour stimuler la production d'anticorps par le lymphocyte B et induire leur expansion clonale. La prolifération des lymphocytes B est à l'origine de la formation des centres germinatifs présents dans les organes lymphoïdes secondaires où avec l'aide des T<sub>FH</sub>, les lymphocytes B subissent la maturation d'affinité et la commutation isotypique. Les lymphocytes B se différencient également en plasmocytes et lymphocytes B mémoires.

## 2 L'asthme allergique

### 2.1 Définition

L'asthme est une maladie hétérogène habituellement caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires. Elle est définie par les symptômes respiratoires qui la caractérisent tels qu'une respiration sifflante, un essoufflement, une sensation d'oppression thoracique, une toux qui varie en intensité et au cours du temps ainsi qu'une limitation variable de la circulation de l'air (2017 GINA Report : Global Strategy for Asthma Management and Prevention, <http://ginasthma.org/>).

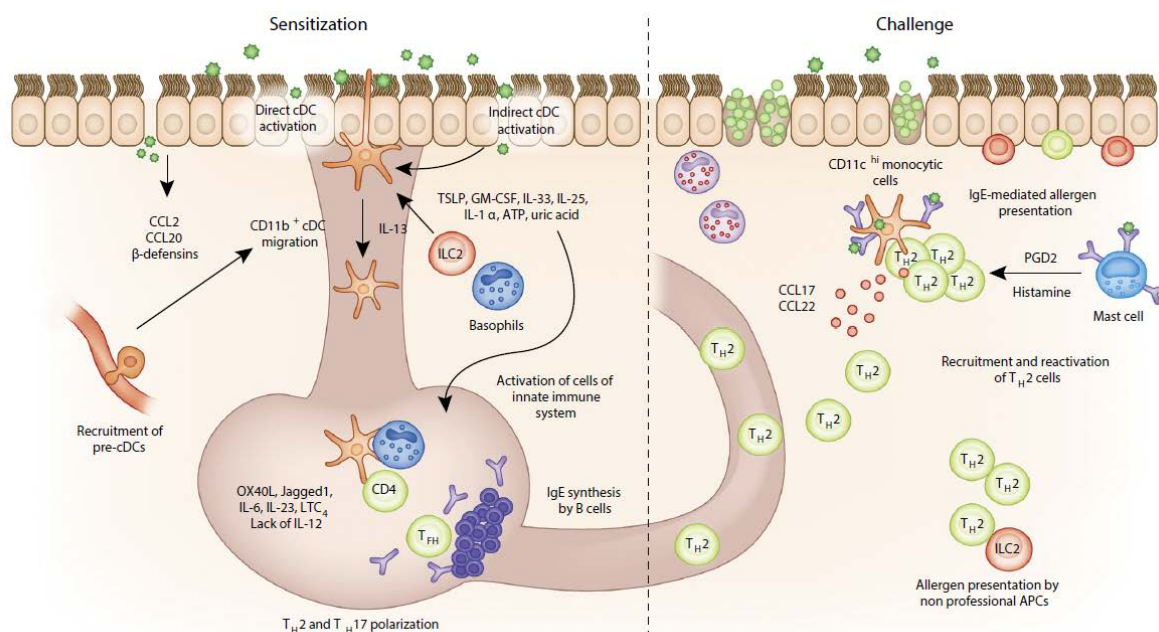
Deux formes principales de la maladie peuvent être distinguées : l'asthme extrinsèque également appelé asthme atopique ou allergique qui regroupe environ 70% des patients asthmatiques et l'asthme intrinsèque ou non-atopique. L'asthme atopique se développe généralement chez les enfants et est défini par la présence d'une quantité anormalement élevée d'immunoglobulines de type E (IgE) dans le sang ainsi qu'une cuti-réaction positive aux aéro-allergènes communs. L'asthme intrinsèque se développe généralement plus tard dans la vie de l'individu et ceux-ci présentent une cuti-réaction négative et ne voient pas leur niveau d'IgE sérique augmenter (Humbert et al., 1999; Lambrecht and Hammad, 2015). L'asthme étant un syndrome hétérogène, d'autres systèmes de classification existent sur base d'autres signes cliniques, de la sévérité de la maladie ou du contrôle de la maladie par différents traitements (Wenzel, 2012). Dans la suite de cette thèse nous nous intéresserons principalement à l'asthme atopique.

### 2.2 Pathophysiologie

#### 2.2.1 Sensibilisation allergique

Le développement de la maladie requiert une sensibilisation de l'individu à l'encontre d'un allergène auquel il sera allergique (**figure 5**). Lors de cette phase de sensibilisation, les lymphocytes Th naïfs se différencient en lymphocytes Th effecteurs, principalement des lymphocytes Th2. Cette étape requiert, comme décrit plus haut, l'activation de CD soit indirectement par des cytokines ou signaux de dangers libérés par les cellules épithéliales soit directement par l'allergène (Lambrecht and Hammad, 2014). Les CD activées migrent jusqu'au ganglion lymphatique drainant où elles induisent la différenciation des lymphocytes Th2. Le mécanisme responsable de leur différenciation reste peu connu mais la contribution de l'IL-4 a été clairement établie. Cependant la source d'IL-4 reste à ce jour controversée bien que les basophiles aient été proposés comme cellules responsables de la polarisation de la réponse Th2 suite à leur production d'IL-4 (Paul and Zhu, 2010). Certains lymphocytes Th adoptent un profil  $T_{FH}$  et induisent la production des IgE par les lymphocytes B. Les IgE se fixent ensuite sur les récepteurs Fc de haute affinité (FcεRI) présents à la surface des

mastocytes et basophiles mais également sur les récepteurs Fc de faible affinité (FcεRII) présents à la surface des autres cellules inflammatoires (Holgate, 2012).



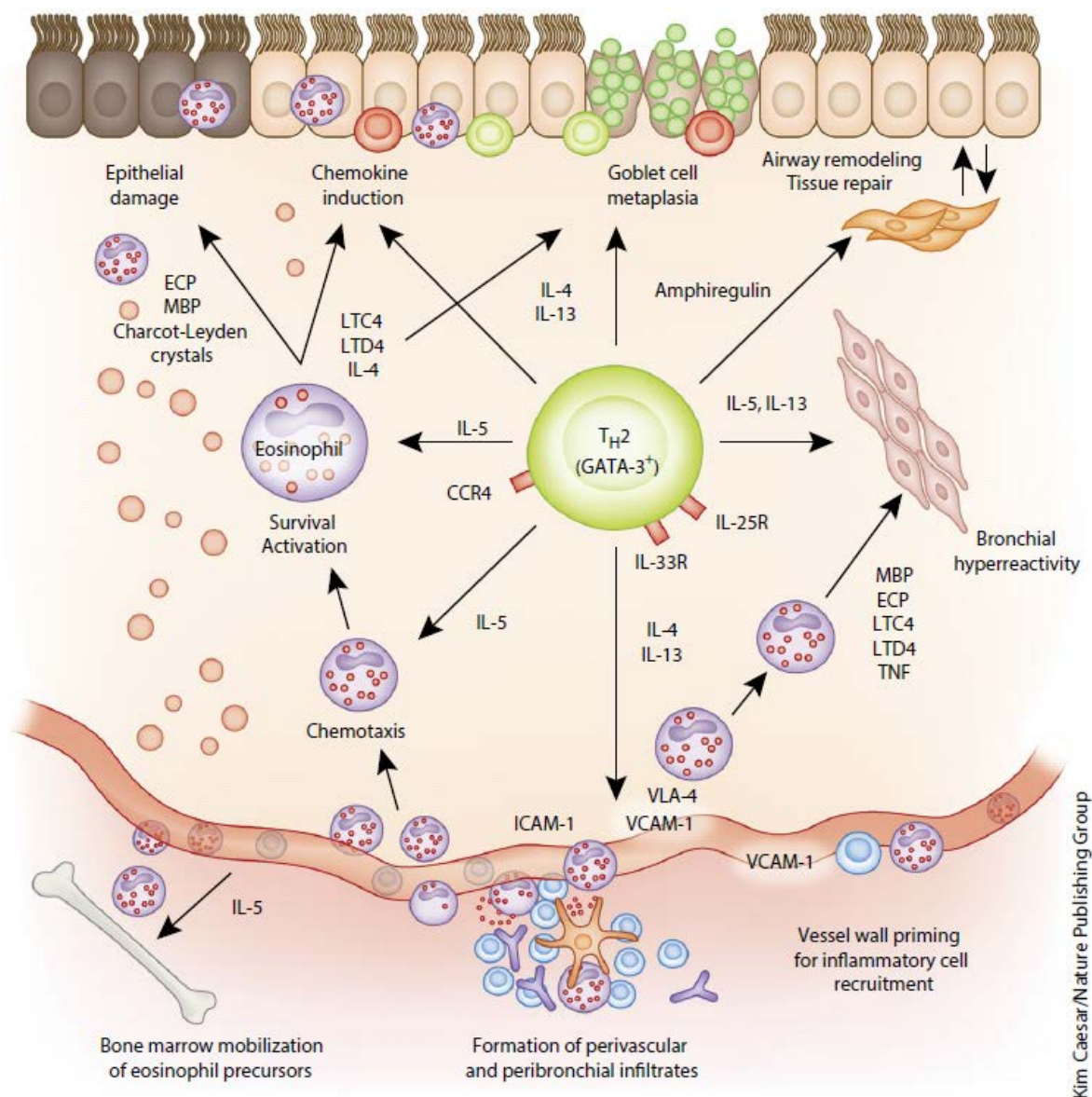
**Figure 5. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les phases de sensibilisation et de challenge allergénique.** Les CD4 et les cellules épithéliales peuvent être activées directement par les allergènes suite à leur expression de PRRs à leur surface. En réponse aux allergènes, les cellules épithéliales produisent des chémokines (CCL2 et CCL20) qui attirent les CD4 immatures. Les cellules épithéliales activées produisent des cytokines « instructives » (IL-1α, GM-CSF, IL-25, IL-33 et TSLP) et des signaux de danger (ATP et acide urique) qui favorisent la maturation d'une population de CD4, les CD4 CD11b<sup>+</sup> Ly-6C<sup>-</sup>. Les CD4 activées migrent ensuite jusqu'au ganglion médiastinal drainant où elles induisent la différenciation des lymphocytes Th naïfs en Th2 et en Th17. La migration des CD4 est également stimulée par l'IL-13 produite par les ILC2. Certains lymphocytes Th produisent de l'IL-21 et adoptent un profil de T<sub>FH</sub> pour induire la commutation isotypique en IgE par les lymphocytes B. Au niveau des ganglions, les CD4 reçoivent de l'aide des basophiles pour induire une réponse Th2. Lors de la réexposition à l'allergène, les CD4 restimulent localement la fonction effectrice des lymphocytes T résidents du poumon et recrutent des lymphocytes Th2 effecteurs via la production de CCL-17 et de CCL-22. (D'après Lambrecht and Hammad, 2015).

## 2.2.2 Réexposition à l'allergène

Une fois sensibilisé, la réexposition des voies aériennes d'un individu au même allergène induit une bronchoconstriction qui se déroule en deux phases. La phase précoce induite quelques minutes après la réexposition à l'allergène est déclenchée par les mastocytes qui suite à la liaison de l'allergène aux IgE présentes à leur surface libèrent divers médiateurs tels que de l'histamine, de la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) et des leucotriènes (LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub>) mais également des cytokines Th2 et

du TNF- $\alpha$ . Ceux-ci induisent la contraction des muscles lisses bronchiques, une sécrétion accrue de mucus, une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires telles qu'éosinophiles, lymphocytes Th2 et basophiles (Galli et al., 2008). Le TNF- $\alpha$  est responsable d'un recrutement de neutrophiles et d'une augmentation de l'hyperréactivité des voies aériennes (Bradding et al., 2006).

Cette phase précoce est suivie par une phase tardive qui se développe entre deux et six heures après la réexposition à l'allergène et atteint son maximum entre six et neuf heures après la rencontre avec l'allergène. Elle est liée à l'infiltration et l'activation de leucocytes, principalement les lymphocytes Th2 et les éosinophiles. Les cytokines Th2 libérées par les lymphocytes Th2 recrutés au niveau du poumon orchestrent la réponse allergique via notamment la survie des lymphocytes Th2 (médiée par l'IL-4), la commutation isotypique vers les IgE (IL-4 et IL-13), la différenciation et la maturation des mastocytes (IL-3, IL-9 et IL-13), l'activation, la maturation, la migration et la survie des éosinophiles (IL-3, IL-5 et *Granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF)), le recrutement des basophiles (IL-3 et GM-CSF) et la contraction des muscles lisses responsable de l'hyperréactivité bronchique (IL-4 et IL-13) (Finkelman et al., 2010; Holgate, 2012) (**figure 6**). Les éosinophiles recrutés suite à l'action de chimio-attractants et de cytokines sécrétées par les mastocytes et les lymphocytes Th2, mûrissent et migrent jusqu'aux voies respiratoires où ils libèrent différentes substances toxiques responsables de dommages à l'épithélium bronchique, d'une augmentation de l'hyperréactivité des voies respiratoires et d'une augmentation de la dégranulation des mastocytes. Les éosinophiles produisent, comme les mastocytes, des leucotriènes et des cytokines de type Th2, lesquelles sont responsables de la contraction des muscles respiratoires lisses, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une augmentation du recrutement d'éosinophiles, entraînant ainsi une boucle d'auto-entretien de l'inflammation éosinophilique (Bernstein, 2008; Holgate, 2008). Les éosinophiles sécrètent également divers protéines cytotoxiques responsables de dommages tissulaires (Licona-Limón et al., 2013).



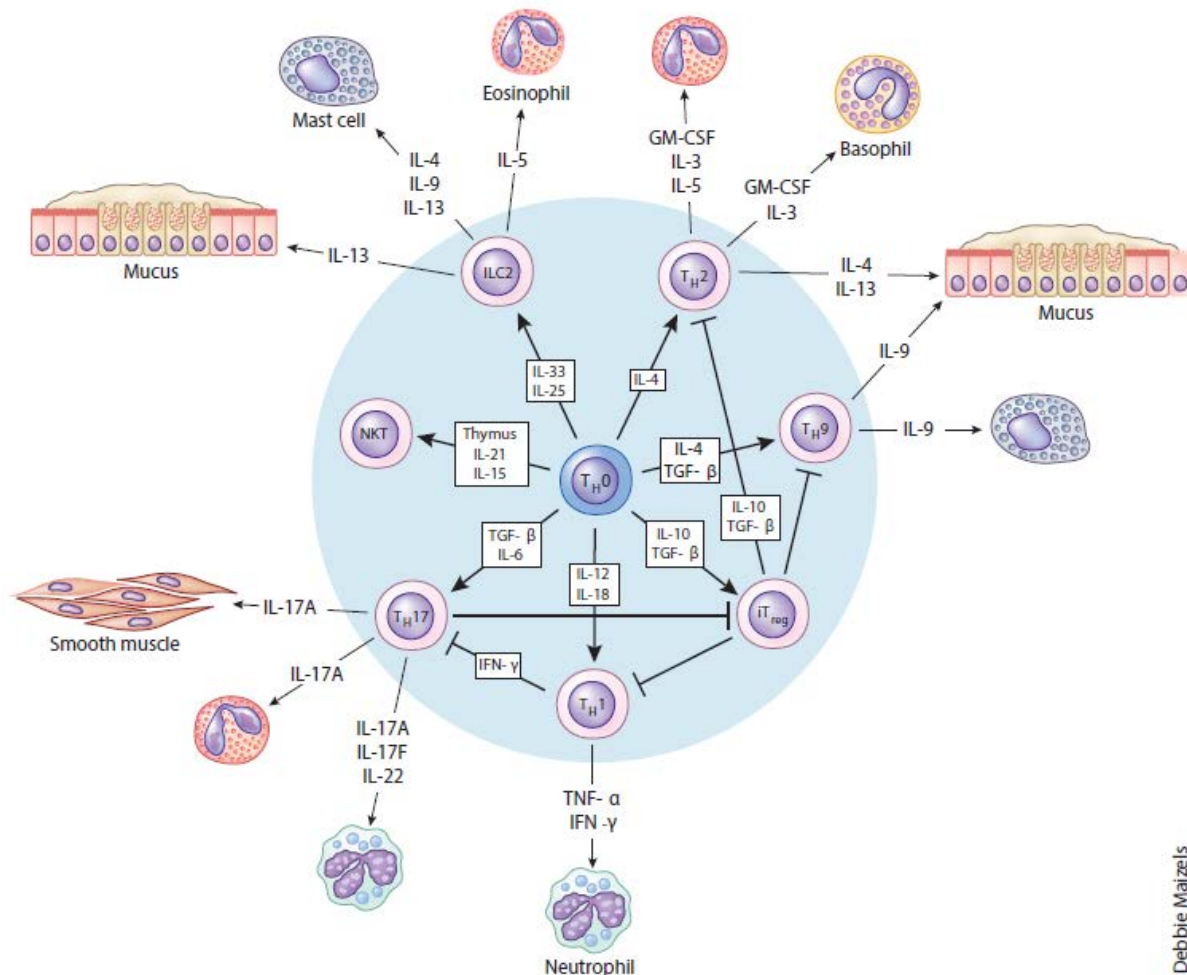
Kim Caesar/Nature Publishing Group

**Figure 6. Rôle central des lymphocytes Th2 dans l'allergie respiratoire.** Les lymphocytes Th2 expriment le facteur de transcription GATA3 qui conduit à la production de cytokines Th2 : IL-4, IL-5 et IL-13. L'IL-5 contrôle le développement d'éosinophiles dans la moelle osseuse et l'IL-13 induit une métaplasie des cellules caliciformes, de l'hyperréactivité bronchique et une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 par les cellules endothéliales afin d'induire la sortie des éosinophiles dans le tissu pulmonaire. (Adapté de Lambrecht and Hammad, 2015).

### 2.2.3 Autres acteurs de la réponse allergique

Bien que les lymphocytes Th2 soient les acteurs principaux de la réponse allergique, il est maintenant accepté que d'autres mécanismes sont impliqués dans le développement de l'asthme (**figure 7**). Les lymphocytes Th9 et Th17 sont notamment responsables de la production d'IL-9 et du

recrutement de neutrophiles dans le cas d'asthme sévère respectivement (Lloyd and Hessel, 2010; Wilson et al., 2009). Les ILC de type 2 (ILC2) décrites récemment joueraient également un rôle dans la phase effectrice de la réponse Th2 suite à leur production d'IL-5, IL-9 et IL-13 (Moro et al., 2010; Neill et al., 2010; Price et al., 2010). Un rôle des lymphocytes T Natural Killer de type I (*i*NKT) dans la bronchoconstriction dépendante de l'IL-13 a également été démontrée (Akbari et al., 2003).



Debbie Maizels

**Figure 7. Différents sous-types de cellules lymphoïdes T impliquées dans la pathogénie de l'asthme.** Divers signaux induisent la différenciation de différents types de lymphocytes Th qui génèrent des cytokines qui influencent, parfois de façon indirecte, différents types cellulaires menant à une hyperréactivité et une inflammation allergique des voies respiratoire. (D'après Holgate, 2012).

### 2.2.4 Remodelage des voies aériennes

L'exposition continue et répétée à l'allergène conduit à une inflammation persistante associée à des changements structuraux. Ce remodelage consiste en une desquamation de l'épithélium bronchique, un dépôt de collagène au niveau des voies aériennes, une hypertrophie des muscles respiratoires lisses, une hyperplasie des glandes muqueuses et cellules productrices de mucus, dont

résulte une production accrue de mucus, et de l'hyperplasie vasculaire (Bernstein, 2008; Lemanske and Busse, 2003). Une obstruction irréversible des voies aériennes peut donc être observée chez les individus atteints d'asthme sévère (Locksley, 2010).

## 2.3 Epidemiologie

L'asthme affecte actuellement 300 millions de personnes dans le monde, ce qui représente 4.3% de la population mondiale et sa prévalence ne cesse d'augmenter comme en témoigne l'augmentation de 2.9% observée chaque année entre 2001 et 2010 (Loftus and Wise, 2016). Les pays occidentaux sont les plus touchés mais on observe également une augmentation de sa prévalence dans les pays en voie de développement en parallèle avec leur industrialisation (Masoli et al., 2004). Les conséquences économiques de l'asthme sont considérables. En effet, 1 à 2% du budget des soins de santé des pays développés lui sont attribuables (Braman, 2006) et les coûts liés à cette maladie sont estimés à plus de 18 milliards de dollars aux USA (Lambrecht and Hammad, 2015).

## 2.4 Etiologie

La rupture de la tolérance à l'encontre d'antigènes provenant de molécules environnementales inoffensives qui se déroule dans le cas de l'asthme allergique (Trompette et al., 2009) est le résultat d'interactions complexes entre le bagage génétique d'un individu et les stimuli environnementaux auquel il est soumis (Busse and Rosenwasser, 2003).

### 2.4.1 Facteurs génétiques

La contribution héréditaire de la maladie a été beaucoup investiguée ces dernières années et serait proche de 60% (Locksley, 2010). La complexité de la maladie rend l'identification précise des gènes impliqués assez difficile (Ober, 2005). Néanmoins, il semblerait qu'il n'y ait pas que quelques gènes impliqués mais de nombreux loci ayant chacun une petite contribution (Lemanske and Busse, 2003; Locksley, 2010).

Globalement, les gènes de susceptibilité à l'asthme peuvent être classés en 4 grands catégories : les gènes associés à l'immunité innée et l'immunorégulation, les gènes associés à la différenciation Th2 et aux fonctions effectrices, les gènes associés à la biologie épithéliale et à l'immunité mucoale et les gènes associés à la fonction pulmonaire, au remodelage des voies aériennes et la sévérité de la maladie (von Mutius, 2009).

## **2.4.2 *Autres facteurs impliqués***

Bien que la contribution génétique au développement de l'allergie des voies respiratoires soit clairement établie, la forte augmentation de sa prévalence observée ces dernières décennies ne peut s'expliquer que par l'influence de facteurs environnementaux.

### **2.4.2.1 Exposition aux allergènes**

Les principaux agents environnementaux responsables de la plupart des maladies allergiques sont les pollens et les allergènes d'intérieurs tels que les émanations d'acariens, de cafards, de chats (Holt and Thomas, 2005). Les enfants sensibilisés à ces aéro-allergènes tôt dans l'enfance sont plus propices à développer de l'asthme (Holgate et al., 2015). Cependant, l'exposition à ces allergènes dans l'enfance ne serait pas un facteur de risque pour le développement de l'asthme (Eder et al., 2006).

### **2.4.2.2 La pollution**

La pollution de l'air ambiant, qui a fortement augmenté en parallèle à l'urbanisation et l'augmentation de la population, constitue un facteur de risque pour les individus asthmatiques (Holgate et al., 2015). Les particules fines, les polluants gazeux (dioxyde d'azote et ozone) et la pollution de l'air liée au trafic routier favoriseraient l'incidence et l'exacerbation de l'asthme (Gowers et al., 2012; Guarnieri and Balmes, 2014).

### **2.4.2.3 Le tabac**

L'exposition à la fumée de cigarette, qui contient un mélange complexe de divers composés organiques et de dioxyde d'azote, a également été démontrée comme étant un facteur de risque important pour le développement de l'asthme (Burke et al., 2012; Vork et al., 2007). De plus, le tabagisme maternel et grand-maternel augmenterait fortement le risque d'asthme infantile (Li et al., 2005).

### **2.4.2.4 L'obésité et le régime alimentaire**

Une forte association entre l'obésité et la prévalence de l'asthme a été mise en évidence. Bien qu'une relation de cause inverse ait été proposée, il est maintenant reconnu que l'obésité précède l'apparition des symptômes asthmatiques et serait un facteur de risque pour le développement de la maladie (Muc et al., 2016). De plus, les patients asthmatiques obèses présenteraient un moins bon contrôle de la maladie et une augmentation de la sévérité des symptômes (Muc et al., 2016). Le régime alimentaire pourrait également influencer sur la maladie (McKeever and Britton, 2004).



### **2.4.2.5 Les virus**

Les infections virales respiratoires sévères chez les enfants en bas âge sont un des facteurs de risque majeurs pour le développement de l'asthme plus tard dans l'enfance. Les principaux virus concernés sont le virus respiratoire syncytial et le rhinovirus (Lemanske et al., 2005; Sigurs et al., 2000). Les infections virales respiratoires représentent également la cause la plus fréquente d'exacerbation de la maladie (Busse et al., 2010).

### **2.4.2.6 L'exposition aux microorganismes**

A l'inverse, l'exposition à certains microorganismes serait bénéfique et protégerait du développement de l'asthme. De manière générale, l'excès d'hygiène est actuellement perçu comme la principale cause de l'augmentation de la prévalence de la maladie. La théorie de l'hygiène à l'origine de ce concept est née de l'observation de Strachan en 1989, démontrant une forte association entre la taille de la famille et la position de l'enfant dans la famille avec le développement d'allergies respiratoires. Il a proposé sur base de cette observation qu'une infection tôt dans l'enfance transmise par un contact non hygiénique avec des frères et sœurs plus âgés ou acquise durant la vie fœtale suite à une infection maternelle par un contact avec les aînés protégerait du développement de maladies allergiques en éduquant le système immunitaire immature de l'enfant (Strachan, 1989). Cette hypothèse a depuis lors quelque peu évolué suite aux nombreuses études épidémiologiques venues l'étayer. Ainsi, ces dernières années, plusieurs éléments tendent à montrer que ce ne serait pas uniquement une infection manifeste par un pathogène mais plutôt une exposition environnementale à des produits microbiens qui pourrait se rapporter à la théorie de l'hygiène (Braun-Fahrländer et al., 2002; Ege et al., 2011; von Mutius et al., 2000). De nombreuses études épidémiologiques ont ainsi démontré qu'un environnement rural et moins hygiénique protégerait du développement d'allergies respiratoires (Braun-Fahrländer et al., 1999; Riedler et al., 2000, 2001; Von Ehrenstein et al., 2000). Ces observations ont récemment été confirmées par une étude démontrant que les Amish qui utilisent des pratiques agricoles traditionnelles montrent une prévalence de l'asthme nettement inférieure aux Hutterites qui pratiquent une agriculture industrialisée (Stein et al., 2016). Par ailleurs, la flore intestinale et pulmonaire pourrait influencer sur le développement de la maladie (von Mutius, 2016) et des études ont également montré que le traitement aux antibiotiques augmenterait le risque du développement de l'asthme (Murk et al., 2011; Risnes et al., 2011).

## **2.5 Traitements**

### **2.5.1 Traitements symptomatiques**

De nombreux patients asthmatiques présentent des symptômes intermittents qui peuvent être contrôlés par l'utilisation d'agonistes des récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques associés à de faibles doses de

corticostéroïdes inhalés ou à des antagonistes de récepteurs à leucotriènes. Cependant, de nombreux asthmatiques souffrent d'asthme plus sévère pour lequel ces médications ne suffisent pas à contrôler la maladie (Fahy, 2015). Une augmentation de la dose de corticostéroïdes ainsi que l'ajout d'un traitement adjoind est alors préconisé et chaque patient peut se voir attribuer un traitement personnalisé (Wang and Hoyte, 2016). Dans ce cadre, le développement de nouvelles approches thérapeutiques constitue une perspective encourageante pour un contrôle optimal de la maladie. Des anticorps monoclonaux neutralisant les IgE (omalizumab) ou anti-IL-5 (mepolizumab) sont actuellement commercialisés et d'autres traitements ciblant spécifiquement des cytokines pro-inflammatoires sont en cours de développement (Pelaia et al., 2012).

### **2.5.2 Immunothérapie**

En parallèle à ces traitements symptomatiques, il existe des traitements immunothérapeutiques basés sur l'injection répétée d'allergènes spécifiques afin d'induire la tolérance du patient à cet allergène (Huggins and Looney, 2004). Ce traitement présente toutefois certaines limitations suite notamment à son manque d'efficacité chez certains patients et à sa mise en place assez difficile car il nécessite des injections fréquentes sur une durée moyenne de 3 à 5 ans (Creticos et al., 2006; Fonseca et al., 2011). Le développement de nouveaux agents immunothérapeutiques tels que les CpG (**encadré 2**) est donc un enjeu majeur pour les firmes pharmaceutiques.

#### **2.5.2.1 Effet protecteur des CpG**

Depuis leur découverte en 1995, de nombreuses études se sont intéressées à la réponse immune induite par les CpG et particulièrement leur capacité immunomodulatrice, notamment dans l'asthme allergique. Il a ainsi été démontré dans des modèles animaux que les CpG empêcheraient le développement d'une sensibilisation allergique (Jain et al., 2002; Kline et al., 1998). Ils seraient également capables de guérir un asthme établi chez des animaux déjà sensibilisés (Broide et al., 1998; Campbell et al., 2014; Fonseca et al., 2011; Kline et al., 2002; Sur et al., 1999) et agiraient favorablement sur le remodelage des voies aériennes (Cho et al., 2006; Youn et al., 2004). Les mécanismes qui sous-tendent ces effets protecteurs restent cependant peu élucidés. En effet, la diminution de la réponse allergique Th2 par les CpG se ferait via la réorientation de la réponse immune vers une réponse Th1 (Broide et al., 1998; Kline et al., 1998, 2002; Sur et al., 1999). Cependant, une étude a démontré que l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  ne seraient pas requis pour la protection induite par les CpG (Kline et al., 1999) et il est maintenant connu que l'effet protecteur des CpG est également observé en absence de l'allergène (Broide et al., 1998, 2001; Sur et al., 1999) et agirait donc indépendamment du système immunitaire adaptatif. D'autres études ont par ailleurs mis en avant l'induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) (Campbell et al., 2014; Jain et al., 2002) ou une

production d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) au niveau du poumon (Hayashi et al., 2004) pour expliquer l'effet protecteur des CpG.

### 2.5.2.2 Utilisation thérapeutique des CpG

Suite aux effets prometteurs des CpG sur la réponse allergique Th2 dans les modèles animaux, l'utilisation de CpG comme adjuvant vaccinal d'immunothérapie ou comme monothérapie sans allergène a dès lors été investiguée et les résultats démontrent une efficacité de ces molécules dans la diminution des troubles allergiques chez l'homme (Beeh et al., 2013; Creticos et al., 2006; Klimek et al., 2011; Senti et al., 2009; Simons et al., 2004; Tulic et al., 2004). Actuellement, plusieurs molécules dérivées de CpG sont développées par des firmes pharmaceutiques et font l'objet d'études cliniques (**tableau 1**) (Aryan et al., 2014; Krieg, 2012; Tartey and Takeuchi, 2017).

**Tableau 1. CpG en développement clinique pour le traitement de l'asthme.**

Oligonucléotide	Compagnie ou sponsor	Etape du développement
AZD1419	Dynavax/Astrazeneca	Préclinique
QbG10	Cytos biotechnology	Phase II
QAX935	Idera Pharmaceuticals	Phase I
AVE0675	Sanofi Aventis/Coley Pharmaceuticals	Phase 1
SAR21609	Sanofi Aventis/Coley Pharmaceuticals	Phase I

(D'après Aryan et al., 2014; Krieg, 2012; Tartey and Takeuchi, 2017).

### 3 Contrôle des réponses immunes

La théorie du « soi et du non-soi », selon laquelle le système immunitaire fonctionne en discriminant les molécules du soi qu'il tolère de celles du non-soi pour lesquelles il induit une réponse, a été pendant des années utilisée pour expliquer pourquoi le système immunitaire répond face à certaines molécules mais pas à d'autres (Burnet, 1959). Ce modèle a dès le départ rencontré quelques incohérences et a depuis évolué pour aboutir à la théorie proposée par Polly Matzinger en 1994 selon laquelle la force motrice du système immunitaire est la reconnaissance du danger, définit comme tout ce qui cause une destruction ou un stress tissulaire (Matzinger, 1994). Dans ce modèle, les signaux de dangers externes (PAMPs) ou internes (DAMPs) indiquent la présence d'une menace au système immunitaire et permettent ainsi l'induction d'une réponse adaptée (Matzinger, 2002).

La muqueuse pulmonaire est constamment exposée à des allergènes et signaux de danger ubiquitaires de l'air ambiant. Cependant, la plupart des individus ne développent pas une réponse allergique à l'encontre de ces molécules inhalées. Il doit donc exister des mécanismes régulateurs au niveau des muqueuses qui empêchent le développement de ces réponses aberrantes.

Plusieurs études ont décrit l'existence de cellules régulatrices aux interfaces mucosales. Il s'agit principalement de certaines populations de CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, de macrophages et de Treg. D'autres cellules, comme les NK (Korsgren et al., 1999), les lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Lahn et al., 1999), les NKT (Lloyd and Murdoch, 2010), les mastocytes (Moon et al., 2010), les lymphocytes B (Singh et al., 2008) et les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Stock et al., 2004) possèderaient également un potentiel régulateur. Cependant, les propriétés régulatrices de ces cellules sont pour la plupart sujet à débat car elles n'ont souvent été décrites que dans certaines conditions particulières et, paradoxalement, ces cellules ont également la capacité de promouvoir des réponses Th2.

#### 3.1 Les cellules dendritiques

Les CD<sub>1</sub> constituent une population hétérogène qui peut être subdivisée en différents groupes sur base de leur fonction, leur phénotype de surface et leur localisation. On peut ainsi distinguer chez la souris des CD<sub>1</sub> plasmacytoïdes et des CD<sub>1</sub> myéloïdes, également appelées conventionnelles, toutes deux présentes dans les tissus lymphoïdes comme dans les tissus non-lymphoïdes tels que la peau, les poumons ou l'intestin (Mildner and Jung, 2014).

Les CD<sub>1</sub> jouent un rôle clé dans l'initiation des réponses immunes et notamment de la réponse Th2 mais il est connu que les CD<sub>1</sub> jouent également un rôle central dans la tolérance de particules environnementales via l'induction de lymphocytes Treg. En effet, des CD<sub>1</sub> intestinales productrices d'acide rétinoïque induisent spécifiquement des Treg (Coombes et al., 2007; Sun et al., 2007). Des CD<sub>1</sub> similaires et possédant la même fonction ont également été observées dans d'autres organes tels

que la peau et le poumon (Guilliams et al., 2010). Au niveau du poumon, les CD<sup>+</sup> plasmacytoïdes (de Heer et al., 2004) mais également des CD<sup>+</sup> myéloïdes productrices d'IL-10 (Akbari et al., 2001) empêcheraient également le développement de réponses incontrôlées via l'induction de Treg (Akbari et al., 2002).

## 3.2 Les lymphocytes T régulateurs

On distingue actuellement deux catégories de lymphocytes Treg. La première catégorie comprend les lymphocytes Treg naturels (nTreg) qui proviennent du thymus et expriment les marqueurs de surface CD4 et CD25 et le facteur de transcription *forkhead box P3* (FoxP3). Ils représentent environ 5 à 10% des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez l'adulte (Hawrylowicz and O'Garra, 2005). La deuxième catégorie comprend les lymphocytes Treg induits (iTreg) et représente une population de cellules assez hétérogène. Les iTreg seraient issus de la différenciation aux niveaux des tissus périphériques de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs suite à la rencontre d'un antigène en présence de TGF- $\beta$ , d'acide rétinoïque ou d'IL-10 (Littman and Rudensky, 2010). Différentes sous-populations ont été décrites parmi les iTreg sur base de leur phénotype et des cytokines qu'ils sécrètent (Hawrylowicz, 2005). Les Treg sont localisés au niveau des tissus périphériques et des ganglions qui les drainent et induisent leurs effets suppresseurs par contact cellulaire direct ou via la production de cytokines telles que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 (Sakaguchi et al., 2008).

Des études réalisées sur des modèles animaux ont montré l'importance des iTreg pour le maintien de la tolérance aux surfaces mucoales (Curotto de Lafaille et al., 2008; Josefowicz et al., 2012; Ostroukhova et al., 2004). En effet, la neutralisation du TGF- $\beta$  dans des modèles animaux de tolérance bloque la différenciation des iTreg Foxp3<sup>+</sup> et permet le développement d'une réponse Th2 éosinophilique dans les voies aériennes (Duan et al., 2008; Mucida et al., 2005). De plus, la déficience en Foxp3 induit une inflammation spontanée de type Th2 dans les tissus mucoaux (Josefowicz et al., 2012). Le développement de lymphocytes iTreg Foxp3<sup>-</sup> réduisant l'inflammation pulmonaire suite à une exposition antigénique a également été décrit (Duan et al., 2011).

## 3.3 Les macrophages

### 3.3.1 Hétérogénéité

Les macrophages, à l'origine identifiés par Ilya Metchnikoff sur base de leur capacité de phagocytose, sont stratégiquement localisés dans tous les tissus où ils assument un rôle de sentinelle du système immunitaire et font preuve d'une grande plasticité pour répondre aux changements environnementaux. Ces cellules affichent une forte diversité phénotypique et fonctionnelle suite aux tâches spécifiques qu'ils assument au sein des tissus dans lesquels ils résident (**tableaux 2 et 3**) (Davies et al., 2013; Murray and Wynn, 2011).

**Tableau 2. Macrophages des tissus non-lymphoïdes.**

Tissu	Type cellulaire	Fonction	Phénotype
<b>Peau</b>	Macrophages du derme	Surveillance immune	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD11c <sup>lo</sup> , CD206 <sup>+</sup> , MHCII <sup>lo</sup> ,Dectin-1 <sup>+</sup> ,CD301 <sup>+</sup> , Dectin-2 <sup>+</sup>
	Cellules de Langerhans	Interaction avec les lymphocytes T	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD11c <sup>+</sup> ,Langerin <sup>+</sup>
<b>Système nerveux central</b>	Microglie	Favorise la survie des neurones, surveillance immune de première ligne, élimination des neurones morts et remodelage synaptique	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD45 <sup>lo</sup>
	Macrophages périvasculaires	Surveillance immune	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD163 <sup>+</sup> ,CD45 <sup>hi</sup>
	Macrophages des méninges	Surveillance immune	F4/80 <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , CD45 <sup>hi</sup>
<b>Poumon</b>	Macrophages alvéolaires	Surveillance immune pour des pathogènes inhalés et regulation homéostatique de la fonction tissulaire	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>lo</sup> ,CD11c <sup>hi</sup> ,CD68 <sup>+</sup> , SiglecF <sup>+</sup> ,MARCO <sup>+</sup> , CD206 <sup>+</sup> , Dectin-1 <sup>+</sup> ,Galectin-3 <sup>+</sup>
	Macrophages interstitiels	Régulation des réponses immunes via la maturation et/ou activation des CD	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11c <sup>-</sup> ,CD68 <sup>+</sup> ,MHCII <sup>+</sup>
<b>Cœur</b>	Macrophages du cœur	Phagocytose des cardiomyocytes mourants	
<b>Intestin</b>	Macrophages de la lamina propria	Maintien de l'homéostasie intestinale et regulation des réponses immunes	CX3CR1 <sup>hi</sup> ,F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD11c <sup>+</sup> , CD64 <sup>+</sup>
<b>Foie</b>	Cellules de Kupffer	Élimination des microorganismes et débris cellulaires du sang et élimination des érythrocytes âgés	F4/80 <sup>hi</sup> ,CD11b <sup>lo</sup> ,CD169 <sup>+</sup> ,CD68 <sup>+</sup> , Galectin-3 <sup>+</sup> , CD80 <sup>lo/-</sup>
	Macrophages motiles du foie	Surveillance immune	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD80 <sup>hi</sup>
<b>Os</b>	Ostéoclastes	Résorption des os par perturbation de la matrice minéralisée	Récepteur à la calcitonine (cellules multinuclées)
<b>Tissus adipeux</b>	Macrophages associés aux tissus adipeux	Contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la thermogénèse adaptative	F4/80 <sup>+</sup> , CD45 <sup>+</sup>
<b>Tissus séreux</b>	Macrophages péritonéaux	Surveillance immune et régulation de l'environnement homéostatique, élimination des cellules apoptotiques	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup>
	Macrophages pleuraux	Surveillance immune	F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup>

(D'après Chow et al., 2011; Davies et al., 2013; Lavin et al., 2015).

**Tableau 3. Macrophages des tissus lymphoïdes.**

Tissu	Type cellulaire	Fonction	Phénotype
<b>Rate</b>	Macrophages de la pulpe rouge	Elimination des érythrocytes et métabolisme du fer	F4/80 <sup>+</sup> ,CD206 <sup>+</sup> ,Dectin-2 <sup>+</sup>
	Macrophages de la zone marginale	Surveillance immune de la circulation	CD68 <sup>+</sup> ,CD209b <sup>+</sup> , MARCO <sup>+</sup> , Dectin-2 <sup>+</sup> ,Tim4 <sup>+</sup>
	Macrophages métallophiliques	Surveillance immune	CD68 <sup>+</sup> ,CD169 <sup>+</sup>
	Macrophages de la pulpe blanche	Elimination des cellules apoptotiques au niveau des centres germinatifs	CD68 <sup>+</sup>
<b>Ganglion</b>	Macrophages du sinus sous-capsulaire	Capture d'antigènes et présentation aux lymphocytes B	F4/80 <sup>lo</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD169 <sup>+</sup> ,CD11c <sup>lo</sup> , MARCO <sup>+</sup>
	Macrophages médullaires	Capture d'antigènes et présentation aux lymphocytes B	F4/80 <sup>hi</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD169 <sup>+</sup> ,CD11c <sup>lo</sup>
	Macrophages CD11c <sup>hi</sup> CD169 <sup>+</sup>		F4/80 <sup>+</sup> ,CD11c <sup>hi</sup> ,MHCII <sup>+</sup> ,CD169 <sup>+</sup> ,CD8 <sup>+</sup>
	Macrophages des centres germinatifs		F4/80 <sup>+</sup> ,CD11b <sup>+</sup> ,CD68 <sup>+</sup> ,MFG-E8 <sup>+</sup>
<b>Thymus</b>	Macrophages sous-capsulaires		F4/80 <sup>+</sup> ,MHCII <sup>+</sup> ,Mac-2 <sup>-</sup> ,FcγRII <sup>+</sup> , FcγRIII <sup>+</sup>
	Macrophages du cortex		F4/80 <sup>+</sup> ,MHCII <sup>+</sup> ,Mac-2 <sup>+</sup> ,FcγRII <sup>+</sup> , FcγRIII <sup>+</sup>
	Macrophages cortico-médullaires		F4/80 <sup>+</sup> ,MHCII <sup>+</sup> ,Mac-2 <sup>+</sup> ,FcγRII <sup>hi</sup> , FcγRIII <sup>hi</sup>
	Macrophages médullaires		F4/80 <sup>+</sup> ,MHCII <sup>hi</sup> ,Mac-2 <sup>+</sup> ,FcγRII <sup>+</sup> , FcγRIII <sup>+</sup>
<b>Moelle</b>	Macrophages de la moelle	Aide dans l'érythropoïèse et maintien des cellules souches hématopoïétiques	F4/80 <sup>+</sup> ,CD169 <sup>+</sup> ,ER-HR3 <sup>+</sup>

(D'après Chow et al., 2011; Davies et al., 2013; Lavin et al., 2015).

### 3.3.2 Classification

Les macrophages sont fréquemment classés en deux catégories sur base du paradigme M1/M2. L'observation que des macrophages activés dans un contexte Th1 ou Th2 diffèrent qualitativement dans leur capacité à répondre à des stimuli classiques a donné naissance à ce modèle (Mills et al., 2000). Ainsi les macrophages M1 activés classiquement répondent à l'IFN $\gamma$  et au LPS, produisent de l'oxyde d'azote (NO) et des cytokines proinflammatoires et favorisent une réponse Th1 et au contraire des macrophages M2 activés alternativement par de l'IL-4 ou de l'IL-13 qui expriment l'arginase 1 et le récepteur au mannose CD206 et favorisent une réponse Th2 (Murray and Wynn, 2011). Cette

classification a évolué afin d'englober certains stimuli tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les glucocorticoïdes et on peut maintenant distinguer différentes sous-catégories parmi les macrophages M2 (Mantovani et al., 2004). Cette classification peut refléter certains états d'activation extrêmes mais elle ne peut cependant pas représenter l'environnement *in vivo* complexe de nombreux types de macrophages tissulaires, pour lesquels de nombreuses autres cytokines et facteurs de croissance interagissent pour définir la différenciation cellulaire finale. De plus les profils transcriptionnels des macrophages montrent une grande diversité avec peu de recoupement suggérant plutôt que chaque population de macrophage pourrait représenter une classe unique (Wynn et al., 2013). Siamon Gordon, spécialiste des macrophages, a d'ailleurs récemment mis en évidence les limitations de cette classification (Martinez and Gordon, 2014).

### 3.3.3 Ontogénie

L'origine des macrophages reposait jusqu'il y a peu sur un modèle appelé « système de phagocytes mononucléés » (*Mononuclear phagocyte system*, MPS) établi en 1968 par Ralph van Furth and Zanvil Cohn (van Furth and Cohn, 1968). Selon ce modèle les macrophages tissulaires adultes sont définis comme des cellules complètement différenciées ayant perdu le potentiel de prolifération et qui se repeupleraient constamment à partir de monocytes classiques circulants dérivés de la moelle osseuse (**encadré 3**). Cette théorie, basée sur des études *in vitro* de différenciation de cellules de moelle ou de monocytes en macrophage, sur des expériences de transfert adoptif de monocytes marqués qui se différencient en macrophages et sur l'observation que des leucocytes sanguins recrutés au niveau du péritoine lors d'une inflammation se différencient en macrophages, a été confirmée par des expériences subséquentes notamment de transplantation de cellules souches (*hematopoietic stem cell*, HSC) à des souris receveuses irradiées (Lavin et al., 2015; Perdiguero and Geissmann, 2016). Cependant, certaines études démontrant entre autres la prolifération de macrophages adultes au sein des tissus (Sawyer et al., 1982) ainsi que la présence de macrophages dans le sac vitellin avant l'apparition de monocytes sanguins (Naito et al., 1996) sont venues contredire ce modèle. Ce n'est toutefois que récemment, avec le progrès des technologies disponibles (**encadré 4**) que l'applicabilité générale de ce dogme a été remise en question (Ginhoux and Jung, 2014).

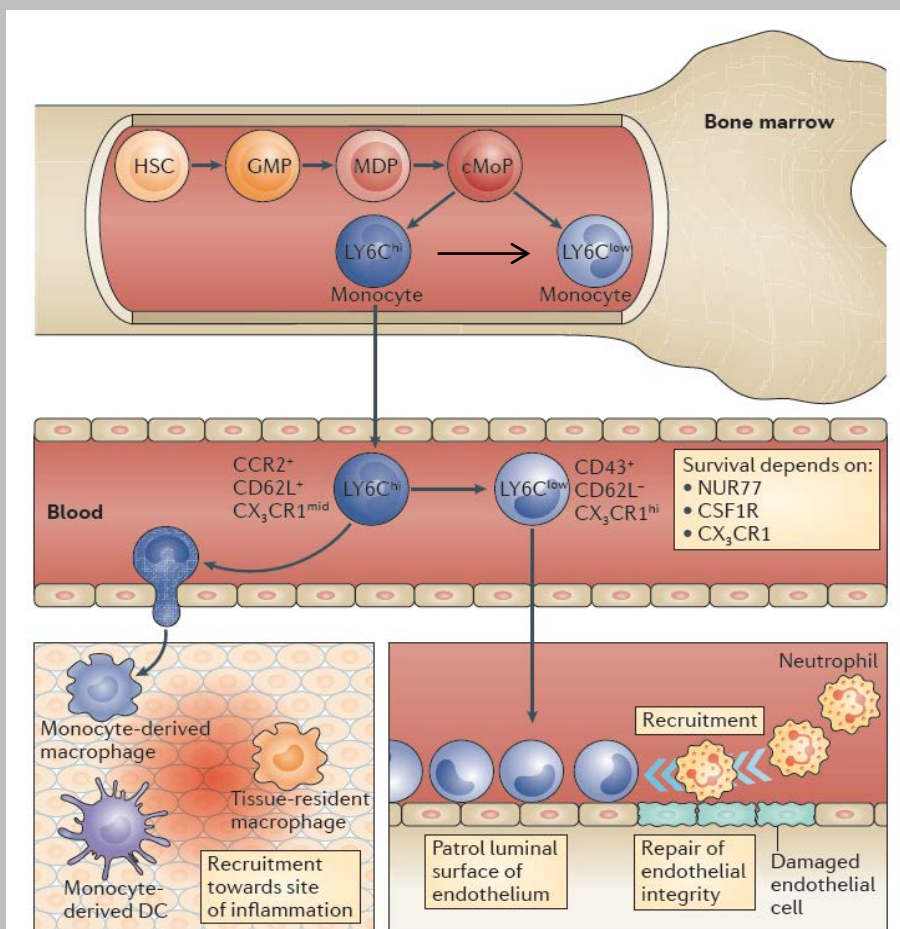


### Encadré 3 | Sous-populations de monocytes sanguins.

Les monocytes sanguins murins sont des leucocytes circulants mononucléés exprimant le F4/80, CD11b et CD115. Deux populations aux fonctions et propriétés migratoires différentes peuvent être distinguées sur base notamment du marqueur Ly-6C (Geissmann et al., 2003).

**Monocytes classiques Ly-6C<sup>hi</sup>** : ces cellules sont caractérisées par le phénotype Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>hi</sup>CX3CR1<sup>int</sup>CD62L<sup>+</sup>GR-1<sup>hi</sup>Lselectin<sup>+</sup>CD43<sup>lo</sup>. Elles se développent dans la moelle osseuse à partir de progéniteurs myéloïdes dérivés de HSC (Ginhoux and Jung, 2014) et nécessitent l'expression du récepteur CCR2 pour sortir de la moelle (Serbina and Pamer, 2006). Une étude a également montré qu'une hématopoïèse extramédullaire peut produire des monocytes à partir de HSC lors d'une inflammation (Robbins et al., 2012). Cette hématopoïèse extramédullaire a été observée au niveau de la rate, un organe qui constitue d'ailleurs un réservoir de monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> CCR2 indépendants (Swirski et al., 2009). Les monocytes classiques ont une grande capacité de phagocytose, sont recrutés dans les tissus lors d'une inflammation et peuvent agir comme des précurseurs de phagocytes mononucléés périphériques (Jakubzick et al., 2017). Certains monocytes peuvent également transiter par les tissus en dehors d'une inflammation afin de capter et transporter des antigènes jusqu'aux ganglions (Jakubzick et al., 2013).

**Monocytes patrouilleurs Ly-6C<sup>lo</sup>** : ces cellules sont caractérisées par le phénotype Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup>GR-1<sup>lo</sup>Lselectin<sup>-</sup>CD43<sup>hi</sup>. Elles peuvent se développer à partir des monocytes classiques (Mildner et al., 2017) d'une façon dépendante du facteur de transcription NR4A1, nécessaire à la différenciation et à la survie des monocytes patrouilleurs (Hanna et al., 2011). Ces monocytes adhèrent à la surface luminale de l'endothélium et migrent le long de celle-ci afin d'assurer leur rôle de surveillance des vaisseaux sanguins (Ginhoux and Jung, 2014).



(Adapté de  
Ginhoux and  
Jung, 2014)

**Encadré 4 | Outils pour l'étude de l'origine des macrophages**

Souris transgéniques : technique génétique permettant le suivi *in vivo* de populations cellulaires afin de précisément identifier et suivre différentes populations de macrophages embryonnaires jusqu'à l'âge adulte. Les modèles utilisés impliquent le plus souvent une cre recombinase inducible exprimée sous le contrôle d'un promoteur spécifique à une lignée cellulaire afin d'exciser une cassette STOP floxée qui précède le gène codant pour une protéine fluorescente (Epelman et al., 2014a).

Parabiose : technique dans laquelle deux souris du même fond génétique mais dont on peut distinguer les cellules immunes (i.e. souris C57BL/6 exprimant l'allèle CD45.1 sur ses cellules immunes et une souris C57BL/6 exprimant l'allèle CD45.2) sont suturées l'une à l'autre par la peau du flanc afin qu'une communication vasculaire s'établisse entre les deux animaux. L'analyse est réalisée plusieurs mois après la chirurgie car cette technique vise à identifier la contribution des cellules sanguines au maintien des cellules immunes chez une souris adulte. Lors de l'analyse, les cellules présentant un chimérisme constitué d'un mélange de cellules provenant des deux souris témoignent d'un renouvellement de ces cellules par des cellules sanguines circulantes. Au contraire, les cellules étant constituées d'une majorité de cellules de l'hôte dont elles sont issues ne nécessitent aucun apport sanguin pour leur renouvellement.

Grefe de moelle compétitive : technique basée sur l'irradiation léthale de souris receveuses afin d'éliminer leurs cellules immunes juste avant une greffe de cellules de moelle, généralement un mélange en proportions identiques de cellules WT CD45.1<sup>+</sup> et *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> (l'allèle CD45 permettant de distinguer dans les souris receveuses les cellules WT des cellules *Ccr2*<sup>-/-</sup>), les cellules *Ccr2*<sup>-/-</sup> étant incapables de générer des monocytes classiques circulant comme CCR2 est nécessaire à ces cellules pour sortir de la moelle. Cette technique a également pour but d'étudier la contribution des monocytes sanguins (i.e. monocytes classiques) au repeuplement des cellules immunes mais dans ce cas-ci après déplétion des cellules de l'hôte, c'est-à-dire suite à un stress tissulaire au contraire de la technique de parabiose qui se réalise à l'état basal. Les cellules qui se repeuplent indépendamment de CCR2 (e.g. lymphocytes, neutrophiles) exhibent un chimérisme environ équivalent en CD45.1 et CD45.2 au contraire des cellules qui se repeuplent à partir de monocytes classiques qui possèdent un chimérisme d'environ 80% de cellules WT CD45.1<sup>+</sup>. Afin de différencier les cellules de l'hôte radorésistantes des cellules greffées, des souris receveuses possédant les 2 allèles CD45.1/2 peuvent être utilisées.

Ainsi, des études de parabiose ont révélé que les lymphocytes, monocytes sanguins et CDs des organes lymphoïdes étaient renouvelés à partir de cellules circulantes comme en témoigne le chimérisme de ces cellules constitué d'un mélange de cellules provenant des deux souris parabiontes, au contraire de certains macrophages tissulaires tels que la microglie (Ajami et al., 2007; Ginhoux et al., 2010), les cellules de Langerhans (Merad et al., 2002) et les macrophages alvéolaires (MA) (Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013) qui, après 1 année de parabiose, provenaient uniquement de la souris hôte, démontrant que ces cellules se maintiennent à l'âge adulte indépendamment de précurseurs circulants (Ginhoux and Guilliams, 2016).

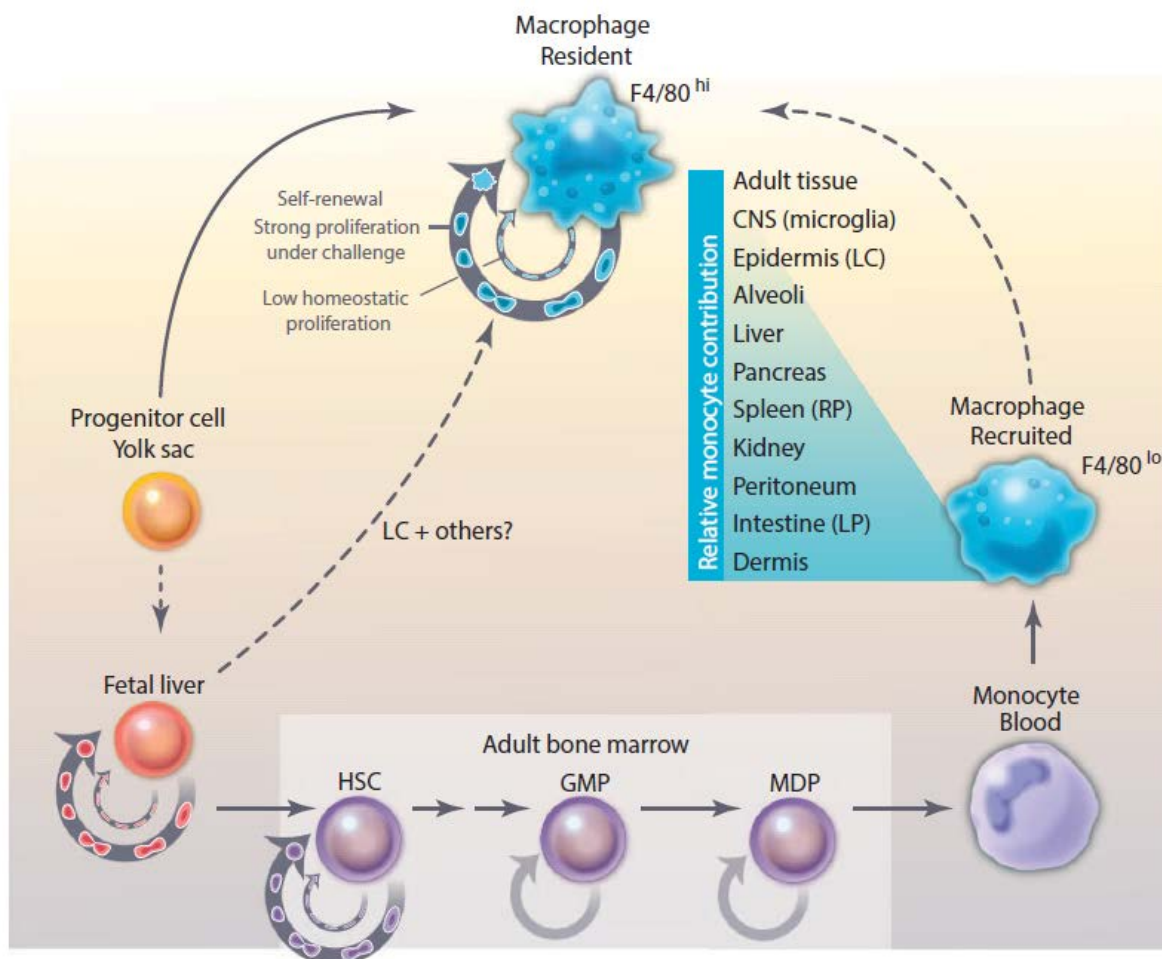
Le suivi *in vivo* des populations de monocytes, macrophages et de progéniteurs embryonnaires réalisé avec des outils transgéniques a également démontré que bien que les monocytes sanguins peuvent donner naissance à des macrophages dans certaines conditions, les macrophages résidant dans les tissus s'établissent durant le développement embryonnaire et persistent jusqu'à l'âge adulte indépendamment des monocytes sanguins (Ginhoux et al., 2010; Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Différents précurseurs embryonnaires de macrophages sont produits dans des vagues indépendantes au cours du développement (Hoeffel and Ginhoux, 2015; van de Laar et al., 2016; Mass et al., 2016). Cependant bien que l'origine embryonnaire des macrophages soit maintenant acceptée, l'identité précise des progéniteurs embryonnaires qui donnent naissance aux différents macrophages fœtaux, les voies de différenciation de ces progéniteurs et les facteurs de transcription impliqués restent sujet à débat (Ginhoux and Guilliams, 2016; Hoeffel and Ginhoux, 2015; Mass et al., 2016; Perdiguero and Geissmann, 2016; Sheng et al., 2015). Une étude a par ailleurs montré que les différents précurseurs embryonnaires de macrophages générés au cours de l'embryogenèse ainsi que les monocytes sanguins possèdent les mêmes capacités de différenciation en MA mature (van de Laar et al., 2016). L'empreinte de la niche où les progéniteurs de macrophages vont se localiser constituerait ainsi le facteur déterminant l'identité du macrophage (Guilliams and Scott, 2017).

Bien que l'origine embryonnaire et la capacité d'auto-renouvellement de macrophages aient été confirmées dans différents tissus, certaines populations de macrophages dépendent d'une contribution monocyttaire pour leur maintien chez l'adulte. Il a ainsi été montré que les macrophages dérivés de l'embryon et localisés au niveau de l'intestin (Bain et al., 2014), du derme (Tamoutounour et al., 2013) et du cœur (Epelman et al., 2014b; Molawi et al., 2014) ne persisteraient pas chez l'adulte et seraient graduellement remplacés par des macrophages dérivés de monocytes sanguins.

Par ailleurs l'origine des macrophages à l'état basal, où, à l'exception de certains tissus, les macrophages sont maintenus avec une contribution minimale des monocytes circulants adultes, doit être distinguée de l'origine de ces cellules lors d'une inflammation. En effet, en conditions inflammatoires ou lors d'un stress génotoxique suite à une irradiation létale, la contribution monocyttaire au pool de

macrophages peut être grandement augmentée suite au recrutement massif de monocytes sanguins au niveau des tissus endommagés (Lavin et al., 2015).

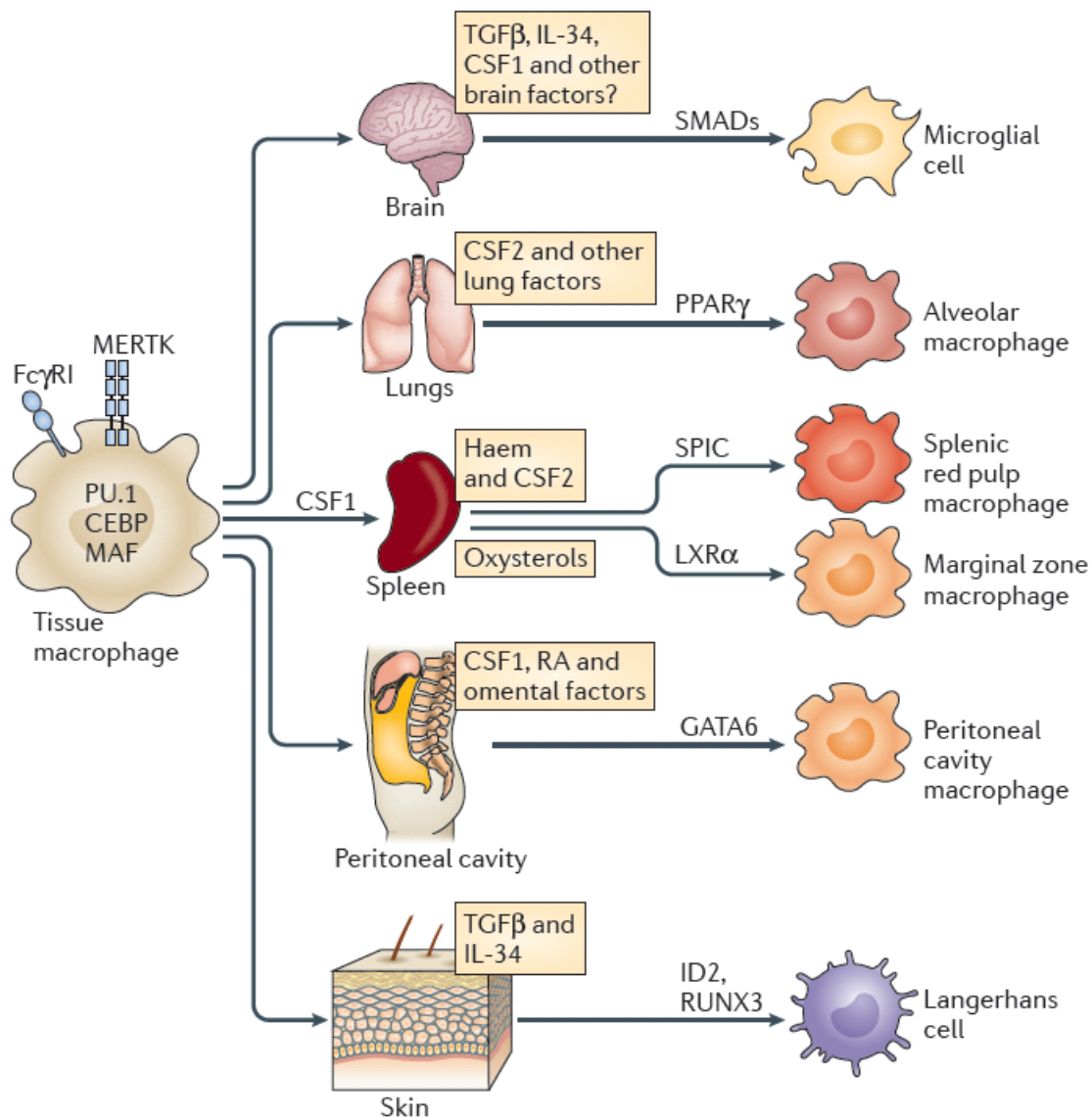
Ainsi l'origine des macrophages peut être double : ils peuvent provenir de progéniteurs embryonnaires ou de monocytes sanguins (**figure 8**).



**Figure 8. Origine double des macrophages tissulaires.** Les macrophages peuvent se développer à partir de progéniteurs embryonnaires provenant du sac vitellin (ou du foie foetal) et se maintenir dans le tissu adulte par auto-renouvellement local. Cet auto-renouvellement est caractérisé par de faibles taux de prolifération à l'état basal et une forte expansion après déplétion ou lors d'une stimulation. Les macrophages peuvent également se développer à partir de HSC. La contribution monocytaire aux macrophages résidents dépend fortement du tissu dans lequel résident les macrophages et varie d'une contribution nulle en monocytes pour la microglie et les cellules de Langerhans à une contribution totale pour les macrophages de l'intestin. (D'après Sieweke and Allen, 2013).

La proportion monocytaire parmi le pool de macrophages tissulaire dépend de la nature du tissu ainsi que de la nature de la blessure en conditions inflammatoires. L'environnement tissulaire est

également important pour la régulation, la maintenance et la spécialisation fonctionnelle des macrophages (**figure 9**).



**Figure 9.** L'environnement tissulaire détermine la différenciation des macrophages. Les macrophages tissulaires sont caractérisés par l'expression des marqueurs de surface  $Fc\gamma RI$  ( $CD64$ ) et  $Mertk$  et des facteurs de transcription  $PU.1$ ,  $CEBP$  et  $MafB/c-Maf$ . Dans les tissus, l'identité et la fonction des macrophages sont déterminés par les cytokines et les métabolites qui sont produits par l'environnement local et mènent à l'expression de facteurs de transcription spécifiques. (D'après Lavin et al., 2015).

### 3.3.4 *Macrophages immunosuppresseurs*

#### 3.3.4.1 Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs)

Les *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) sont des cellules myéloïdes CD11b<sup>+</sup> GR-1<sup>+</sup> qui comprennent des précurseurs de macrophages, granulocytes, CD8 et cellules myéloïdes (Gabrilovich, 2017). Elles forment un groupe hétérogène de cellules mais peuvent se diviser en deux groupes principaux, les granulocytaires ou polymorphonuclées Ly-6G<sup>+</sup> Ly-6C<sup>lo</sup> (PMN-MDSCs) qui sont phénotypiquement et morphologiquement similaires aux neutrophiles et les monocytaires Ly-6G<sup>-</sup> Ly-6C<sup>hi</sup> (M-MDSCs) qui ont un phénotype et une morphologie similaires aux monocytes (Movahedi et al., 2008). Les PMN-MDSCs produisent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au contraire des M-MDSCs qui produisent de grandes quantités de NO (Youn et al., 2008). Leur caractéristique principale est leur capacité à supprimer les réponses T via une interaction de surface, la libération de médiateurs solubles ou l'activation d'enzymes (Bronte et al., 2016; Solito et al., 2017). On retrouve ces cellules chez la souris au niveau de la moelle, du sang périphérique, du foie, du poumon ou associées à des tumeurs de divers organes où elles sont principalement présentes. Ces cellules ne sont pas présentes à l'état basal et sont impliquées dans des conditions pathologiques associées à une inflammation chronique ou à un stress (Gabrilovich, 2017). Elles ont surtout été décrites pour leur implication dans les cancers où elles participent à la suppression de l'immunité anti-tumorale.

#### 3.3.4.2 Macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les MDSCs pourraient être les précurseurs des macrophages associés aux tumeurs (TAMs) (Murray and Wynn, 2011). Bien que les macrophages étaient initialement considérés comme faisant partie de la réponse anti-tumorale, des données cliniques et expérimentales indiquent que dans la majorité des cas, les macrophages favorisent l'initiation de la tumeur et la progression des métastases en supprimant la réponse immunitaire anti-tumorale (Wynn et al., 2013). Lorsque la tumeur est établie, les TAMs se différencient et adoptent un phénotype immunosuppresseur qui favorise la progression de la tumeur (Wynn et al., 2013).

#### 3.3.4.3 Cellules myéloïdes régulatrices CD11b<sup>+</sup> GR-1<sup>int</sup> F4/80<sup>+</sup>

Une étude a montré l'apparition de cellules myéloïdes régulatrices CD11b<sup>+</sup> GR-1<sup>int</sup> F4/80<sup>+</sup> dans les poumons de souris suite à une exposition à de fortes doses de LPS (Arora et al., 2010). Ces cellules dérivent de cellules progénitrices hématopoïétiques circulantes (Massberg et al., 2007) et suppriment les fonctions Th2 effectrices au niveau du poumon. L'effet suppresseur de ces cellules serait dû à l'arginase 1 et l'IL-10 car la diminution *in vitro* de la production de cytokines Th2 par des lymphocytes Th2 induite par ces cellules n'a plus été observé après ajout d'un inhibiteur de l'arginase 1 ni en présence d'anticorps anti-IL-10 (Arora et al., 2010).

### 3.3.4.4 Macrophages producteurs d'IL-10

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui joue un rôle critique dans le contrôle des réponses immunes. Deux populations de macrophages immunosuppresseurs et producteurs d'IL-10 ont été décrites. Ces cellules sont présentes au niveau de l'intestin et du poumon, deux organes dont les surfaces mucosales sont constamment exposées à des signaux de danger qu'elles doivent tolérer.

#### 3.3.4.4.1 Macrophages de l'intestin

La plupart des macrophages de l'intestin sont localisés au niveau de la lamina propria. Parmi les différentes populations de macrophages qui y sont situées (Joeris et al., 2017), une population de macrophages immunorégulateurs F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> a été décrite chez la souris (Denning et al., 2007). Comme mentionné plus haut, ces macrophages sont d'origine hématopoïétique et nécessitent un recrutement constant de monocytes sanguins pour leur maintien. Une étude a également montré que ces macrophages se localiseraient au niveau de la lamina propria d'une façon dépendante de MCP-1 (Takada et al., 2010), le principal ligand du récepteur CCR2 (Shi and Pamer, 2011). Contrairement aux autres macrophages de la lamina propria, ils sont très peu sensibles à la stimulation de leurs TLRs, expriment des molécules immunorégulatrices et produisent de grandes quantités d'IL-10. Ces macrophages ont la capacité de supprimer la différenciation de lymphocytes Th1 et Th17 et d'induire la différenciation de lymphocytes Treg (Denning et al., 2007). Ainsi une diminution de la production d'IL-10 par ces macrophages dans des souris *Cx3cr1*<sup>-/-</sup> entraîne une réduction du nombre de Treg au niveau de la lamina propria qui résulte en une diminution de la tolérance intestinale (Hadis et al., 2011). Le nombre de lymphocytes T FoxP3<sup>+</sup> est d'ailleurs plus élevé dans le colon que dans le petit intestin, en corrélation avec l'abondance relative des macrophages immunosuppresseurs à ces endroits (Joeris et al., 2017). Ces macrophages joueraient donc un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale.

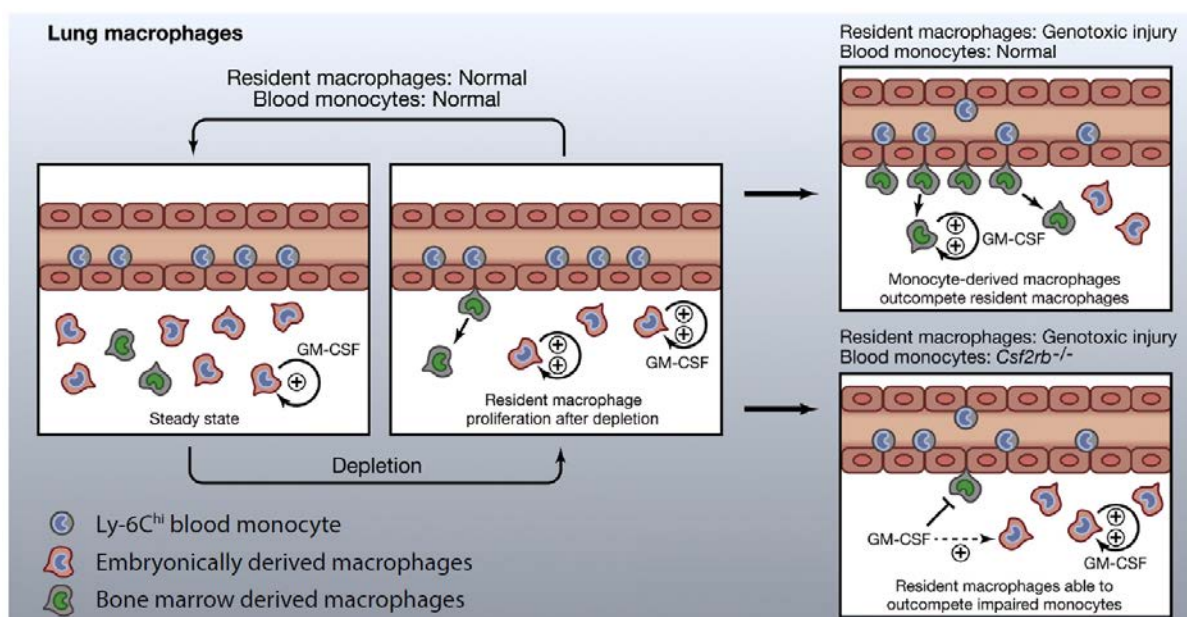
#### 3.3.4.4.2 Macrophages du poumon

Il existe deux populations de macrophages au niveau du poumon : les MA qui constituent environ 90% des macrophages pulmonaires et les macrophages interstitiels (MI) aux propriétés immunosuppresseuses. Chez la souris, ces deux populations expriment le F4/80, marqueur caractéristique de monocytes et macrophages, ainsi que des marqueurs typiques de macrophages (e.g. CD64 et Mertk) et se distinguent phénotypiquement sur base de l'expression du marqueur CD11c ; les MA étant CD11c<sup>+</sup> et les MI CD11c<sup>-</sup>. Les MA se caractérisent également par leur autofluorescence et leur expression de SiglecF.

Etant donné que nous allons principalement nous concentrer sur cet organe dans la suite de ce travail, ce paragraphe ne sera pas dédié uniquement aux MI, mais une brève description des deux populations de macrophages sera présentée.

### 3.3.4.4.2.1 Macrophages alvéolaires

Comme les MA sont les macrophages prépondérants du poumon, la plupart des études portant sur les macrophages pulmonaires, notamment les études d'ontogénie, concernent les MA. Ainsi les MA dérivent d'un précurseur embryonnaire qui colonise le poumon rapidement après la naissance et se différencie en MA grâce au GM-CSF (Guilliams et al., 2013). La voie de signalisation induite par le GM-CSF conduit à l'expression de PPAR- $\gamma$  qui contribue à définir le profil d'expression génique des MA (Lavin et al., 2015). Ceux-ci se maintiennent et se repeuplent lors d'une légère déplétion par prolifération dans le tissu pulmonaire indépendamment d'une contribution de monocytes sanguins (Hashimoto et al., 2013). Cependant suite à un stress génotoxique lors d'une irradiation létale, les monocytes recrutés au niveau du poumon prennent l'avantage et se différencient en MA afin de repeupler la niche. Les MA radiorésistants peuvent néanmoins toujours proliférer pour régénérer la population cellulaire si les monocytes recrutés ne perçoivent pas le GM-CSF, comme c'est le cas dans des souris *Csf2rb*<sup>-/-</sup> déficientes pour le récepteur au GM-CSF (**figure 10**) (Epelman et al., 2014a). Comme beaucoup de macrophages tissulaires les MA se maintiennent donc, chez l'adulte, sans contribution monocyttaire, sauf lors d'une déplétion aiguë et profonde (**figure 10**).



**Figure 10. Représentation schématique de la stratégie de repopulation des macrophages alvéolaires.** A l'état basal, la majorité des MA dérivent d'un progéniteur embryonnaire et sont instruit par le GM-CSF pour se différencier en MA fonctionnels. Après déplétion, la repopulation a lieu uniquement par prolifération des macrophages pulmonaires résidents. Cependant lors d'une déplétion par un stress génotoxique (irradiation létale), les monocytes recrutés prennent l'avantage et remplacent les macrophages résidents dérivés de précurseurs embryonnaires. Si les monocytes recrutés ne perçoivent pas le GM-CSF, alors les MA sont capables, malgré le stress génotoxique, de repeupler la niche de MA. (D'après Epelman et al., 2014a).



Ces cellules sont comme leur nom l'indique présentes dans la lumière des alvéoles où elles assurent un rôle de surveillance immune afin de détecter d'éventuels pathogènes inhalés et un rôle de régulation homéostatique de la fonction pulmonaire par le catabolisme du surfactant.

Certaines études ont montré que les MA posséderaient une fonction de régulation des réponses immunes. En effet, des études *in vitro* ont montré que les cellules récupérées à partir de lavages pulmonaires, c'est-à-dire constituées principalement de MA, peuvent supprimer la prolifération des lymphocytes T (Blumenthal et al., 2001; Lipscomb et al., 1993; Strickland et al., 1996; Upham et al., 1995). L'injection intratrachéale de liposomes de clodronate qui induit l'élimination des phagocytes présents dans les alvéoles (i.e. les MA) favorise également la présentation antigénique des CD (Holt et al., 1993) et l'augmentation de la réponse humorale suite à l'inhalation d'antigènes chez des souris sensibilisées (Thepen et al., 1992). Cependant, l'apoptose des macrophages induite par le clodronate doit générer de nombreuses particules, probablement perçues comme des DAMPs, et donc induire une réponse immune. Plus récemment, deux études ont montré que les MA peuvent induire le développement de Treg à partir de lymphocytes T naïfs (Coleman et al., 2013; Soroosh et al., 2013).

#### 3.3.4.4.2 *Macrophages interstitiels*

Les MI constituent une petite population de macrophages régulateurs présents dans l'interstitium pulmonaire.

Des études ont montré que différentes populations de macrophages présentes au sein d'un même tissu pouvaient provenir de sources différentes (Epelman et al., 2014b). Cependant, malgré les nombreuses études concernant l'ontogénie des macrophages, celle des MI reste encore peu décrite et les résultats obtenus par deux études différentes rapportent des observations contradictoires. Une étude a en effet montré que les MI partageraient la même origine que les MA (i.e. ne se renouvellent pas à partir de monocytes sanguins) comme en attestent leurs expérience de parabiose où les MI ne montrent aucun enrichissement en cellules du partenaire (Jakubzick et al., 2013). Par ailleurs, une autre étude a rapporté que différentes vagues de progéniteurs embryonnaires peupleraient l'interstitium pulmonaire durant l'embryogenèse et les premières semaines suivant la naissance mais qu'à l'âge adulte, les MI se maintiendraient à partir de progéniteurs circulants (Tan and Krasnow, 2016).

Les MI, qui ont également été décrits chez l'homme (Hoppstädter et al., 2010), produisent spontanément de l'IL-10 (Bedoret et al., 2009), via l'activation de la voie de signalisation TLR4/Myd88 (Kawano et al., 2016). De plus lors d'une exposition à de faibles doses de LPS, les MI, qui sont localisés à proximité des CD, bloquent la maturation et la migration des CD, inhibant ainsi la capacité des CD activées par le LPS à induire une réponse allergique Th2 à l'encontre d'antigènes inoffensifs (Bedoret et al., 2009). Ainsi des souris dépourvues de MI fonctionnels développent des réactions asthmatiques lorsqu'elles sont exposées à de faibles doses d'un mélange d'allergène et de

LPS (Bedoret et al., 2009). Les effets immunosuppresseurs des MI sont cependant dépassés lorsque les voies aériennes sont exposées à de hauts niveaux d'allergènes et de LPS car toutes les souris WT développent de l'asthme suite à des expositions à de fortes doses d'extraits d'acariens (House dust mites, HDM), un phénomène qui requiert l'activation du TLR4 (Hammad et al., 2009). Les MI régulent également la réponse inflammatoire médiée par les lymphocytes Th17 car le transfert de ces cellules à des souris *Il10*<sup>-/-</sup> diminue l'inflammation neutrophilique observée chez ces souris après exposition au HDM (Kawano et al., 2016).

Une étude a très récemment indiqué que les MI pourraient être subdivisés en 3 populations sur base de leur expression différentielle de CD11c et MHCII (Gibbings et al., 2017).

---

# Objectifs

---

## Objectifs

Malgré l'inhalation constante d'allergènes (« non soi ») et de composés bactériens (signaux de danger), seuls certains individus développent une allergie respiratoire. D'une manière paradoxale, une exposition à des composés microbiens est même connue pour protéger du développement de l'allergie pulmonaire, ce qui implique l'existence de mécanismes suppresseurs déclenchés par ces stimuli. Bien que quelques mécanismes prévenant le développement de réponses immunes aberrantes aient déjà été décrits, ceux-ci restent très peu connus et caractérisés en comparaison aux mécanismes qui favorisent le développement des réponses immunitaires. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait cependant aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques à l'encontre de l'allergie des voies respiratoires.

Les MI, macrophages régulateurs pulmonaires, sont capables de prévenir le développement de réponses immunes à l'encontre d'allergènes inoffensifs inhalés concomitamment au LPS. Cependant, ces macrophages ont été très peu caractérisés et étudiés en dehors de l'homéostasie pulmonaire.

Dans ce travail, nous avons étudié la plasticité phénotypique et fonctionnelle des MI en réponse à différents stimuli microbiens. Nous avons évalué l'impact d'une exposition à différents PAMPs et agents pathogènes sur les MI au niveau quantitatif et qualitatif ainsi que les répercussions de ces modifications sur leur fonction et leur ontogénie.

Les résultats générés dans cette étude et présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une publication dans *Immunity* (Sabatel et al., 2017), laquelle est insérée dans les annexes de ce manuscrit (page 125).

---

# Section expérimentale

---

---

Section expérimentale

Matériel et méthodes

---

## Section expérimentale - Matériel et méthodes

### 1 Animaux expérimentaux

Les souris WT CD45.2<sup>+</sup>, WT CD45.1<sup>+</sup>, *Agtr1a*<sup>-/-</sup>, *Ccr2*<sup>-/-</sup>, *Cx3cr1*<sup>gfp/+</sup>, *Il-10*<sup>-/-</sup>, *Myd88*<sup>-/-</sup> et *Nr4a1*<sup>-/-</sup>, toutes de fond génétique C57BL/6, ont été obtenues chez Jackson Laboratory. Les souris CD45.1/2<sup>+</sup> WT C57BL/6 ont été obtenues en croisant des souris CD45.1<sup>+</sup> avec des souris CD45.2<sup>+</sup>. Les souris *Tlr9*<sup>-/-</sup> (Hemmi et al., 2000) et ITIB (IL-10-β-lactamase rapportrices) (Bouabe et al., 2011) ont été générées dans d'autres laboratoires. Toutes les souris, à l'exception des souris parabiontes qui ont été générées au Singapore Immunology Network (SIgN, Singapour), ont été hébergées dans un environnement exempt de pathogènes au sein de l'animalerie centrale de l'Université de Liège et sauf mention contraire, des souris de 6 à 10 semaines ont été utilisées pour les expérimentations. Toutes les expériences réalisées ont été approuvées par le Comité d'Ethique de l'Université de Liège, à l'exception des expériences impliquant les souris parabiontes qui ont reçu l'approbation du comité d'éthique local du SIgN.

### 2 Réactifs et anticorps

Les liposomes de clodronate et les liposomes contrôles contenant du *Phosphate Buffer Saline* (PBS) ont été fournis par la Fondation Clodronate Liposomes. Les CpG (classe B ; 5'-tccatgacgttctctgatgct-3'; Ref. HC4033) et les oligodésoxynucléotides ne contenant pas de motifs CpG non méthylé (ODN, 5'-gcttgatgactcagccgaa-3'; Ref. HC4034) ont été achetés chez Sanbio. Le LPS de *E. coli* (O55:B5) a été obtenu chez Sigma. Le Pam3CSK4, Poly(I:C), FLA-BS et R848 ont été achetés chez InvivoGen et le MALP-2 chez Enzo Life Sciences. Les extraits d'acariens (*House dust mites*, HDM de *Dermatophagoides farinae*) ont été fournis par Greer Laboratories. L'ovalbumine (OVA grade III et grade V) a été achetée chez Sigma et le HDM fluorescent a été produit au laboratoire en utilisant le kit Alexa fluor 647 Protein Labelling kit (Molecular Probes).

Les anticorps utilisés pour la cytométrie en flux sont listés ci-dessous. Les isotype contrôles correspondant aux anticorps ont été achetés dans la même firme. La streptavidine couplée au PE a été obtenue chez BD Pharmingen.

Cible	Fluorochrome	Clone	Firme
B220	PE	RA3-6B2	BD Pharmingen
CCR2	PE	475301	R&D systems
CD45.1	APC	A20	eBioscience
CD45.2	APC/FITC/PerCP-Cy5.5/V500	104	BD Pharmingen
CD11b	FITC	M1/70	eBioscience
CD11b	PE-Cy7	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	APC/APC-Cy7	HL3	BD Pharmingen
CD115	PE	AFS98	eBioscience
CD169	Efluor660	SER-4	eBioscience
CD19	PerCPCy5.5	1D3	eBioscience
CD49b	PerCP-Cy5.5/BV421	DX5	BD Pharmingen
CD3	Efluor 450	17A2	eBioscience
CD62L	PerCP-Cy5.5	MEL-14	eBioscience
CD64	BV421	X54-5:7.1	Biolegend
CD64	PE	X54-5:7.1	BD Pharmingen
CD86	Biotine	GL-1	eBioscience
CD90.2	efluor 660/ PerCP-efluor710	30H12	eBioscience
F4/80	PE	BM8	eBioscience
Ly-6C	FITC	AL-21	BD Pharmingen
Ly-6G	PE/PE-Cy7	1A8	BD Pharmingen
Mertk	APC	108928	R&D systems
MHC-II	APC	AF6-120.1	BD Pharmingen
MHC-II	PerCP-Cy5.5	M5/M4.15.2	Biolegend
NK1.1	PE	PK136	BD Pharmingen
SiglecF	PE	E50-2440	BD Pharmingen

### 3 Techniques relatives à la cytométrie en flux

#### 3.1 Obtention des différents types cellulaires

Afin d'isoler les cellules pulmonaires, le ventricule droit du cœur a été rincé avec 10 mL de PBS (Lonza) afin d'éliminer le sang présent dans les vaisseaux sanguins pulmonaires. Les poumons entiers ont ensuite été récupérés, coupés en petits morceaux et digérés pendant une heure à 37°C dans du milieu de digestion *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Lonza) contenant 5% de sérum fœtal



bovin (FBS, GIBCO BRL), 1 mg/mL de collagénase A (Roche) et 0.05 mg/mL de DNaseI (Roche). La suspension cellulaire a ensuite été enrichie en cellules mononuclées grâce à un gradient de Percoll (GE Healthcare). Afin d'isoler les cellules spléniques, la rate a été écrasée et les globules rouges ont été lysés avec un tampon (RBC lysis buffer, eBioscience). Le sang a été récupéré, mélangé à de l'EDTA (100 mM) et les globules rouges ont été lysés (RBC lysis buffer, eBioscience). Afin d'obtenir des cellules du cœur et du foie, les organes ont été coupés en petits morceaux et digérés pendant une heure à 37°C dans du milieu de digestion *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS, Lonza) contenant 5% de FBS (GIBCO BRL), 1 mg/mL de collagénase A (Roche) et 0.05 mg/mL de DNaseI (Roche). Dans les expériences visant à isoler les monocytes classiques Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup>, les monocytes patrouilleurs Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup>, les MI, les MI<sub>CpG</sub>, ou les monocytes spléniques, les cellules pulmonaires et les cellules spléniques ont été enrichies en cellules CD11b<sup>+</sup> par MACS (*Magnetism-Activated Cell Sorting*) grâce à des billes magnétiques anti-CD11b (Miltenyi Biotec).

## 3.2 Marquage FACS

Le marquage a été réalisé à 4°C à raison de 1 million de cellules dans 100 µL de milieu FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) (PBS + 0.1% d'azide de sodium (Sigma) + 0.1% de *bovine serum albumin* (BSA, Sigma) contenant 20% de surnageant de cellules sécrétant l'anticorps 24G2 (produit dans le laboratoire) afin de réduire la liaison aspécifique à la fraction Fc des anticorps.

## 3.3 Phénotypage et tri cellulaire

Le phénotypage et le tri cellulaire ont été réalisés sur un FACSCANTO II et un FACSARIA III (BD Biosciences), respectivement. Les doublets ont été exclus sur base du FSC-W et FSC-A et la viabilité des cellules a été vérifiée avec du 7-AAD (ViaProbe, BD Biosciences). Les résultats ont été analysés avec le programme FlowJo (Tree Star).

## 3.4 Identification des cellules isolées

Les différentes populations cellulaires triées par FACS ont été identifiées après étalement sur lame par centrifugation dans un *Shandon Cytospin 4* (Thermo Electron Corporation) et coloration au Diff Quick (Dade Behring Inc) selon les recommandations de la firme. Les lames ont été examinées avec un microscope FSX100 (Olympus).

## 3.5 Quantification du nombre de monocytes/macrophages

Les nombres de cellules pulmonaires ont été comptés après la digestion complète des poumons et l'enrichissement en cellules mononuclées à l'aide d'une cellule de Thoma, en duplicata. Le nombre

de MA, MI<sub>SS</sub>, MI<sub>CpG</sub>, MI<sub>LPS</sub>, monocytes classiques et monocytes patrouilleurs a été déterminé sur base de la stratégie de gating montrée à la **figure 11A**.

Les nombres de cellules totales de la rate, du cœur, du foie ont été comptés après la dissociation tissulaire avec une cellule de Thoma, en duplicata. Les nombres de monocytes et de macrophages dans ces organes ont été déterminés sur base de la stratégie de gating de Swirski et ses collaborateurs (Swirski et al., 2009) ou de la stratégie montrée à la **figure 11A** respectivement.

## 4 Evaluation de la production d'IL-10

### 4.1 Souris ITIB IL-10- $\beta$ -lactamase rapportrices

Ces souris qui expriment le gène de l'enzyme  $\beta$ -lactamase sous le contrôle du promoteur de l'IL-10, permettent de détecter l'expression d'IL-10 au niveau cellulaire en présence du substrat de l'enzyme, le CCF4-AM (coumarin-cephalosporin-fluorescein (4)-acetoxyethyl). Pour évaluer l'expression d'IL-10 en utilisant les souris ITIB, les cellules pulmonaires de souris ITIB et de souris WT contrôle ont été resuspendues dans une solution contenant du CCF4-AM (Invitrogen) supplémentée de probenecid (un inhibiteur de transporteurs d'anions; Invitrogen), préparée selon les recommandations de la firme, et incubées 90 min à 29°C. Le CCF4-AM est un dérivé d'ester lipophile qui consiste en un cœur de céphalosporine liant une 7-hydroxycoumarine à une fluorescéine. Une fois à l'intérieur de la cellule, les groupes esters sont hydrolysés par des estérases cytoplasmiques, libérant la forme négativement chargée du CCF4 qui est alors emprisonné dans le cytoplasme. L'excitation du CCF4-AM intact induit un transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) de la coumarine à la fluorescéine qui émet une lumière verte. Ce phénomène de FRET ne sera plus observé suite au clivage du noyau  $\beta$ -lactam du CCF4-AM par la  $\beta$ -lactamase qui sépare les deux fluorophores. On observe alors une fluorescence bleue suite à l'excitation du substrat. Après incubation avec le substrat, le marquage membranaire est réalisé et le marquage est analysé par cytométrie en flux. Des cellules WT incubées avec le CCF4-AM sont utilisées comme contrôle négatif.

### 4.2 *Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)*

Pour la production d'IL-10 *ex-vivo*, les monocytes classiques, monocytes patrouilleurs, MA et MI ont été isolés de souris WT naïves par FACS et  $2 \times 10^5$  cellules ont été cultivées dans 200  $\mu$ l de milieu RPMI (Lonza) supplémenté avec 10% de FBS, 0.1 mM d'acides aminés essentiels (GIBCO BRL), 1 mM de pyruvate de sodium (GIBCO BRL), 50 UI/mL de pénicilline G et 50  $\mu$ g/mL de streptomycine sulfate (GIBCO BRL) et 0.5 mM de  $\beta$ -mercapto-éthanol (GIBCO BRL) dans une plaque 96 puits à fonds ronds pendant 16h. Dans certaines expériences, les MI isolés de souris WT, *Tlr9*<sup>-/-</sup> ou *Myd88*<sup>-/-</sup> ont été cultivés et stimulés pendant 16h avec du LPS (10 ng/ml) ou des CpG (7

µg/ml). La concentration en IL-10 a été mesurée dans les surnageants de culture par ELISA (eBioscience).

## 5 Techniques relatives à l'identification des monocytes tissulaires

### 5.1 Déplétion des monocytes/macrophages vasculaires

Des souris WT ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> ont reçu par voie intraveineuse (i.v.) 200 µL de liposomes contenant du clodronate (Clo-Lips) ou de liposomes contenant du PBS (PBS-Lips). Les poumons ont été récupérés 24h plus tard.

### 5.2 Immunohistochimie

Les poumons ont été fixés dans une solution de formaldéhyde 4% puis enchâssés dans de la paraffine. Des coupes transversales de 5 µm ont été obtenues à l'aide d'un microtome (Microm HM355S, Thermo Scientific). Les sections ont été déparaffinées et hydratées et les peroxydases endogènes ont été bloquées à l'aide de peroxyde d'hydrogène 3% (Merck). Les lames ont ensuite été immergées dans une solution bloquante (Protein block, Dako) pendant 10 minutes à température ambiante. Le marquage primaire a été réalisé par une incubation de 2 heures à température ambiante en présence d'un anticorps de rat anti-Ly-6C (1/50, clone ER-MP20, Abcam). Les tissus ont ensuite été incubés en présence d'un anticorps de lapin anti-rat couplé à la peroxydase de raifort (HRP ; 1/400, Abcam) pendant 40 minutes à température ambiante. L'activité peroxydase a été révélée à l'aide du kit 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride (Dako) et les tissus ont ensuite été contre-colorés dans une solution d'hématoxyline de Carazzi.

### 5.3 Marquage *in vivo* des leucocytes vasculaires

Des souris WT ont reçu 0.5 µg d'anticorps anti-CD45.2 par voie intraveineuse. L'euthanasie a été réalisée 3 minutes plus tard afin de permettre à l'anticorps de circuler dans les vaisseaux sanguins. Les poumons ont ensuite été récupérés sans être perfusés et les populations de monocytes/macrophages ont été analysées par cytométrie en flux.

## 6 Exposition à des ligands de TLRs et à des pathogènes

### 6.1 Exposition des voies aériennes à des ligands de TLRs

Des souris anesthésiées à l'isoflurane ont été instillées par voie intranasale (i.n.) avec 50  $\mu$ l d'une solution saline contenant différents ligands de TLRs : Pam3CSK4 25  $\mu$ g; Poly(I:C) 50  $\mu$ g; LPS 10  $\mu$ g; FLA-BS 1  $\mu$ g; MALP-2 1  $\mu$ g; R848 100  $\mu$ g; CpG 50  $\mu$ g. Les doses de ligands de TLRs utilisées ont été choisies sur base de la littérature (i.e. Pam3CSK4 (Andrade et al., 2013; Chen et al., 2016); Poly(I:C) (Errea et al., 2015; LeMessurier et al., 2013); LPS (Chen et al., 2014; Hiroshima et al., 2014); FLA-BS (Errea et al., 2015; Muñoz et al., 2010); MALP-2 (Repe et al., 2015); R848 (Marino et al., 2011; Van et al., 2011); CpG (Hickey et al., 2013; Vogel and Brown, 2015). Dans certaines expériences les concentrations de ligands de TLRs utilisées correspondent à 5 nmoles pour chaque ligand.

### 6.2 Exposition des voies aériennes à des pathogènes

Des souris anesthésiées à l'isoflurane ont reçu par voie i.n. 50  $\mu$ l de solution saline contenant 5 PFU (plaque-forming unit) de virus influenza A (souche A/PR/8/34 fournie par le Dr Trottein de l'Institut Pasteur de Lille) ou 10<sup>5</sup> CFU (colony-forming unit) de *Streptococcus pneumoniae* (serotype 1, isolat clinique E1586 fournit par le Dr Sirard de l'Institut Pasteur de Lille).

### 6.3 Traitement aux CpG

#### 6.3.1 Administration in vivo

Des souris anesthésiées à l'isoflurane ont reçu par voie i.n. 50  $\mu$ l d'une solution saline contenant 50  $\mu$ g de CpG ou 50  $\mu$ g d'ODN. Dans certaines expériences les souris ont été injectées par voie sous-cutanée (s.c.) ou intrapéritonéale (i.p.) avec 100  $\mu$ l (s.c.) ou 200  $\mu$ l (i.p.) d'une solution saline contenant 50  $\mu$ g de CpG ou 50  $\mu$ g d'ODN. Les souris ont été analysées 7 jours plus tard.

#### 6.3.2 Stimulation ex vivo des monocytes tissulaires aux CpG

Les monocytes spléniques et pulmonaires ont été triés par FACS sur base des stratégies de gating décrites à la **figure 11A** et par Swirski et ses collaborateurs (Swirski et al., 2009) respectivement. Deux cent mille cellules ont été cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de FBS, 0.1 mM d'acides aminés essentiels, 1 mM de pyruvate de sodium, 50 UI/mL de pénicilline G et 50  $\mu$ g/mL de streptomycine sulfate et 0.5 mM de  $\beta$ -mercapto-éthanol avec ou sans CpG (7  $\mu$ g/ml) dans une plaque 24 puits. Dans certaines expériences, du LPS (10 ng/ml) a été ajouté

dans le milieu à la place des CpG. Vingt-quatre, 36, 48 et 54 heures plus tard, les cellules ont été récupérées et phénotypées. Du 7-AAD a été utilisé pour discriminer les cellules vivantes des cellules mortes.

## 7 Modèles d'asthme

### 7.1 Modèles aux extraits d'acariens (HDM)

#### 7.1.1 Modèles de sensibilisation

Des souris WT, ITIB ou *Tlr9*<sup>-/-</sup>, anesthésiées par inhalation d'isoflurane, ont été sensibilisées par 2 administrations i.n. d'une solution saline (PBS, souris contrôles) ou d'extraits d'acariens (HDM, 100 µg) à 7 jours d'intervalle (jour 0 (J0) et jour 7 (J7)). Dans certaines expériences les souris ont été sensibilisées avec du HDM à J0 et avec du HDM marqué à l'AlexFluor647 à J7.

Afin d'évaluer les effets des CpG dans la protection du développement de l'asthme, des souris ont été instillées par voie i.n. avec une solution saline contenant 50 µg d'ODN ou de CpG, 7 jours avant la première injection de HDM. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale 3 jours après la 2<sup>e</sup> injection de HDM (jour 10). Dans les modèles de transfert adoptif, des souris WT ont reçu par voie intratrachéale (i.t.) 1.5 million de MA ou MI<sub>CpG</sub> isolés de souris WT ou *Il-10*<sup>-/-</sup> traitées aux CpG 7 jours au préalable ou une solution saline, 24h avant chaque traitement au HDM (jours -1 et 6).

#### 7.1.2 Modèles de challenge allergénique

Des souris WT, ITIB ou *Tlr9*<sup>-/-</sup>, anesthésiées par inhalation d'isoflurane, ont été sensibilisées par 2 administrations i.n. de PBS (souris contrôles) ou de HDM (100 µg) à 7 jours d'intervalle (jour 0 (J0) et jour 7 (J7)). Afin d'évaluer les effets curatifs des CpG sur de l'asthme établi, les souris ont reçu par voie i.n. une solution saline contenant 50 µg d'ODN ou de CpG, 7 jours après la 2<sup>e</sup> injection de HDM (jour 14). Sept jours plus tard (jour 21), les souris ont été challengées par une instillation i.n. d'une solution saline (PBS, souris contrôles) ou de HDM (100 µg). Dans certaines expériences, les souris ont été challengées avec du HDM marqué à l'AlexFluor647 au jour 21. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale au jour 24. Dans les modèles de transfert adoptif, des souris WT ont reçu par voie i.t. 1.5 million de MA ou MI<sub>CpG</sub> isolés de souris WT ou *Il-10*<sup>-/-</sup> traitées aux CpG 7 jours au préalable ou une solution saline, 24h avant le dernier challenge au HDM (jour 20).

Dans les expériences évaluant les effets long-terme des CpG sur un asthme établi, les souris ont été challengées au HDM (100µg) 8 semaines après l'instillation i.n. de CpG et ont été sacrifiées 3 jours plus tard.

## 7.2 Modèle à l'ovalbumine (OVA)

Des souris WT ont été sensibilisées aux jours 0 et 14 par une injection i.p. de 100  $\mu$ l d'une solution saline contenant 10  $\mu$ g d'OVA (grade V, Sigma) mixée avec 100  $\mu$ l d'alun (Imject Alum, Pierce). Les souris contrôles ont reçu 100  $\mu$ l de solution saline mixée avec 100  $\mu$ l d'alun. Deux semaines plus tard, les souris ont été challengées par une exposition à un aérosol d'OVA 1% (grade III, Sigma) 1h par jour pendant 4 jours (jour 28 à 31). Afin d'évaluer les effets curatifs des CpG sur un asthme établi, les souris ont reçu par voie i.n. une solution saline contenant 50  $\mu$ g d'ODN ou de CpG, 7 jours avant le premier aérosol (jour 21). Les souris ont été sacrifiées 24h après le dernier challenge (jour 32). Dans les expériences de transfert adoptif, des souris WT ont reçu par voie i.t. 1.5 million de MA ou MI<sub>CpG</sub> isolés de souris WT traitées aux CpG 7 jours au préalable ou une solution saline, 24h avant le challenge à l'OVA (jour 27).

## 7.3 Evaluation de la réponse allergique

### 7.3.1 Mesure de l'hyperréactivité bronchique

L'hyperréactivité bronchique (HRB) a été mesurée à l'aide d'un FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ). Les souris anesthésiées par injection i.p. d'une solution saline (PBS) contenant 6.6 % de Kétamine 1000 (100 mg/mL, Ceva Santé animale) et 3.3% de Rompun 2% (Bayer Health Care) ont été cathétérisées et placées sous ventilation imposée avant d'être soumises à des doses croissantes de méthacholine (allant de 6 à 48 g/l, Sigma) nébulisée via le cathéter. Les mesures de résistance pulmonaire ont été enregistrées après chaque nébulisation.

### 7.3.2 Lavage bronchoalvéolaire et cytologie

Après la mesure de l'HRB, les souris ont été euthanasiées et un lavage bronchoalvéolaire (LBA) a été réalisé à l'aide d'un cathéter à ailettes 24G (BD Infusion Therapy Systems) placé dans la trachée. Deux mL de PBS ont été infusés dans la trachée et récupérés sur glace. Le comptage de cellules totales a été réalisé à l'aide d'une cellule de Thoma, en duplicata et afin d'effectuer le comptage différentiel, 150  $\mu$ L ont été étalés sur lame par centrifugation dans un *Shandon Cytospin 4* (Thermo Electron Corporation). Les lames ont ensuite été colorées au Diff Quick (Dade Behring Inc) selon les recommandations de la firme et 200 cellules ont été identifiées au microscope selon leurs caractéristiques morphologiques (macrophages, éosinophiles, lymphocytes, neutrophiles).

### 7.3.3 Histologie pulmonaire

Les lobes pulmonaires gauches sont récupérés dans une solution de formaldéhyde 4%. Les coupes histologiques ont été réalisées à la plateforme d'immunohistologie du GIGA (Université de

Liège). Elles ont été colorées à l'hématoxyline-éosine (H&E) et au *Periodic Acid Schiff* (PAS). La production de mucus a été quantifiée comme le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales dans des bronches sélectionnées au hasard. Sept sections bronchiques ont été analysées par poumon murin.

### ***7.3.4 Production de cytokines par les cellules ganglionnaires***

Les ganglions bronchiques sont prélevés, poolés par groupe de deux dans 2 mL de PBS, écrasés à l'aide d'un piston de seringue plat puis filtrés (pores de 70  $\mu$ M) afin de récupérer les cellules ganglionnaires. Ces cellules ont été cultivées ( $2 \times 10^5$  cellules par puits dans des plaques de culture à 96 puits) dans du milieu Click's (*Click's medium EHAA*) supplémenté avec 0.5% de sérum de souris black6 (Harlan Laboratories Inc.), 8 mM de L-glutamine (GIBCO BRL), 0.1 mM d'acides aminés non essentiels, du pyruvate de sodium 1 mM, 50 UI/mL de pénicilline G et 50  $\mu$ g/mL de streptomycine sulfate et 10  $\mu$ g/mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les cellules ont été restimulées *in vitro* avec du HDM (30  $\mu$ g/ml) ou de l'OVA (grade V, 50 $\mu$ g/ml). Les surnageants ont été récupérés après 3 jours de culture et des ELISA ont été réalisés à l'aide de kits commerciaux afin de mettre en évidence l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (eBioscience).

### ***7.3.5 Maturation et migration des CD8***

Afin d'évaluer la maturation et la migration des CD8, les souris ont reçu par voie i.n. une solution saline (souris contrôles) ou 100  $\mu$ g de HDM marqué à l'Alea fluor-647. Les souris ont été sacrifiées 24h plus tard. Les ganglions bronchiques ont été récupérés et écrasés et le nombre de cellules totales a été compté à l'aide d'une cellule de Thoma, en duplicata. Le nombre de CD8 présentant l'antigène (i.e. cellules  $\text{HDM}^+ \text{CD11c}^{\text{hi}} \text{MHC-II}^{\text{hi}}$ ) a été déterminé par cytométrie en flux. La maturation des CD8 pulmonaires a été déterminée par quantification de l'expression des marqueurs de maturation CD86 et MHCII sur les CD8 pulmonaires totales (i.e. cellules non-autofluorescentes  $\text{CD11c}^{\text{hi}} \text{MHC-II}^{\text{int/hi}}$ ) par cytométrie en flux.

### ***7.3.6 Quantification des IgE***

Le sang récolté a été centrifugé 10 minutes à 10.000 RPM dans une centrifugeuse Sigma (Fischer bioblock scientific). Le sérum a ensuite été prélevé et congelé à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au dosage des IgE. Pour cela, des plaques 96 puits (NUNC) ont été incubées une nuit à  $4^\circ\text{C}$  avec un anticorps anti-IgE (2  $\mu$ g/ml, clone R35-72, BD Biosciences). La plaque a ensuite été saturée afin de réduire la liaison aspécifique avec du PBS/BSA 1% (Sigma) avant de l'incuber avec les sérums pendant 2h à  $37^\circ\text{C}$ . La plaque a ensuite été incubée pendant 3h à température ambiante avec de l'OVA-biotinylé (Sigma) avant d'ajouter une streptavidine-peroxydase (Zymed). La plaque a alors été incubée avec du TMB (Interchim) et après ajout d'une solution d'acide sulfurique, l'absorbance à 450 nm est mesurée avec

un lecteur de plaques (Thermo LabSystems Inc.). Un lavage avec du PBS/Tween 0.1 % est réalisé entre chaque étape.

## 8 Greffe de moelle compétitive et parabiose

Des souris WT CD45.1/2<sup>+</sup> de 12 semaines ont été léthalement irradiées avec 2 doses de 6 Gy à 3h d'intervalle. Deux heures après la deuxième irradiation, les souris ont reçu par voie intraveineuse 2 millions de cellules de moelle comprenant des quantités équivalentes de cellules de moelle de souris CD45.1<sup>+</sup> et de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup>. Les souris ont été traitées aux antibiotiques (0.05 mg/ml dans l'eau de boisson, Baytril, Bayer) depuis la veille de l'irradiation jusqu'au sacrifice. Les nombres cellulaires ont été évalués 7, 14, 56 et 84 jours plus tard et le chimérisme a été évalué 56 et 84 jours après irradiation. Dans certaines expériences, ces souris chimères ont été instillées avec des CpG ou du LPS 7 jours avant l'analyse ou avec du clodronate 24h avant analyse.

Les souris parabiontes ont été générées en suturant les peaux du flanc de souris WT CD45.1<sup>+</sup> et *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> de même âge (6 semaines) et de même poids. Les souris ont été analysées 6 mois après la chirurgie.

## 9 Evaluation de la prolifération cellulaire

Un, 2 ou 3 jours après administration i.n. de CpG, des souris WT ou *Ccr2*<sup>-/-</sup> ont été injectées par voie i.p. avec de l'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, 1 mg dans 400 µl; Jena Bioscience). Les souris ont été sacrifiées 24h plus tard et l'incorporation d'EdU a été évaluée par cytométrie en flux.

## 10 Western blot

Cinq cent milles monocytes pulmonaires de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> ont été triés par FACS et cultivés dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de FBS, 0.1 mM d'acides aminés essentiels, 1 mM de pyruvate de sodium, 50 UI/mL de pénicilline G et 50 µg/mL de streptomycine sulfate et 0.5 mM de β-mercapto-éthanol dans des plaques 12 puits. Les cellules ont été traitées avec ou sans ODN ou CpG (7µg/ml) pendant 30 minutes. Les cellules ont ensuite été récupérées, centrifugées et les culots ont été lysés dans du tampon de lyse RIPA (radioimmunoprecipitation assay) contenant 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF et des inhibiteurs de protéases (complete protease inhibitor, Roche Diagnostics). Les extraits protéiques ont été ajoutés à du tampon Laemmli, bouillis et soumis à une électrophorèse sur un gel polyacrylamide-SDS 10%. Le transfert a été réalisé sur une membrane polyvinylidène difluoride pour western-blot. Afin d'éliminer le marquage aspécifique, les membranes ont été bloquées dans un



tampon Tris 20 mM, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,2% Tween 20 (TBS-Tween) et 5% de lait pendant 1h. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps de lapin anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) ou anti- $\beta$ -actine (1/1000 ; clone D6A8) (Cell Signaling Technology) overnight à 4°C puis rincées avec du TBS-Tween et incubées avec un anticorps de chèvre anti-lapin IgG conjugué à la HRP (1/5000 ; Kirkegaard & Perry Laboratories) pendant 60 min à température ambiante. Les résultats ont été visualisés à l'aide d'un kit ECL (Amersham) et d'une autoradiographie avec des films photographiques Fuji.

## 11 Etude transcriptomique

### 11.1 Obtention d'ARNm

Des cellules Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> de souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup>, des MA, MI<sub>SS</sub> et MI<sub>CpG</sub> de souris WT ont été triés par FACS directement dans du Trizol® (Life Technologies). L'ARN total a été purifié à l'aide du kit Direct-zol® (Zymo Research) suivant les recommandations de la firme. Pour chaque type cellulaire, l'ARN a été élué dans un volume total de 175  $\mu$ l d'eau. L'ADN a été éliminé à l'aide du kit RNase-Free DNase Set (Qiagen) et les ARN ont ensuite été purifiés sur des colonnes RNeasy® Micro (Qiagen) avec une élution finale dans 50  $\mu$ l d'eau. La quantité et qualité des ARN obtenus ont été vérifiées par analyse sur un *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) à l'aide du kit commercial *Agilent RNA 6000 Pico Kit* selon les instructions du fabricant. Pour tous les échantillons, les concentrations obtenues étaient d'environ 1ng/ $\mu$ l et leur paramètre de qualité, *RNA Integrity Number*, était supérieur à 8.

### 11.2 Microarray

Pour chaque échantillon, des fragments d'ADN simple brin biotinylé ont été obtenus à partir de 1.5 ng d'ARN à l'aide du kit commercial *GeneChip® WT Pico Reagent* (Affymetrix) selon les recommandations du fournisseur. Les cibles fragmentées et marquées ont été hybridées aux puces Affymetrix « mouse gene 1.0 ST array » selon les protocoles standards d'Affymetrix.

### 11.3 Analyses bioinformatiques

Les microarrays ont été analysés en utilisant R (version 3.3.1) et *Bioconductor*. Les données ont été normalisées suivant la méthode *Robust Multichip Average* (RMA) du progiciel Oligo puis annotées à l'aide du progiciel *mogene10sttranscriptcluster.db*.

L'analyse de l'expression différentielle entre les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> et les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> de souris WT a été réalisée en utilisant le progiciel *Limma* (Linear Models for

Microarray Data) avec une *P value* ajustée  $< 0.05$  et un Fold Change  $> 2$  ou  $< 0.5$  après avoir éliminé les sondes non annotées. L'analyse de l'expression différentielle entre les MI<sub>SS</sub> et les MI<sub>CpG</sub> a été réalisée de façon identique, à l'exception du seuil de la *P value* ajustée fixé à 0.05.

Le graph volcano montrant les différences entre les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> et les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> de souris WT a été obtenu en traçant le log<sub>2</sub> (Fold change (FC)) sur l'axe des x et  $-\log_{10}$  (*P value* ajustée) sur l'axe des y pour toutes les sondes y compris les non-annotées. Les heatmaps ont été générées avec les valeurs d'expression normalisées en utilisant la fonction *heatmap.2* du progiciel *gplots*. Une analyse PCA (*Principal Component Analysis*) a été réalisée en utilisant la fonction *prcomp* sur les valeurs d'expression normalisées des MA, MI<sub>SS</sub> et MI<sub>CpG</sub>. Les valeurs ont ensuite été portées en graphique tridimensionnel en utilisant la fonction *plot3d* du progiciel *rgl*. Les pourcentages montrés sur chaque axe indiquent le pourcentage de variabilité, le PC1 étant la composante qui capture la plus grande variabilité entre les échantillons.

Afin d'identifier la signature biologique des MI<sub>CpG</sub> en comparaison aux MI<sub>SS</sub>, une analyse GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*, version 2.2.2) a été réalisée. Les données d'expression normalisées des MI<sub>SS</sub> et des MI<sub>CpG</sub> ont été utilisées pour classer les gènes des 2 types cellulaires avec la méthode « Diff\_of\_classes ». L'analyse d'enrichissement a ensuite été réalisée en utilisant des ensembles de gènes prédéfinis appelés « hallmark geneset » de la base de donnée MsigBD.

Les données du microarray ont été déposées sur la base de données publique Array Express avec le numéro d'accès E-MTAB-4084 (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-4084>).

## 12 RT-PCR en temps réel

Des cellules Ly-6C<sup>hi</sup> de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup>, des MA, MI<sub>SS</sub> et monocytes spléniques de souris WT ont été triés par FACS directement dans du Trizol® (Life Technologies). L'ARN total a été isolé en utilisant le kit Direct-zol® (Zymo Research) suivant les recommandations de la firme. L'ADN complémentaire a été obtenu avec le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Les RT-PCR en temps réel (qRT-PCR) ont été réalisées en duplica en utilisant Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific) et ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : (1) dénaturation initiale à 95°C pendant 15 min suivie par (2) 40 cycles de 15 sec à 60°C et 1 min à 60°C. Les séquences d'amorces suivantes ont été utilisées : 5'-AGCTGAACATGAACGGCATCT-3' et 5'-GATCGGCCAGCCATCTGA-3' pour *Tlr9*, 5'-AGCCCAGTGTTACCACCAAG-3' et 5'-ACCCAAGAACAAGCACAAGG-3' pour le gène constitutif *Ubc*, 5'-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3' et 5'-AATGTGAGGCGGGTGGAACTG-3' pour le gène constitutif *B2m*, 5'-AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG-3' et 5'-

AGAGGTCCTTTTCACCAGCA-3' pour le gène constitutif *Hprt*. Le niveau d'expression de TLR9 a été normalisé par rapport aux 3 gènes contrôles (*Ubc*, *B2m* and *Hprt*) en utilisant le logiciel qBase+ (Biogazelle).

## 13 Splénectomies

Des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> ont été anesthésiées par injection i.p. de ketamine (75 mg kg<sup>-1</sup>), xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>) et buprenorphine (0.05 mg kg<sup>-1</sup>). Une incision transversale a été réalisée sur le côté inférieur gauche des souris afin d'exposer la rate. La rate a été réséquée, les vaisseaux ont été cautérisés et l'incision a été suturée. Les souris contrôle ont subi la même procédure mais leur rate n'a pas été enlevée.

## 14 Chemokine array

Des souris WT anesthésiées légèrement à l'isoflurane ont été instillées par voie i.n. avec 50 µl de solution saline ou 50 µl de solution saline contenant des CpG (50 µg) ou du LPS (10 µg). Huit heures plus tard, les souris ont été sacrifiées et les poumons ont été récupérés sans être perfusés. Les poumons ont été homogénéisés avec un homogénéisateur UltraTurrax (IKA) dans 2 ml de solution saline contenant un inhibiteur de protéase (Roche Diagnostics). Les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à 16,000 g et la présence de diverses chémokines dans les surnageants a été évaluée à l'aide d'un chemokine antibody array (Abcam) selon les instructions de la firme. Les membranes ont été développées et digitalisées pour analyse avec ImageJ. La densité de chaque point a été mesurée et les moyennes obtenues pour chaque chémokine ont été normalisées aux points de référence de la membrane.

## 15 Inhibition des chémokines

Des souris ont été injectées par voie i.p. avec des anticorps neutralisants anti-CCL2 (200 µg), anti-CCL5 (50 µg ; clone 53405), anti-CCL9 (50 µg ; clone 62105) (R&D Systems) ou une combinaison des 3, 30 minutes avant l'administration i.n. de CpG. Des souris contrôles ont reçu les isotypes contrôles appropriés et provenant de la même firme. Les nombres de monocytes du poumon et de  $MI_{CpG}$  ont été analysés 1 et 7 jours après l'administration de CpG respectivement.

## 16 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant R (version 3.2.4). Les données provenant d'expériences indépendantes ont été poolées pour les analyses sauf indication contraire. Les données brutes ont été transformées si nécessaire. La distribution normale des données et l'homoscédasticité a été vérifiée avec des graphiques diagnostiques. Nous avons considéré une  $P$ -value inférieure à 0,05 comme significative. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, non significatif.

---

Section expérimentale

Résultats

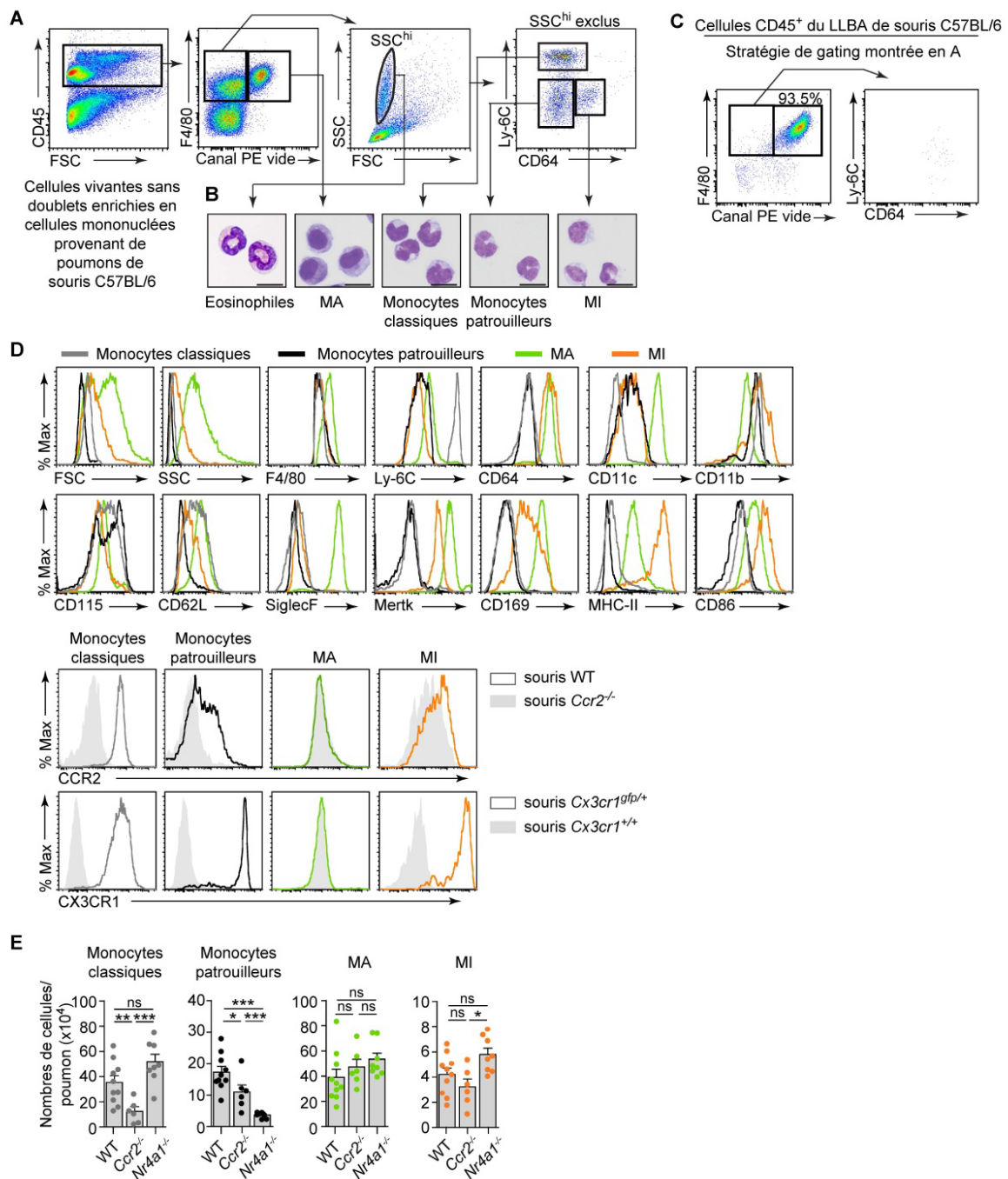
---

## Section expérimentale - Résultats

# 1 Visualisation des monocytes et macrophages pulmonaires murins

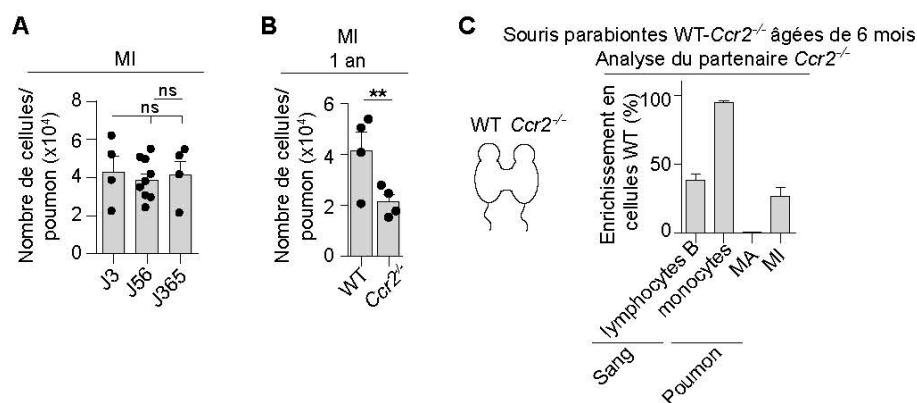
## 1.1 Stratégie de cytométrie en flux simplifiée pour identifier les monocytes et macrophages pulmonaires

Les stratégies actuelles utilisées en cytométrie en flux pour visualiser les monocytes et macrophages pulmonaires étant assez complexes (Jakubzick et al., 2013), nous avons dans un premier temps mis au point un marquage de cytométrie en flux simplifié. A partir de cellules pulmonaires enrichies en cellules mononuclées et provenant de poumons perfusés de souris WT naïves, nous avons après exclusion des doublets, sélectionné les cellules vivantes, exprimant le marqueur leucocytaire CD45 et positives pour le marqueur F4/80, caractéristique des monocytes et macrophages murins (**figure 11A**). Nous avons identifié les MA comme de grandes cellules (FSC<sup>hi</sup>) F4/80<sup>+</sup> autofluorescentes, présentes dans les alvéoles et qui expriment les marqueurs CD11c, SiglecF, CD64, Mertk et CD169 (**figure 11A-D**). Les éosinophiles pulmonaires résidents exprimant le F4/80 (Mesnil et al., 2016) ont été exclus sur base de leur forte granulosité (SSC<sup>hi</sup>). Les cellules CD45<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> restantes ont ensuite été séparées en 3 populations sur base de leur expression de 2 marqueurs caractéristiques de monocytes et de macrophages, Ly-6C (Geissmann et al., 2003) et CD64 (Gautier et al., 2012) respectivement (**figure 11A**). Les cellules Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> ont été identifiées comme des monocytes classiques sur base de leur morphologie monocyttaire (**figure 11B**), de leur expression de marqueurs typiques de monocytes classiques (Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>int</sup>CD62L<sup>+</sup>) (**figure 11D**) et de leur nombre fortement diminué dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> (**figure 11E**), dans lesquelles la sortie de la moelle des monocytes classiques est compromise (Serbina and Pamer, 2006). Les cellules Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup> possédaient également une morphologie monocyttaire (**figure 1B**), exprimaient des marqueurs caractéristiques des monocytes patrouilleurs (Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>) (**figure 11D**) et étaient fortement réduits dans les souris déficientes pour le facteur de transcription NR4A1 (**figure 11E**) qui contrôle la différenciation et la survie des monocytes patrouilleurs (Hanna et al., 2011), démontrant que ces cellules étaient des monocytes patrouilleurs. Finalement les cellules Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup> ont été identifiées comme des MI. Ces cellules étaient en effet absentes du liquide de lavage bronchoalvéolaire (**figure 11C**) et exprimaient les marqueurs de surface MHC-II et les marqueurs de macrophages Mertk et CD169 (**figure 11D**).



**Figure 11. Identification des populations de monocytes et macrophages du poumon.** (A) Stratégie de gating. (B) Photos des différentes populations triées par FACS suivant la stratégie de gating de (A). (C) Analyse à l'état basal des cellules  $CD45^+$  du LLBA en utilisant la stratégie de gating de (A). Plus de 90% des cellules ont été identifiées comme des MA. (D et E) phénotype de surface (D) et nombre absolu (E) des populations indiquées provenant de poumons de souris WT,  $Ccr2^{-/-}$  et  $Nr4a1^{-/-}$ . Les données montrées en (A)-(D) proviennent d'une souris parmi un groupe d'au moins 6 souris d'au moins 3 expériences différentes. Les données montrées en (E) représentent la moyenne +SEM de 3 expériences indépendantes groupées ( $n=6-10$  par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, non significatif). Barres d'échelles = 10  $\mu m$ . LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire.

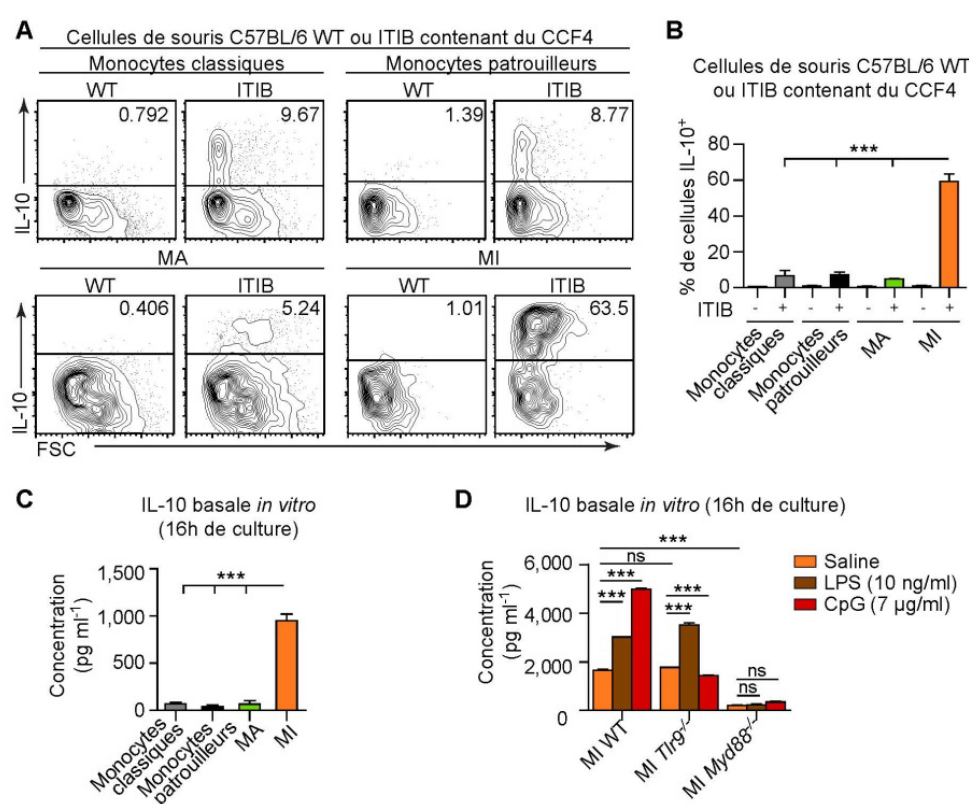
Les MI étaient déjà présents à la naissance (**figure 12A**), exprimaient de faibles niveaux de CCR2 et leurs nombres ne variaient pas dans des souris *Nr4a1*<sup>-/-</sup> et *Ccr2*<sup>-/-</sup> adultes (âgées de 6 à 10 semaines) en comparaison à des souris WT (**figure 11E**). Toutefois, leurs nombres étaient significativement réduits dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> d'un an par rapport à des souris WT contrôles du même âge (**figure 12B**) suggérant que les MI représentent une population hétérogène et partiellement maintenue par les monocytes classiques chez l'adulte comme rapporté par certains (Tan and Krasnow, 2016). Afin de tester cela, les peaux du côté latéral de souris WT CD45.1<sup>+</sup> et *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> ont été suturées ensemble pendant 6 mois afin d'établir une communication vasculaire et l'enrichissement en cellules du partenaire WT dans les souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> a été analysé (**figure 12C**). Les souris parabiontes ont échangé efficacement leur circulation comme en témoigne le pourcentage d'enrichissement de cellules WT CD45.1<sup>+</sup> parmi les lymphocytes B sanguins qui a atteint 50%. A l'inverse, comme CCR2 est requis pour la sortie des monocytes de la moelle, les monocytes WT CD45.1<sup>+</sup> constituaient plus de 90% des monocytes présents dans le sang des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup>. Les MA ne se sont pas enrichis en cellules WT confirmant que ces cellules peuvent se renouveler par prolifération locale à l'état basal (Hashimoto et al., 2013). Cependant, 35% du pool de MI était constitué de cellules du partenaire WT après 6 mois de parabiose, supportant le fait que les MI sont en partie repeuplés par des monocytes sanguins circulants chez l'adulte, une caractéristique qu'on retrouve également chez les macrophages régulateurs des intestins (Bain et al., 2014).



**Figure 12. Nombres et CCR2 dépendance des MI au cours du temps.** (A-B) Nombres absolus de MI provenant (A) de souris WT à différents moments après la naissance et (B) de souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> âgées de 1 an. (C) Des souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> ont été suturées ensemble pendant 6 mois et le pourcentage d'enrichissement de cellules du partenaire WT chez l'hôte *Ccr2*<sup>-/-</sup> est montré. Les données montrées représentent les moyennes +SEM et proviennent (A-B) de 2 expériences indépendantes groupées (n=4-9 par groupe) ou (C) des données poolées de 2 paires de parabiontes. Les p value ont été calculées avec (A) une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey ou (B) un test t de Student (\*\*p<0.01; ns, non significatif).

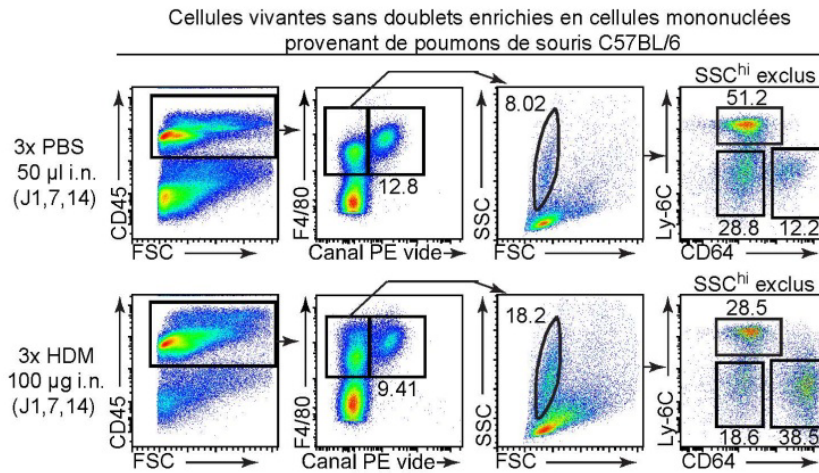


La production d'IL-10 par les MI a été quantifiée *in vivo* par l'utilisation de souris ITIB IL-10 rapportrices (**figure 13A,B**) et *ex vivo* par ELISA (**figure 13C,D**). Ces deux techniques ont confirmé la production constitutive d'IL-10 par les MI, qui étaient les principales cellules productrices d'IL-10 à l'état basal parmi les monocytes/macrophages du poumon (**figure 13A-C**). Des ELISA réalisés sur des MI *Myd88*<sup>-/-</sup> et *TLR9*<sup>-/-</sup> ont révélé que cette production d'IL-10 était dépendante de Myd88 et indépendante de TLR9, en accord avec la littérature (Kawano et al., 2016) et le fait que le LPS, dont la voie de signalisation implique Myd88, favorise la production d'IL-10 par les MI à l'état basal (**figure 13D**) (Bedoret et al., 2009). La stimulation *in vitro* des MI avec du LPS ou des CpG a augmenté leur capacité à produire de l'IL-10 d'une façon dépendante de Myd88 ou de Myd88 et TLR9 respectivement (**figure 13D**).



**Figure 13. Production d'IL-10.** (A-B) Graphs montrant l'expression de l'IL-10 à l'état basal évaluée par la détection d'une fluorescence à 450 nm (produit fluorescent bleu du substrat CCF4) émise par des cellules contenant du CCF4 et isolées de souris ITIB IL-10 rapportrices ou WT contrôles. (A) Densitogrammes où les nombres indiquent le pourcentage de cellules IL-10<sup>+</sup> dans les populations cellulaires. (B) Pourcentage des cellules IL-10<sup>+</sup> dans les populations cellulaires. (C-D) Concentration en IL-10 dans des surnageants de culture de cellules triées par FACS. (C) Concentration basale provenant cellules isolées de souris WT. (D) IL-10 produite par des MI isolés de souris WT, *Tlr9*<sup>-/-</sup> ou *Myd88*<sup>-/-</sup> stimulés au LPS (10 ng/ml) ou aux CpG (7 µg/ml) pendant 16h. Les données montrées en (A) proviennent d'1 souris représentative d'un groupe d'au moins 5 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes, chacune donnant des résultats similaires. Les données représentées en (B)-(D) constituent les moyennes +SEM et proviennent d'une expérience parmi (B-C) 3 ou (D) 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA (B-C) à 1 facteur ou (D) à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*\*\*)*p*<0.001; ns, non significatif).

La même stratégie de gating a également été utilisée sur des souris allergiques au HDM et des populations cellulaires similaires ont été observées (**figure 14**).



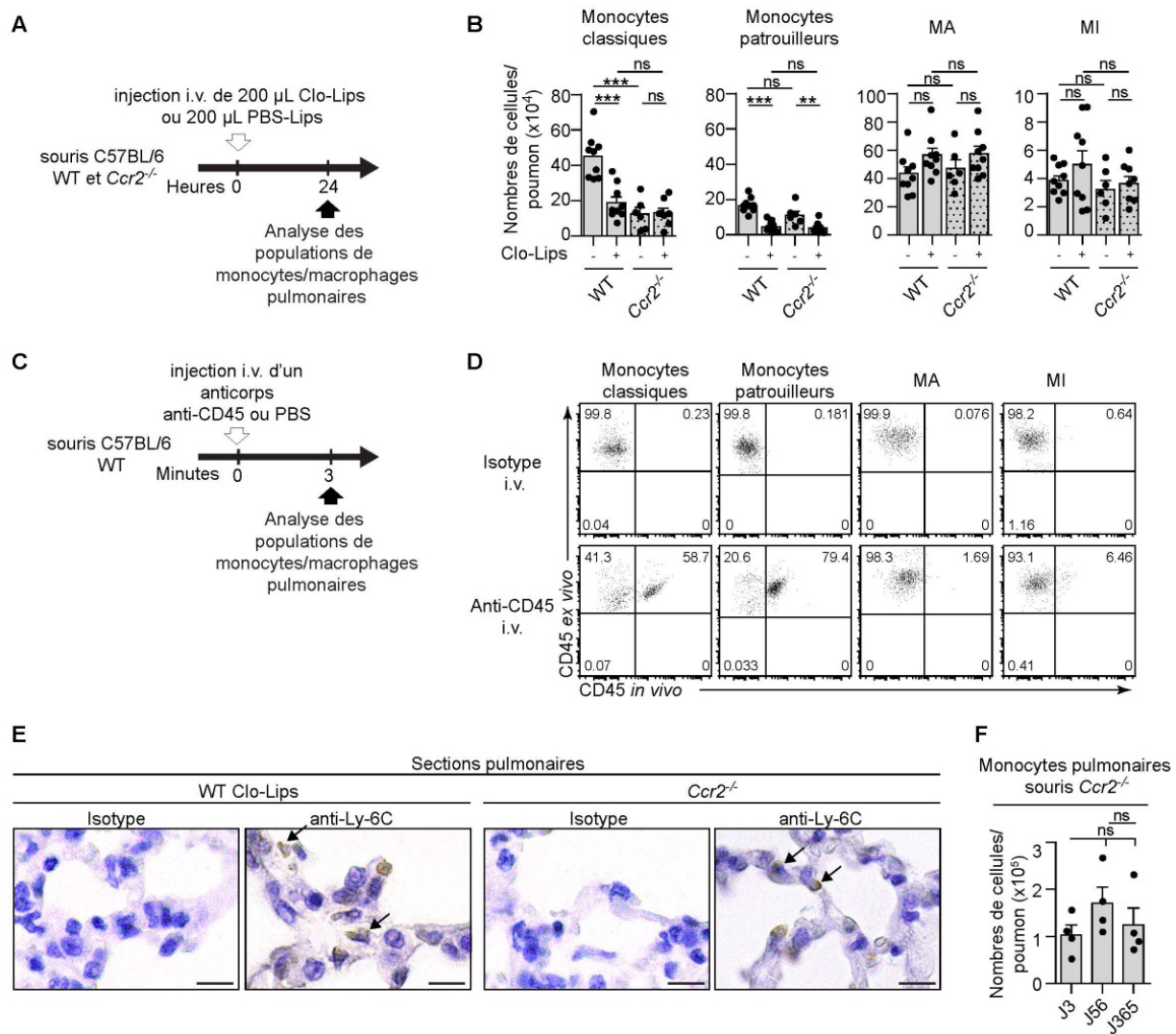
**Figure 14. Stratégie de gating chez des souris allergiques au HDM.** Stratégie de gating identifiant les monocytes et macrophages de poumons murins montrée à la **figure 11A** appliquée au jour 17 à des souris ayant reçu 3 instillations i.n. hebdomadaires d'une solution saline (PBS, 50 µl) ou de HDM (100 µg dans 50 µl). Les résultats proviennent d'une souris représentative d'un groupe de 6 souris provenant de 3 expériences indépendantes, chacune fournissant des résultats similaires.

Cette stratégie simplifiée nous a permis d'identifier 4 population de monocytes/macrophages associés au poumon : les MA, les MI, les monocytes classiques et les monocytes patrouilleurs.

## 1.2 Identification d'une population de monocytes tissulaires

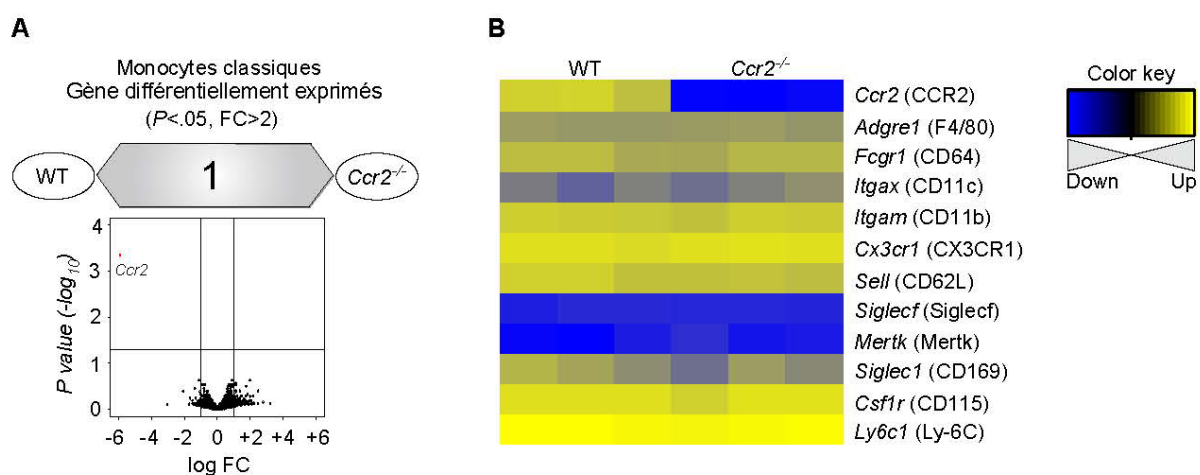
Malgré la perfusion des poumons avec une solution saline, nous avons observé au niveau du poumon deux populations de cellules monocytaires normalement localisées dans la circulation sanguine. Afin de déterminer quelles cellules sont réellement localisées dans le tissu pulmonaire et ne sont pas associées aux vaisseaux sanguins, nous avons déplété les cellules phagocytaires des vaisseaux sanguins en injectant des liposomes de clodronate (Clo-Lips) par voie intraveineuse 24h avant l'analyse (**figure 15A**). Ce traitement n'a eu aucun impact sur le nombre de MA ni de MI (**figure 15B**) confirmant leur localisation tissulaire. Les monocytes patrouilleurs ont été efficacement déplétés ainsi qu'une partie (environ 60%) des monocytes classiques (**figure 15B**), démontrant que la plupart des monocytes, à l'exception d'une partie des monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> étaient associés au système vasculaire pulmonaire. En accord avec ces résultats, l'injection intraveineuse d'un anticorps anti-CD45 couplé à un fluorochrome, nous a indiqué que les MA, les MI et seulement une fraction de monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> étaient réellement localisés dans le tissu pulmonaire car ils n'avaient pas été marqués avec l'anticorps injecté *in vivo* (**figure 15C,D**). Un immunomarquage anti-Ly-6C sur des sections pulmonaires de souris WT traitées aux Clo-Lips et de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> a également confirmé que des cellules Ly-6C<sup>+</sup> étaient localisées dans le parenchyme pulmonaire (**figure 15E**).

L'injection de Clo-Lips à des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> n'a pas affecté la quantité de monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> dont les nombres (**figure 15B**) et la localisation (**figure 15B,E**) étaient similaires à ceux des souris WT traitées avec des Clo-Lips, indiquant que ces monocytes s'établissent dans le poumon indépendamment de CCR2. Ces monocytes étaient également déjà présents à la naissance car ils ont été identifiés en proportion identique dans des poumons de souris âgées de 3 jours (**figure 15F**).



**Figure 15. Identification des monocytes pulmonaires.** (A) Chronologie expérimentale pour les données de (B). (B) Nombres absolus des populations indiquées de poumons de souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> traitées par voie i.v. avec des PBS-Lips ou Clo-Lips. (C) Chronologie expérimentale pour les données de (D). Des anticorps couplés à l'APC ont été administrés par voie i.v. 3 minutes avant euthanasie et les populations indiquées ont été analysées par cytométrie en flux. (D) Dot plots représentatifs montrant la liaison des anticorps anti-CD45 administrés in vivo et ex vivo sur les populations indiquées. (E) Immunomarquage anti-Ly-6C de sections pulmonaires de souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> traitées avec des Clo-Lips. (F) Nombres absolus de monocytes pulmonaires de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> à différents temps après la naissance. Les données montrées en (B-F) sont groupées à partir d'au moins 2 expériences indépendantes et représentent les moyennes +SEM ( $n=4-10$  par groupe). Les données montrées en (D-E) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 5 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes, chacune fournissant des résultats similaires. Les  $p$  value ont été calculées avec une ANOVA (F) à 1 facteur ou (B) à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey ( $***p<0.001$ ; ns, non significatif).

Afin d'évaluer si ces monocytes localisés dans le tissu pulmonaire représentent une population distincte des monocytes sanguins CCR2 dépendants classiques, nous avons réalisés une comparaison transcriptomique des monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> récupérés à partir de poumons perfusés de souris WT (constitués d'environ 60% de monocytes classiques CCR2 dépendants et 40% de monocytes du tissu pulmonaire) et de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> (constitués de plus de 95% de monocytes du tissu pulmonaire). Cette analyse n'a révélé qu'un seul gène différentiellement exprimé, *Ccr2* (**figure 16A,B**), montrant que les monocytes du tissu pulmonaire correspondent parfaitement aux monocytes classiques Ly-6C<sup>hi</sup>.



**Figure 16.** Analyse transcriptomique des monocytes tissulaires. (A) Résumé des gènes différentiellement exprimés (DE) ( $P < 0.05$ ,  $FC > 2$ ) montrant les gènes DE en rouge dans le graph volcano et le nombre total de gènes DE au milieu de la flèche bidirectionnelle. (B) Heatmap indiquant l'expression relative des gènes DE des marqueurs membranaires montrés à la **figure 11D**.

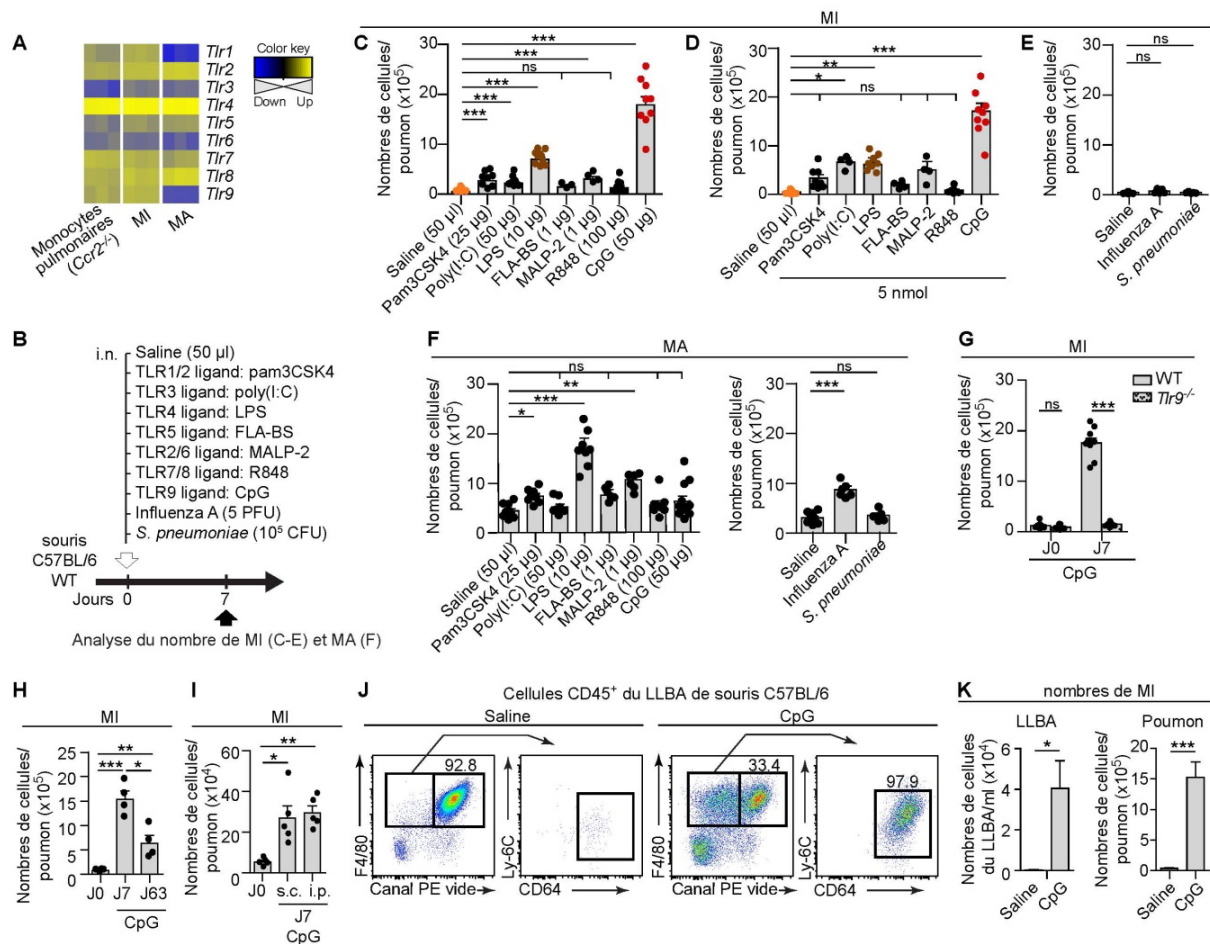
Il existe une population de monocytes CCR2 indépendants résidant dans le tissu pulmonaire et semblables aux monocytes classiques Ly-6C<sup>hi</sup>. Dans la suite de ce travail, ces monocytes CCR2 indépendants résidants dans le tissu seront appelés monocytes pulmonaires.

## 2 Les CpG induisent une expansion des MI dépendante du TLR9

Afin d'investiguer la plasticité des MI en dehors de l'homéostasie pulmonaire, nous avons étudié l'impact quantitatif et qualitatif d'une stimulation microbienne sur ces cellules.

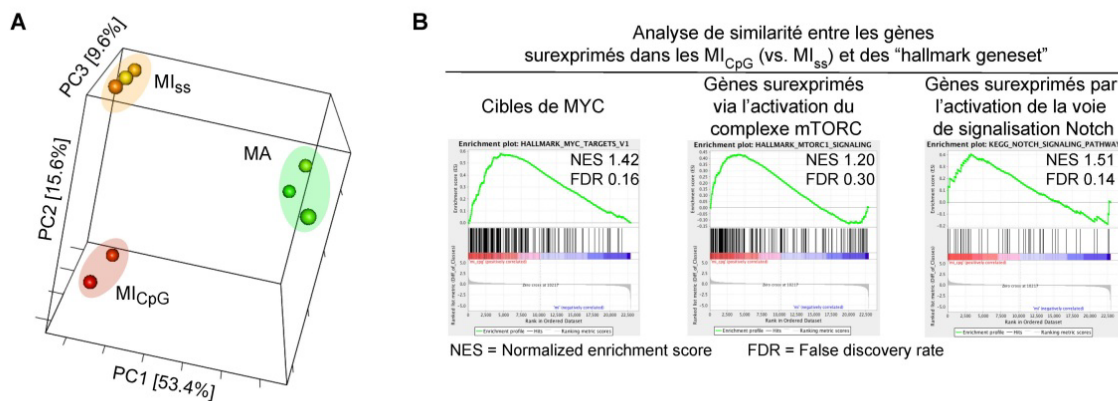
Nous avons tout d'abord confirmé l'expression de la plupart des TLRs sur les MI (**figure 17A**) avant d'évaluer comment une exposition locale à des PAMPs tels que divers ligands de TLRs ou une infection locale pourrait affecter quantitativement les MI (**figure 17B**). Bien que différents PAMPs, y compris le LPS, étaient capables de significativement expandre les MI, les CpG étaient de loin les plus puissants à augmenter le nombre de MI 1 semaine après le traitement i.n. (augmentation de 42.5 fois avec une moyenne de 1.7 millions de cellules après traitement) (**figure 17C,D**). A l'inverse, une infection pulmonaire au virus influenza A (PR8) ou à *Streptococcus pneumoniae* n'a pas eu d'effet significatif sur le nombre de MI 7 jours après infection (**figure 17E**). Par ailleurs les nombres de MA sont restés inchangés après le traitement aux CpG et ont été augmentés modérément après traitement au LPS (**figure 17F**).

L'augmentation très importante de MI était dépendante de TLR9 car elle n'a pas été observée dans des souris *Tlr9<sup>-/-</sup>* ayant reçu le même traitement (**figure 17G**) et a perduré jusqu'à 8 semaines après l'administration de CpG (**figure 17H**). L'administration de CpG par voie systémique (i.e. s.c. ou i.p.) a également induit une expansion du pool de MI bien que de moindre ampleur (**figure 17I**). De plus, une petite fraction de MI a été observée au niveau du LLBA de souris 7 jours après traitement aux CpG (**figure 17J,K**).



**Figure 17. Quantification et localisation des MI et MA suite à une stimulation microbienne.** (A) Heatmap de l'expression relative des Tlr sur des monocytes pulmonaires isolés de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> et des MA et des MI isolés de souris WT. (B) Chronologie expérimentale des données montrées en (C-F). (C-D) Nombres absolus de MI de poumons de souris WT 7 jours après stimulation i.n. avec (C) les doses indiquées ou (D) 5 nmol de ligands de TLR. (E) Nombres absolus de MI de poumons de souris WT 7 jours après infection i.n. avec le virus influenza A (souche PR8) ou *S. pneumoniae* (serotype 1). (F) Nombres absolus de MA de poumons de souris WT 7 jours après stimulation i.n. avec les ligands de TLR indiqués ou une infection i.n. avec le virus influenza A ou *S. pneumoniae*. (G) Nombres absolus de MI de poumons de souris WT et *Tlr9*<sup>-/-</sup> avant et 7 jours après injection i.n. de CpG. (H) Nombres absolus de MI de souris WT avant et 7 ou 63 jours après instillation i.n. de CpG. (I) Des souris WT ont été injectées par voie s.c. ou i.p. avec 50 µg de CpG. Sept jours plus tard les nombres de MI ont été déterminés et comparés aux souris analysées avant traitement. (J) Dot plots représentatifs des cellules CD45<sup>+</sup> du LLBA en utilisant la technique de gating montrée à la figure 11A. Les nombres indiquent les % de cellules parmi les cellules CD45<sup>+</sup> du LLBA. (K) Nombres absolus de MI du LLBA et du poumon. Les données représentées en (C-G,I) constituent les moyennes +SEM et proviennent d'au moins 2 expériences indépendantes ( $n=4-12$  par groupe). Les données montrées en (H,K) représentent les moyennes +SEM et proviennent d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes ( $n=4$  par groupe). Les  $p$  value ont été calculées avec une ANOVA (C-G,I) à 1 facteur ou (G) à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey ou (K) avec un test  $t$  de Student (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; ns, non significatif). PFU, plaque-forming units; CFU, colony-forming units; J, jour; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire.

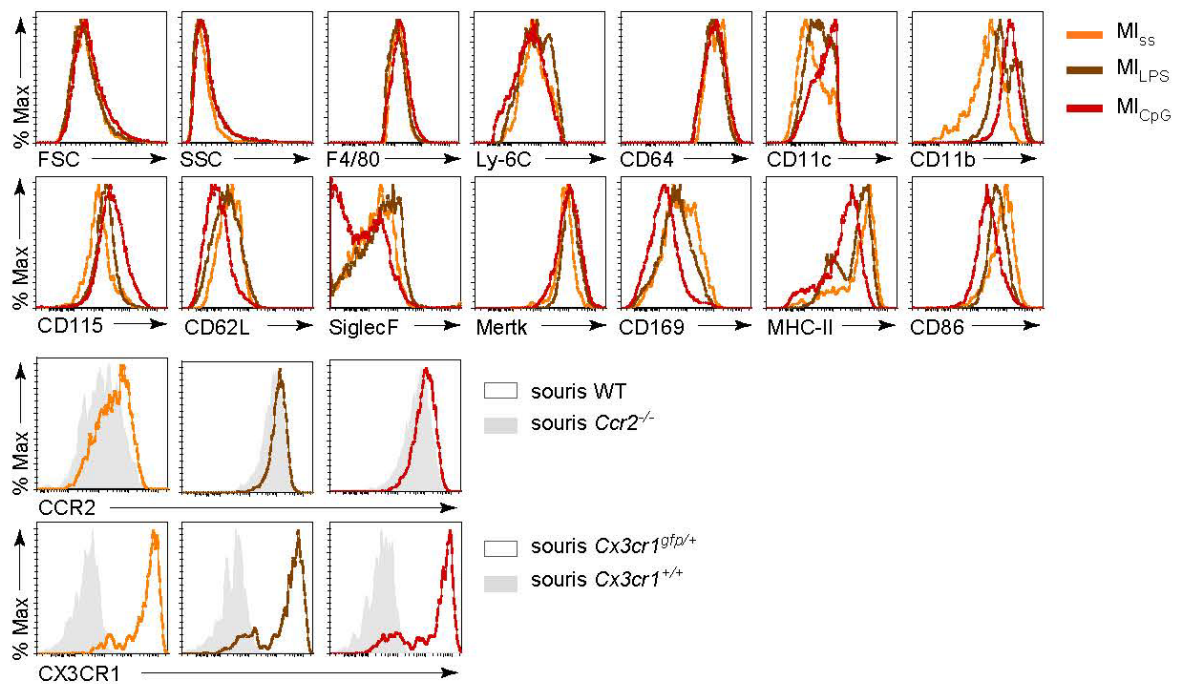
Nous avons comparé les profils d'expression de gènes entre les MI induits par les CpG ( $MI_{CpG}$ ) et les MI de l'état basal ( $MI_{SS}$ ). Une analyse PCA (*Principal-component analysis*) a révélé que les  $MI_{CpG}$  sont plus proches des  $MI_{SS}$  que des MA mais 285 gènes étaient régulés différemment entre les  $MI_{CpG}$  et les  $MI_{SS}$  ( $FC > 2$ ,  $p < 0.01$ ) (**figure 18A**). Parmi les gènes surexprimés dans les  $MI_{CpG}$ , une analyse GSEA (*gene-set enrichment analysis*) a révélé un enrichissement significatif des gènes impliqués dans l'activation et la différenciation des macrophages tels que les cibles de c-MYC (Aziz et al., 2009) ou des gènes surexprimés suite à l'activation de la voie de signalisation mTORC1 ou NOTCH (Covarrubias et al., 2016; Monsalve et al., 2009) (**figure 18B**).



**Figure 18.** Analyse transcriptomique des  $MI_{SS}$  et  $MI_{CpG}$ . (A) Analyse PCA comparant les  $MI_{SS}$ ,  $MI_{CpG}$  et MA. Les pourcentages indiquent la variabilité capturée par chaque composante. (B) Analyse GSEA entre les  $MI_{CpG}$  et des ensembles de gènes définis.

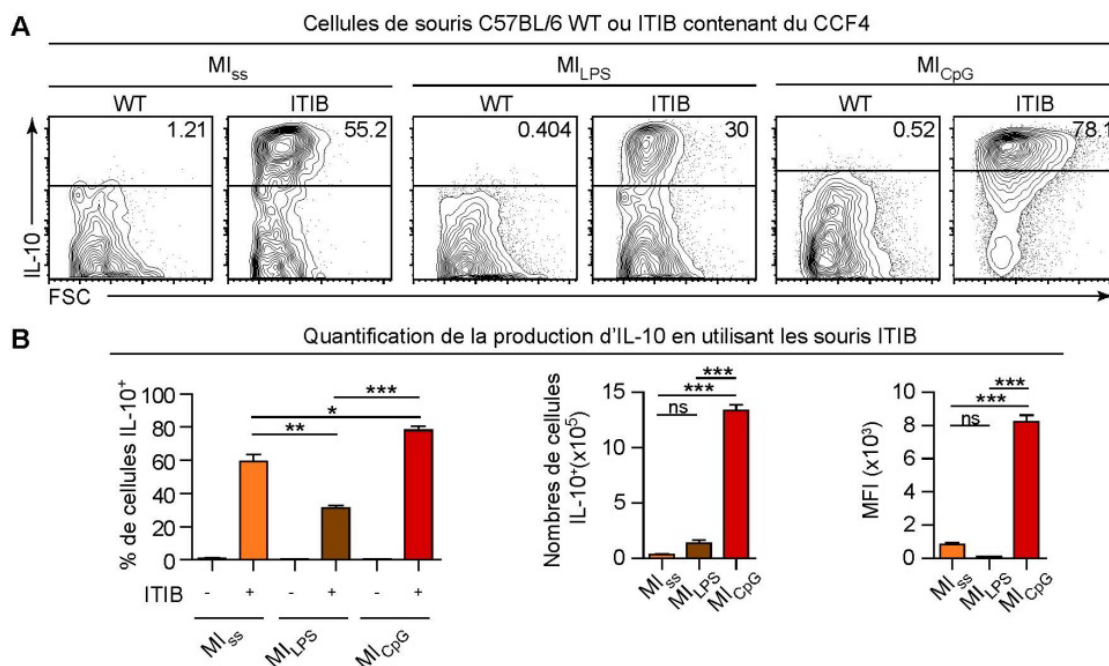


L'analyse phénotypique des  $MI_{CpG}$  a révélé que l'expression protéique de divers marqueurs de surface était comparable entre les  $MI_{CpG}$  et les  $MI_{ss}$  à l'exception de CD11b et de CD115 qui étaient surexprimés sur les  $MI_{CpG}$  et de CD62L, SiglecF et CD169 qui étaient diminués sur ces mêmes cellules. Le phénotype des MI induits par le LPS ( $MI_{LPS}$ ) était cependant comparable à celui des  $MI_{ss}$  (figure 19).



**Figure 19. Phénotype de surface des MI suite à une exposition au LPS et CpG.** Phénotype de surface des MI pulmonaires à l'état basal ( $MI_{ss}$ ) ou 7 jours après traitement *i.n.* au LPS ( $MI_{LPS}$ ) ou aux CpG ( $MI_{CpG}$ ). Les données proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris d'au moins 3 expériences différentes, chacune donnant des résultats similaires.

Fonctionnellement, en comparaison aux  $MI_{SS}$ , les  $MI_{CpG}$  ont montré un profil hypersuppresseur. En effet, l'étude de la production d'IL-10 par ces cellules a indiqué que le nombre de cellules IL-10<sup>+</sup> parmi les  $MI_{CpG}$  était augmenté de 55 fois suite au traitement aux CpG. De plus le niveau d'expression de l'IL-10 était également plus important, menant à une augmentation globale de 550 fois pour la quantité d'IL-10 dérivée de MI dans les poumons après traitement aux CpG. La stimulation au LPS n'a pas induit de profil aussi suppresseur (**figure 20**).



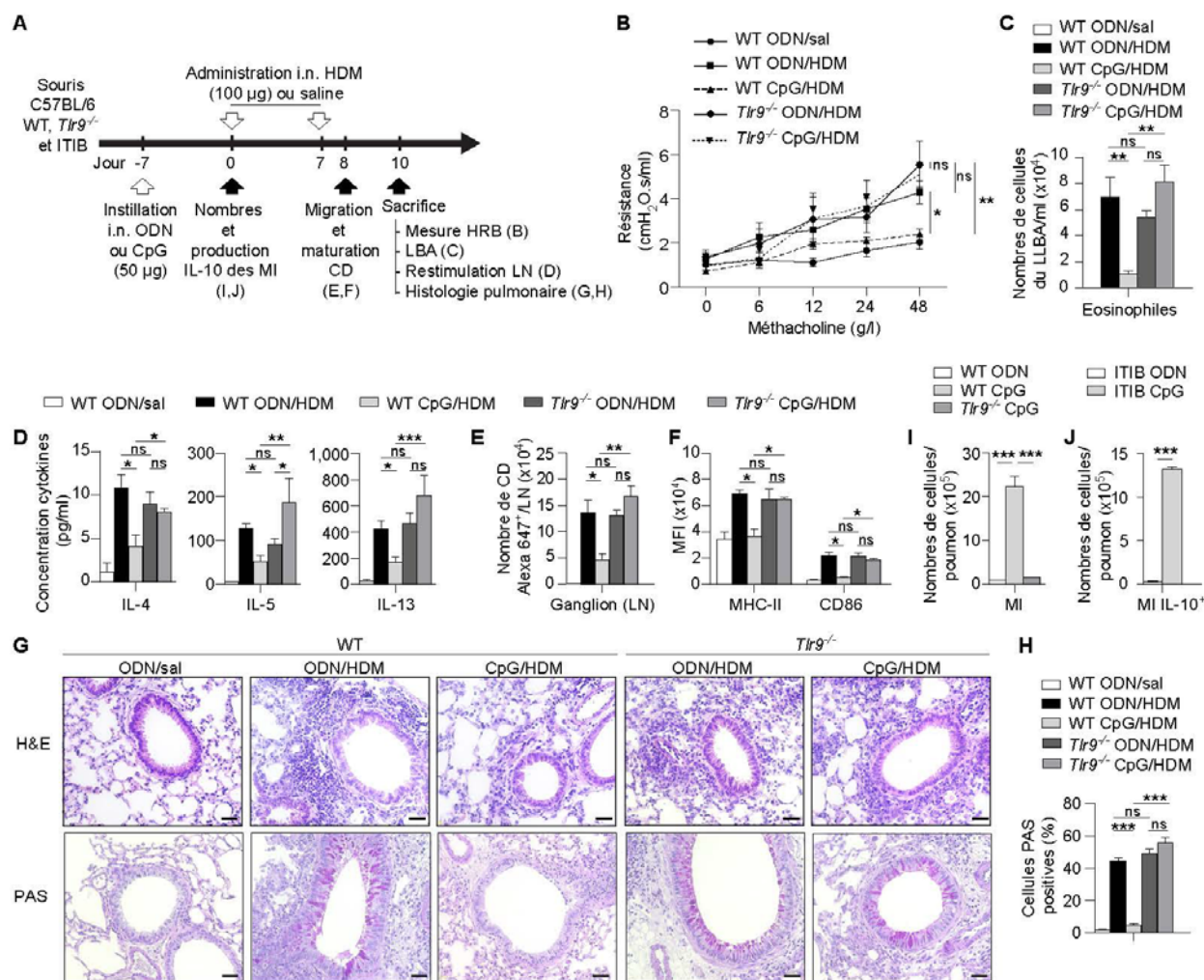
**Figure 20. Production d'IL-10 par les MI suite à une exposition au LPS et CpG.** (A-B) Graphs montrant l'expression de l'IL-10 évaluée par la détection d'une fluorescence à 450 nm (produit fluorescent bleu du substrat CCF4) émise par des cellules contenant du CCF4 et isolées de souris ITIB IL-10 rapportrices ou WT contrôles. (A) Densitogrammes où les nombres indiquent le pourcentage de cellules IL-10<sup>+</sup> dans les populations cellulaires. (B) Pourcentage (gauche), nombres (milieu) et moyenne d'intensité de fluorescence (MFI, droite) des cellules IL-10<sup>+</sup> dans les populations cellulaires. Les données montrées en (A) proviennent d'1 souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant de 2 expériences indépendantes, chacune donnant des résultats similaires. Les données en (B) représentent les moyennes +SEM et proviennent d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes (n=3-4 par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif).

Ces données indiquent que les MI s'expandent spécifiquement en réponse aux CpG et que les  $MI_{CpG}$  acquièrent des caractéristiques transcriptomiques, phénotypiques et fonctionnelles différentes des  $MI_{SS}$ .

### 3 Les MI induits par les CpG protègent d'une sensibilisation à l'encontre d'allergènes inhalés

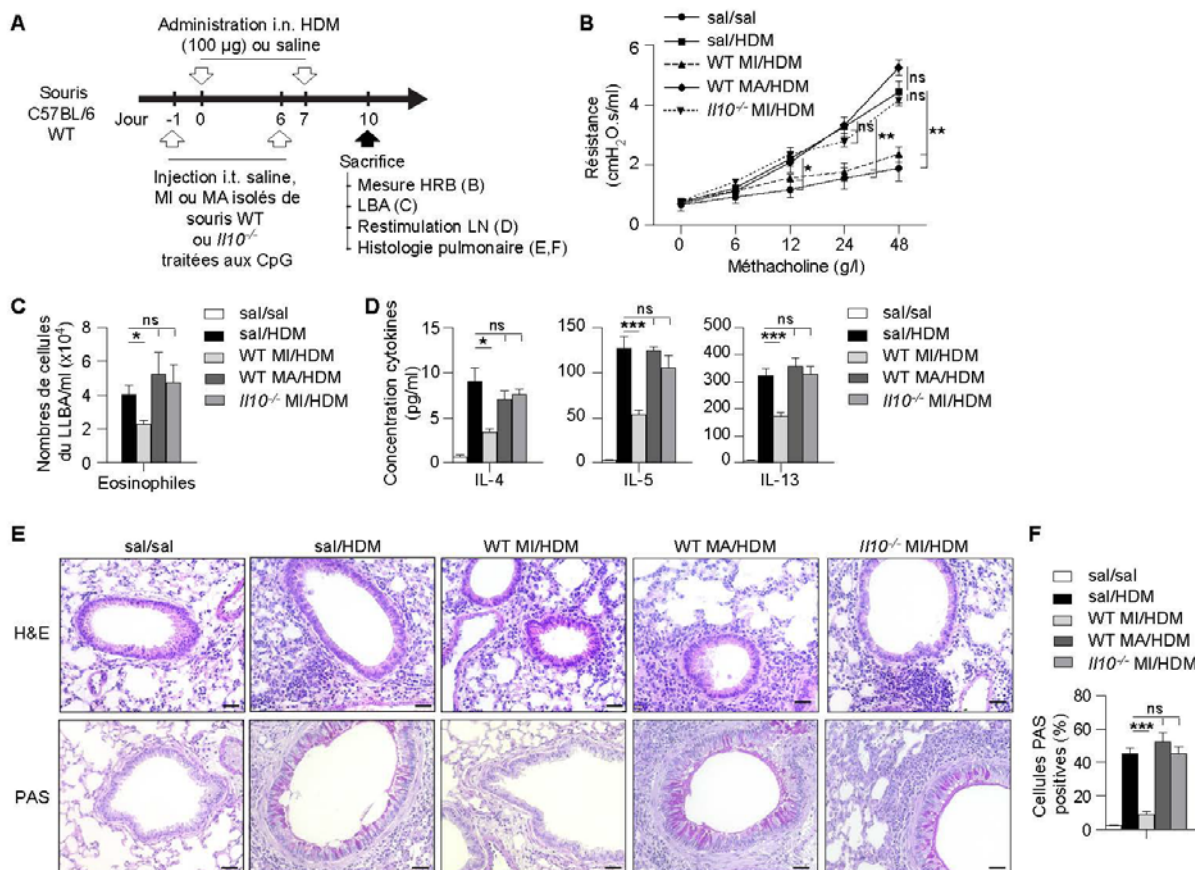
Comme les CpG sont connus pour avoir des effets protecteurs sur la sensibilisation allergique, nous avons émis l'hypothèse que le profil hypersuppresseur des MI<sub>CpG</sub> pourrait contribuer à cette protection à l'encontre du développement d'allergies respiratoires.

Tout d'abord, nous avons développé un modèle murin de prévention d'asthme basé sur un traitement aux CpG durant lequel des souris WT sont exposées par voie i.n. à des CpG 7 jours avant 2 instillations hebdomadaire de 100 µg de HDM (**figure 21A**). Ce régime d'exposition au HDM dépasse les fonctions régulatrices des MI à l'état basal étant donné que 100% des souris WT exposées au HDM développent de l'hyperréactivité bronchique (HRB) (**figure 21B**), de l'éosinophilie au niveau du liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) (**figure 21C**), une réponse Th2 spécifique du HDM dans les ganglions lymphatiques (**figure 21D**), de l'inflammation péribronchique et une production accrue de mucus (**figure 21G,H**) tout comme une augmentation de l'activation des CD<sub>s</sub> pulmonaires (**figure 21F**) et de la migration des CD<sub>s</sub> jusqu'aux ganglions (**figure 21E**). Dans ce modèle, une pré-exposition aux CpG induit une augmentation de la population des MI<sub>CpG</sub> producteurs d'IL-10 (**figure 21I,J**) et protège des souris WT mais pas *Tlr9*<sup>-/-</sup> des caractéristiques asthmatiques induites par le HDM et de l'activation des CD<sub>s</sub> (**figure 21B-H**).



**Figure 21. Modèle murin de prévention d'asthme par les CpG.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Quantification de la migration des CDs jusqu'au ganglion bronchique et (F) expression du MHCII et CD86 au jour 8. (G) Marquage H&E et PAS de sections pulmonaires et (H) quantification de la production de mucus avec le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales. (I) Nombres de MI<sub>CpG</sub> et (J) de MI<sub>CpG</sub> IL-10<sup>+</sup> au jour 0. Les données montrent les moyennes +SEM et (B-F,H) sont issues de 3 expériences indépendantes groupées (n=6-10 par groupe) ou (I,J) proviennent d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes. Les données montrées en (G) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec (B-F,H,I) une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey ou avec (J) un test t de Student (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif). Barres d'échelle = 32 µm. HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node); H&E, Hématoxyline et éosine; PAS, Periodic Acid-Shiff.

Ensuite, afin de tester si les  $MI_{CpG}$  étaient suffisant afin de conférer cette protection, nous avons réalisé des expériences de transfert adoptif (**figure 22A**). L'HRB, l'éosinophilie, la réponse Th2 spécifique au HDM, l'inflammation pulmonaire et la production de mucus étaient significativement réduites quand les  $MI_{CpG}$  isolés de poumons de souris WT traitées aux CpG étaient transférés avant l'exposition au HDM (**figure 22B-F**). Cette protection était spécifique aux  $MI_{CpG}$  et en particulier à l'IL-10 produite par les  $MI_{CpG}$  car les transferts de MA WT ou de  $MI_{CpG}$   $Il-10^{-/-}$  n'ont pas réussi à améliorer les caractéristiques allergiques (**figure 22B-F**).



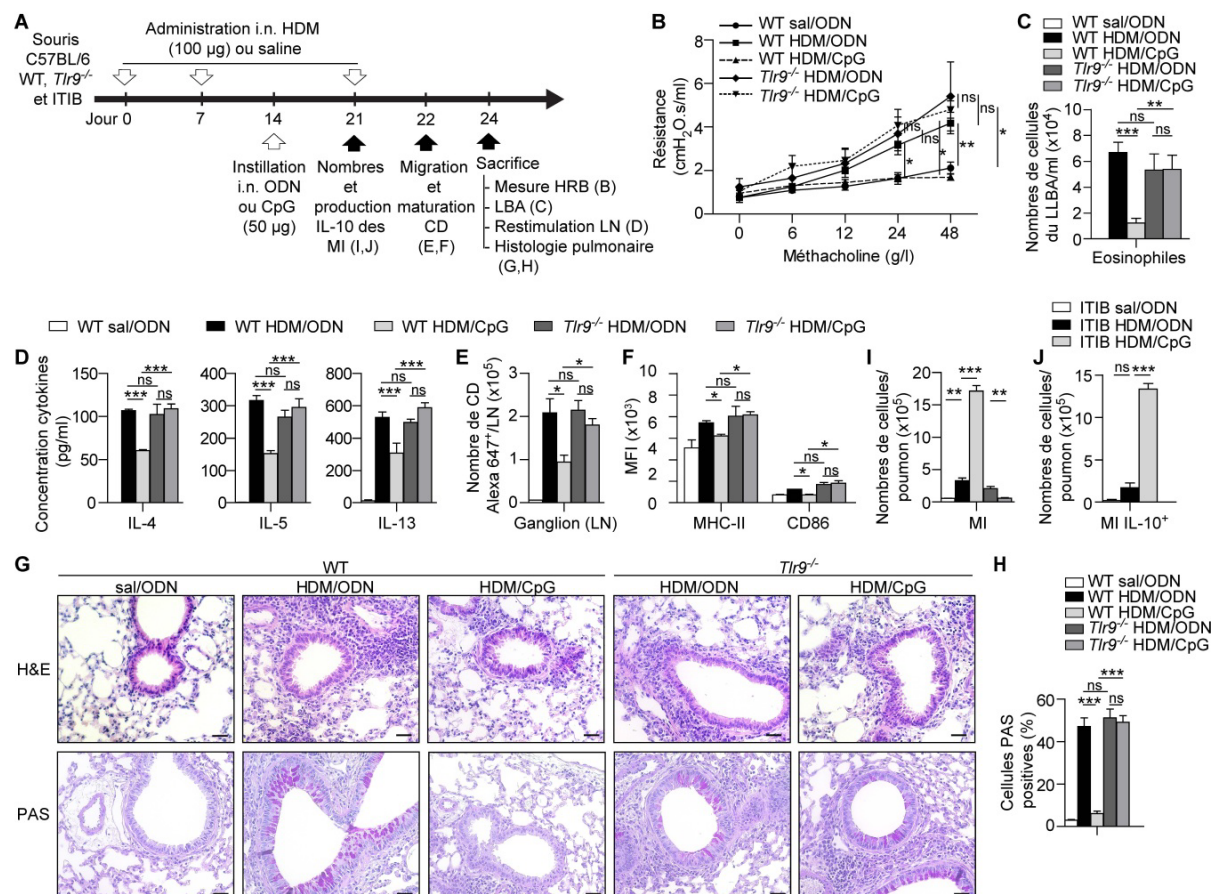
**Figure 22. Contribution des  $MI_{CpG}$  pour la prévention de l'asthme expérimental.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Marquage H&E et PAS de sections pulmonaires et (F) quantification de la production de mucus avec le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales. Les données (B-D,F) sont issues de 3 expériences indépendantes groupées ( $n=6-10$  par groupe) et montrent les moyennes  $\pm$ SEM ou (E) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; ns, non significatif). Barres d'échelle = 32 µm. HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node); H&E, Hématoxyline et éosine; PAS, Periodic Acid-Shiff.

Ces résultats démontrent que les MI producteurs d'IL-10 sont essentiels pour les effets protecteurs des CpG envers une sensibilisation à des allergènes inhalés.

## 4 Les MIs induits par les CpG médient les effets immunothérapeutiques des CpG sur un asthme établi

Les CpG ont déjà démontré leur efficacité dans l'atténuation d'un asthme établi dans des modèles animaux et des essais cliniques. Nous avons donc testé l'effet des MI<sub>CpG</sub> dans un modèle d'asthme établi.

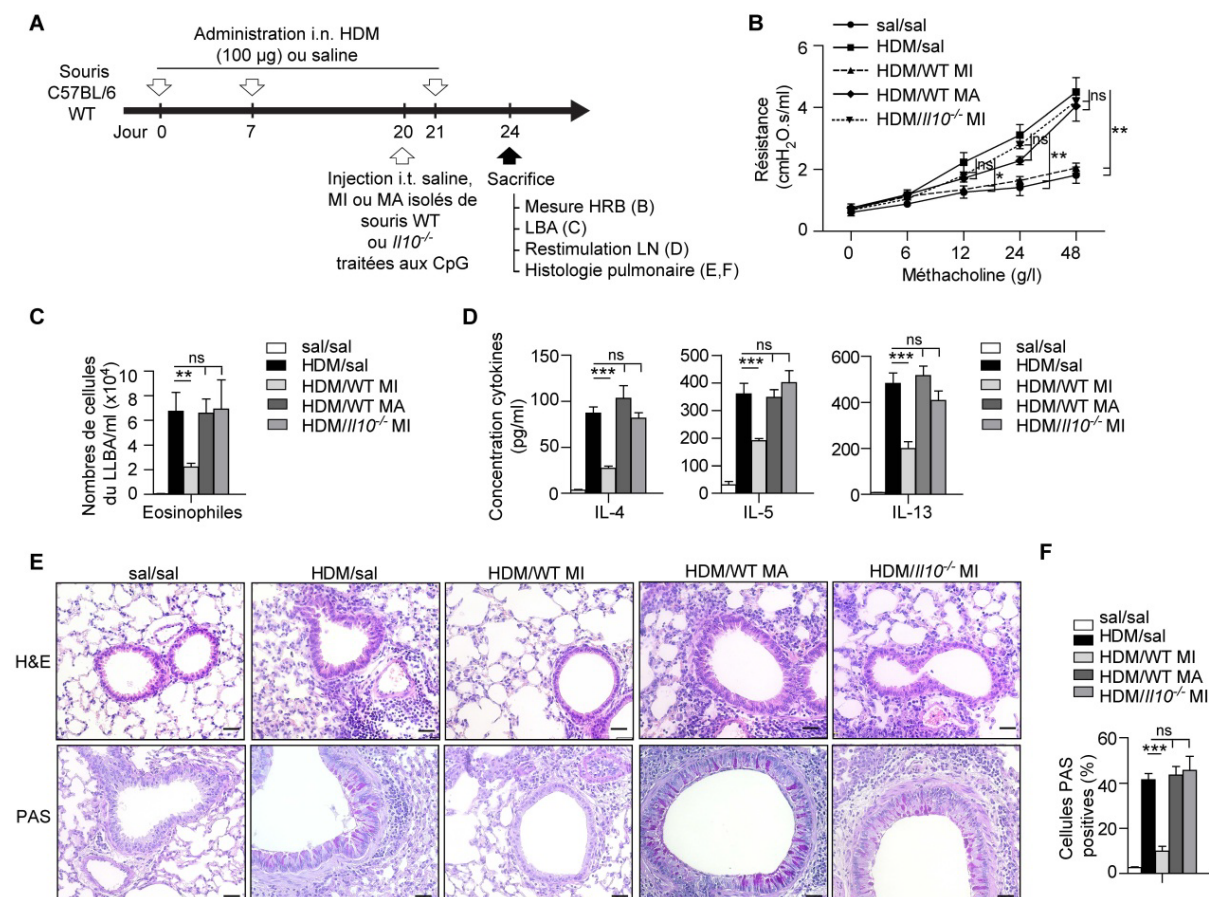
Nous avons développé un modèle d'immunothérapie basé sur le traitement aux CpG de souris sensibilisées au HDM avant un challenge allergénique au HDM (**figure 23A**). Dans ce modèle, les CpG ont été plus efficaces pour l'augmentation de la population de MI<sub>CpG</sub> producteurs d'IL-10 et la diminution de l'HRB, de l'inflammation éosinophilique, de la réponse TH2 spécifique au HDM, la production de mucus et l'activation des CD<sub>s</sub> que les ODN, caractéristiques non observées dans les souris *Tlr9*<sup>-/-</sup> (**figure 23B-H**).



**Figure 23. Modèle murin d'immunothérapie d'asthme par les CpG.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Quantification de la migration des CD jusqu'au ganglion bronchique et (F) expression du MHCII et CD86 au jour 22. (G) Marquage H&E et PAS de sections pulmonaires et (H) quantification de la production de mucus avec le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales. (I) Nombres de MI<sub>CpG</sub> et (J) de MI<sub>CpG</sub> IL-10<sup>+</sup> au jour 21. Les données montrent les moyennes +SEM et (B-F,H) sont issues de 3 expériences indépendantes groupées (n=6-10 par groupe) ou (I,J) proviennent d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes. Les données montrées en (G) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif). Barres d'échelle = 32 µm. HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node); H&E, Hématoxyline et éosine; PAS, Periodic Acid-Shiff.

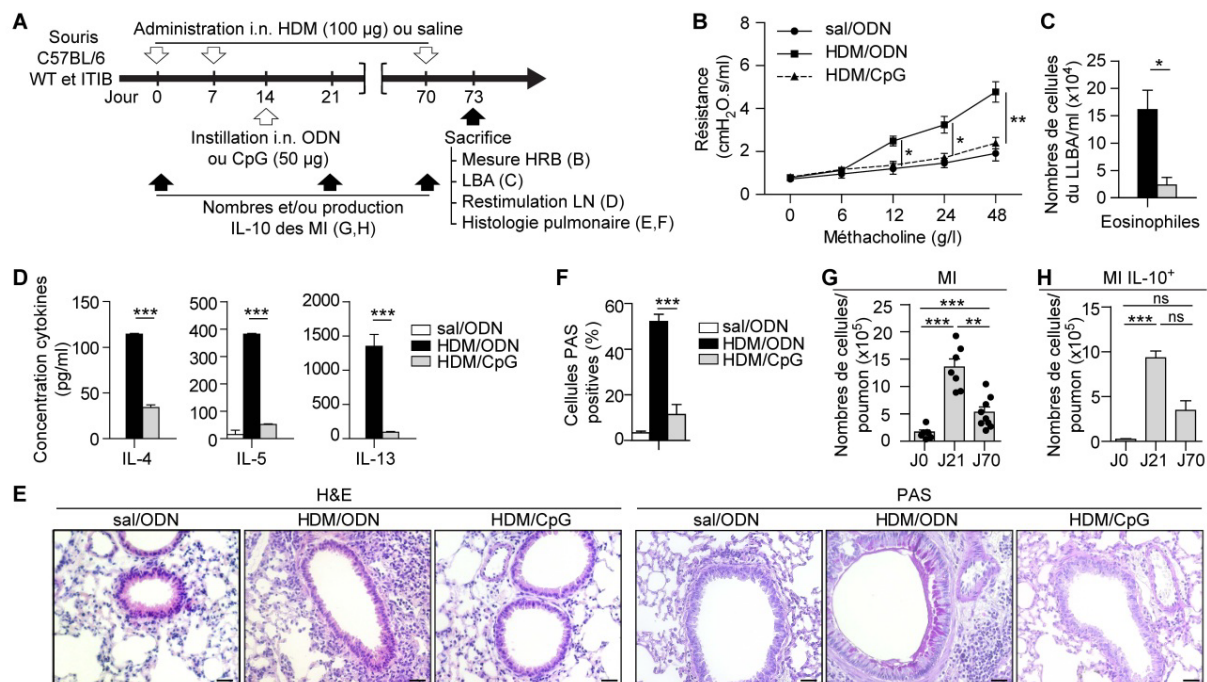


De plus, les  $MI_{CpG}$  étaient suffisant pour conférer cette protection car le transfert adoptif de  $MI_{CpG}$  avant le challenge allergénique au HDM a fortement diminué l'allergie des voies respiratoires des souris sensibilisées, un effet non observé quand des MA ou  $MI_{CpG}$   $Il-10^{-/-}$  avaient été transférés (figure 24).



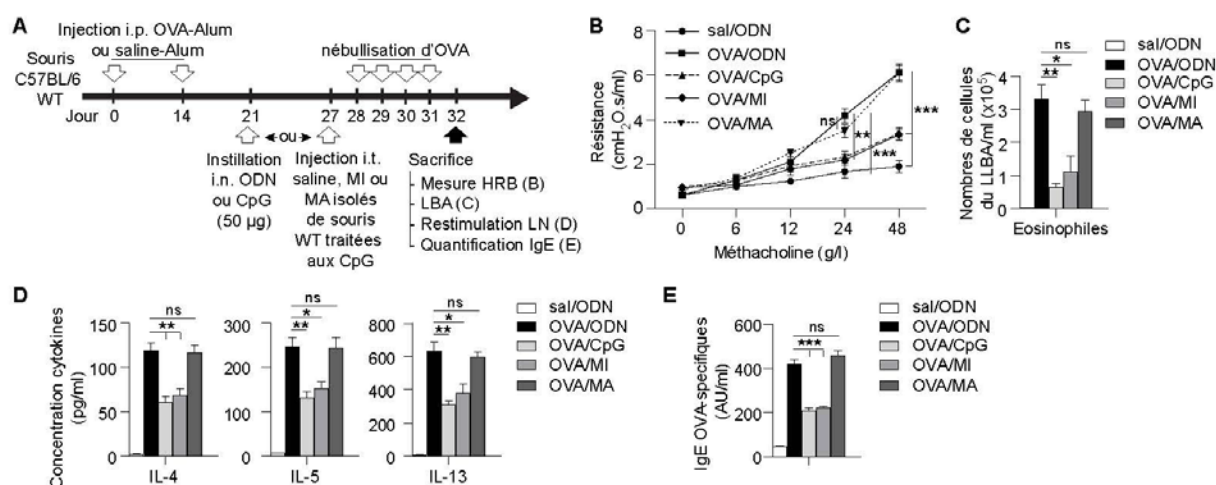
**Figure 24. Contribution des  $MI_{CpG}$  pour le traitement de l'asthme expérimental.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Marquage H&E et PAS de sections pulmonaires et (F) quantification de la production de mucus avec le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales. Les données (B-D,F) sont issues de 3 expériences indépendantes groupées ( $n=6-10$  par groupe) et montrent les moyennes  $\pm$  SEM ou (E) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; ns, non significatif). Barres d'échelle = 32  $\mu$ m. HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node); H&E, Hématoxyline et éosine; PAS, Periodic Acid-Shiff.

L'expansion de MI producteurs d'IL-10 et les effets immunothérapeutiques induits par les CpG ont persisté jusqu'à 8 semaines après le traitement aux CpG (**figure 25**).



**Figure 25. Effets à long terme des CpG sur les nombres de MI et un asthme expérimental induit au HDM.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Marquage H&E et PAS de sections pulmonaires et (F) quantification de la production de mucus avec le pourcentage de cellules caliciformes marquées au PAS par rapport au nombre total de cellules épithéliales. (G) Nombres de MICpG et (H) de MICpG IL-10<sup>+</sup> aux jours 0, 21 et 70. Les données montrent les moyennes +SEM et (B) proviennent d'une expérience représentative de 3 expériences indépendantes ou (C,D,F-H) sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes groupées (n=6-12 par groupe). Les données montrées en (E) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif). Barres d'échelle = 32 µm. HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node); H&E, Hématoxyline et éosine; PAS, Periodic Acid-Shiff; J, jour.

De plus, une protection similaire induite par les  $MI_{CpG}$  a été observée dans un modèle d'asthme basé sur une sensibilisation systémique avec de l'OVA et de l'alun (**figure 26**).



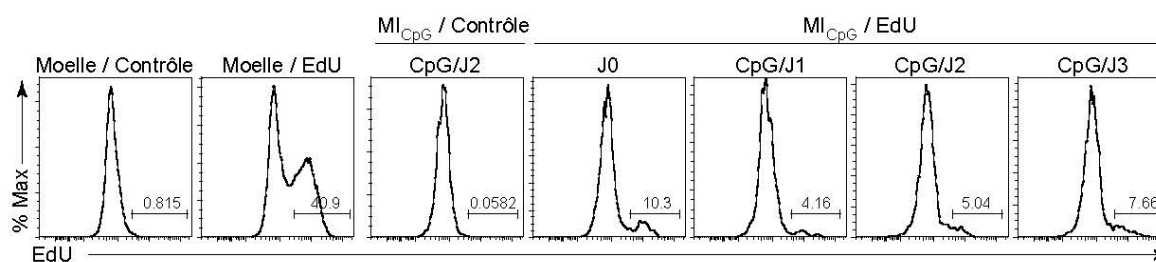
**Figure 26. Contribution des CpG et  $MI_{CpG}$  dans un asthme expérimental induit à l'OVA.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Résistance dynamique des voies respiratoires suite à l'inhalation de méthacholine. (C) Nombres d'éosinophiles dans le LLBA. (D) Concentration en cytokines dans les surnageants de culture de cellules des ganglions (LN) bronchiques restimulés avec du HDM. (E) Quantification des IgE OVA-spécifiques du sérum. Les données proviennent d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes ( $n=4-6$  par groupe) et montrent les moyennes +SEM. Les  $p$  value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ ; ns, non significatif). HRB, hyperréactivité bronchique; LLBA, liquide de lavage broncho-alvéolaire; LN, ganglion (lymph node).

Ces données indiquent que les CpG exercent leurs effets immunothérapeutiques via l'induction de  $MI_{CpG}$  producteurs d'IL-10 qui persistent jusqu'à 8 semaines après le traitement aux CpG.

## 5 Les CpG augmentent la population de MI principalement à partir de monocytes CCR2 indépendants

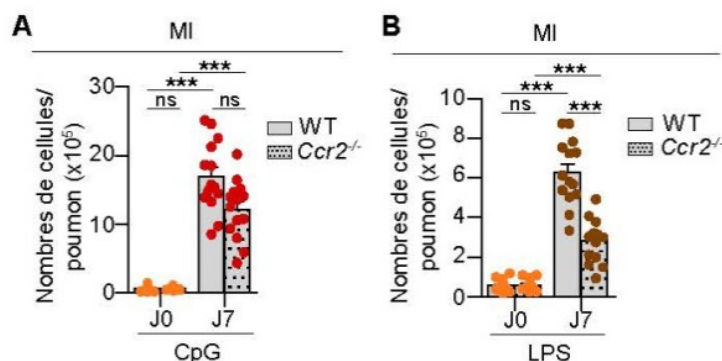
Au vu de la contribution cruciale des  $MI_{CpG}$  dans la prévention et le traitement de l'asthme dans nos modèles, nous avons ensuite voulu déterminer l'origine de ces macrophages. Dans les tissus adultes, les macrophages sont maintenus ou augmentent leur nombre suite à une prolifération locale ou à une différenciation à partir de monocytes classiques CCR2 dépendants dérivés de la moelle (Ginhoux and Guilliams, 2016).

Tout d'abord, afin d'évaluer la capacité proliférative des MI, nous avons analysés l'incorporation d'EdU, un analogue de la thymidine, par les MI après traitement aux CpG. L'exposition aux CpG n'a pas augmenté le pourcentage de MI EdU<sup>+</sup> que ce soit 1, 2 ou 3 jours après le traitement (**figure 27**), ne fournissant aucune preuve d'une prolifération locale des MI après traitement aux CpG.



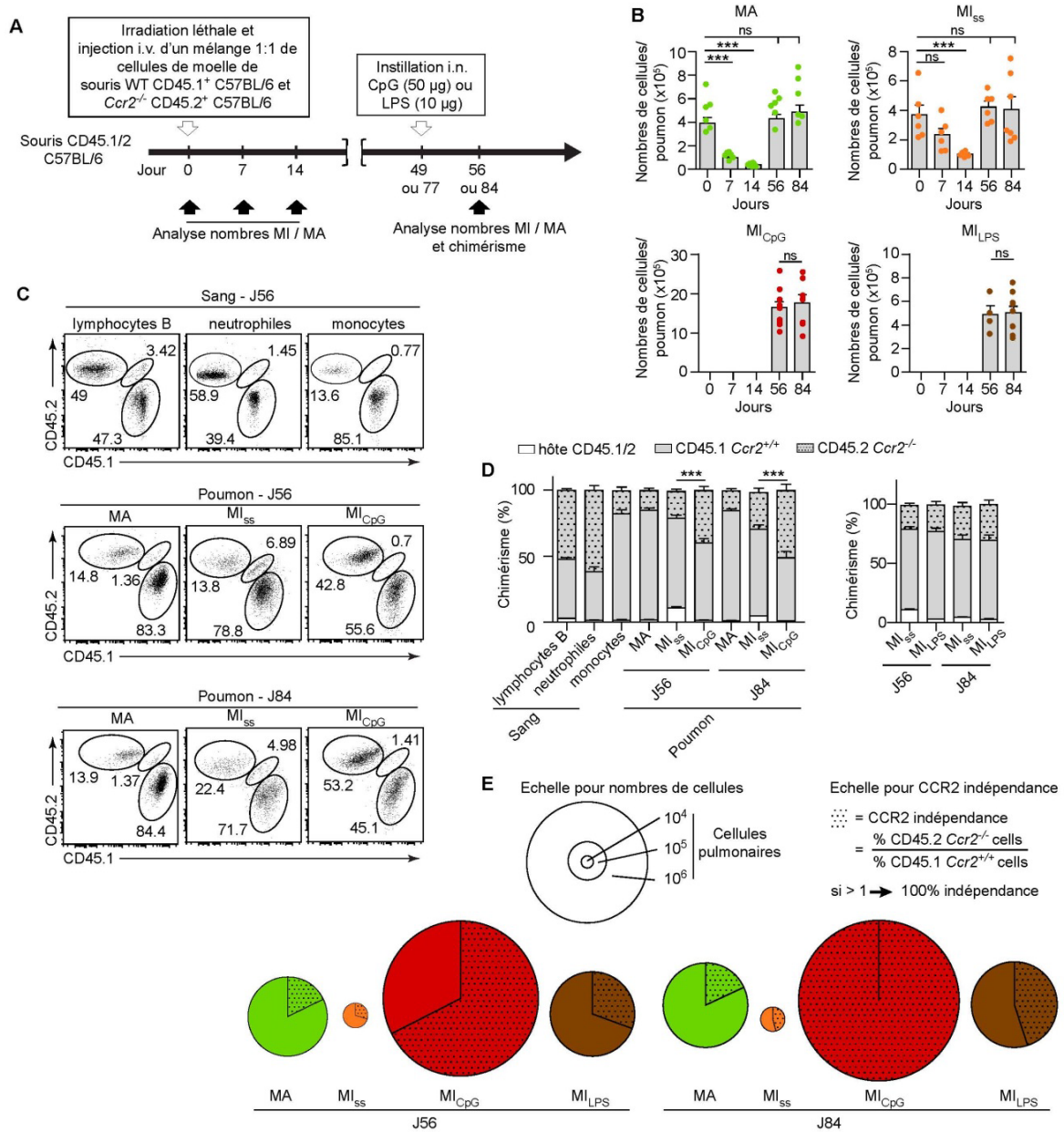
**Figure 27.** Analyse de la prolifération des MI en réponse aux CpG. L'incorporation par les MI d'EdU injecté par voie i.p. 24h avant chaque analyse a été évaluée 0, 1, 2 et 3 jours après traitement i.n. de CpG à des souris WT. Des cellules de moelle ont été utilisées comme contrôles. Les nombres indiquent le pourcentage de cellules EdU<sup>+</sup> et les résultats proviennent d'une souris représentative d'au moins 5 souris issues de 2 expériences indépendantes. J, jour.

Nous avons ensuite investigué l'hypothèse de précurseurs monocytaires CCR2 dépendants et pour cela nous avons quantifié les nombres de  $MI_{CpG}$  dans des souris  $Ccr2^{-/-}$ . De façon étonnante, les nombres de  $MI_{CpG}$  étaient seulement légèrement diminués et de manière non significative dans les souris  $Ccr2^{-/-}$  alors que les nombres de  $MI_{LPS}$  étaient fortement diminués (**figure 28**) supportant l'idée que les  $MI_{CpG}$ , contrairement aux  $MI_{LPS}$ , se développent principalement à partir de monocytes recrutés indépendamment de la moelle.



**Figure 28. Nombres de MI dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> après exposition au LPS ou CpG.** (A,B) Nombres absolus de MI dans des poumons de souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> avant et 7 jours après traitement (A) aux CpG (50 μg) ou au LPS (10 μg). Les données représentent les moyennes +SEM et proviennent de 3 expériences indépendantes groupées (n=12-15 par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; ns, non significatif). J, jour.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de compétition de greffe de moelle dans des souris CD45.1/2 irradiées léthalement puis greffées avec des cellules de moelle WT CD45.1<sup>+</sup> et *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> en quantités égales (**figure 29A**). Huit semaines après la reconstitution, plus de 85% des monocytes sanguins Ly-6C<sup>hi</sup> étaient d'origine WT CD45.1<sup>+</sup> alors que les lymphocytes B et les neutrophiles étaient reconstitués à partir d'autant de cellules WT CD45.1<sup>+</sup> que de cellules *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> (**figure 29C,D**). Huit et 12 semaines après la greffe, les nombres de MA et de MI étaient comparables à ceux obtenus avant irradiation (**figure 29B**) et provenaient principalement de cellules donneuses WT CD45.1<sup>+</sup> (**figure 29C-E**) montrant que la niche déplétée avait été repeuplée par des monocytes classiques CCR2 dépendants après irradiation. Sept jours après traitement aux CpG, une augmentation du nombre de MI a été observée dans les souris chimériques (**figure 29B**) et cette augmentation était associée à un enrichissement important en cellules donneuses *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> à un niveau comparable à celui observé dans les lymphocytes B sanguins, c'est-à-dire 100% de CCR2 indépendance quand les souris ont été analysées 12 semaines après la greffe (**figure 29C-E**). Ces résultats démontrent que les MI<sub>CpG</sub> proviennent de précurseurs CCR2 indépendants. Quand les souris chimériques ont été exposées au LPS, le chimérisme des MI n'a pas été sensiblement affecté et était similaire à celui des monocytes sanguins Ly-6C<sup>hi</sup> (**figure 29C-E**) démontrant que les MI<sub>LPS</sub> proviennent de monocytes classiques dérivés de la moelle.



**Figure 29. Niveau de CCR2 dépendance des MI<sub>CpG</sub> et MI<sub>LPS</sub>.** (A) Chronologie expérimentale. (B) Nombres absolus des populations indiquées de macrophages avant (jour 0, J0) irradiation et 7, 14, 56 et 84 jours après reconstitution de la moelle. (C) Dot plots montrant le pourcentage des cellules dérivées de moelle WT et Ccr2<sup>-/-</sup> et des cellules de l'hôte radiorésistantes dans les différentes populations indiquées. (D) Pourcentages de chimérisme des cellules dérivées de moelle et des cellules de l'hôte radiorésistantes dans les populations cellulaires indiquées. (E) Diagrammes circulaires illustrant la moyenne des nombres absolus (surface) et la CCR2 indépendance (aire hachurée) des populations cellulaires indiquées. (E,F) Les pourcentages de chimérisme et la CCR2 indépendance des lymphocytes B, neutrophiles (i.e., 50% de chimérisme et 100% de CCR2 indépendance) et monocytes (i.e., ≈10% de chimérisme et ≈20% de CCR2 indépendance) sanguins ont été utilisés comme contrôles. Les données (B,D) sont issues d'au moins 2 expériences indépendantes groupées (n=6-15 par groupe) et montrent les moyennes +SEM ou (C) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\*\*\*p<0.001; ns, non significatif). J, jour.

Tous ces résultats supportent le fait que les  $MI_{CpG}$  ne proviennent pas d'une prolifération locale ni d'une différenciation substantielle de monocytes classiques dérivés de la moelle et CCR2 dépendants mais proviennent plutôt de cellules CCR2 indépendantes.

## 6 Les monocytes pulmonaires et spléniques sont les précurseurs des $MI_{CpG}$

### 6.1 Différenciation des $MI_{CpG}$ à partir de monocytes pulmonaires

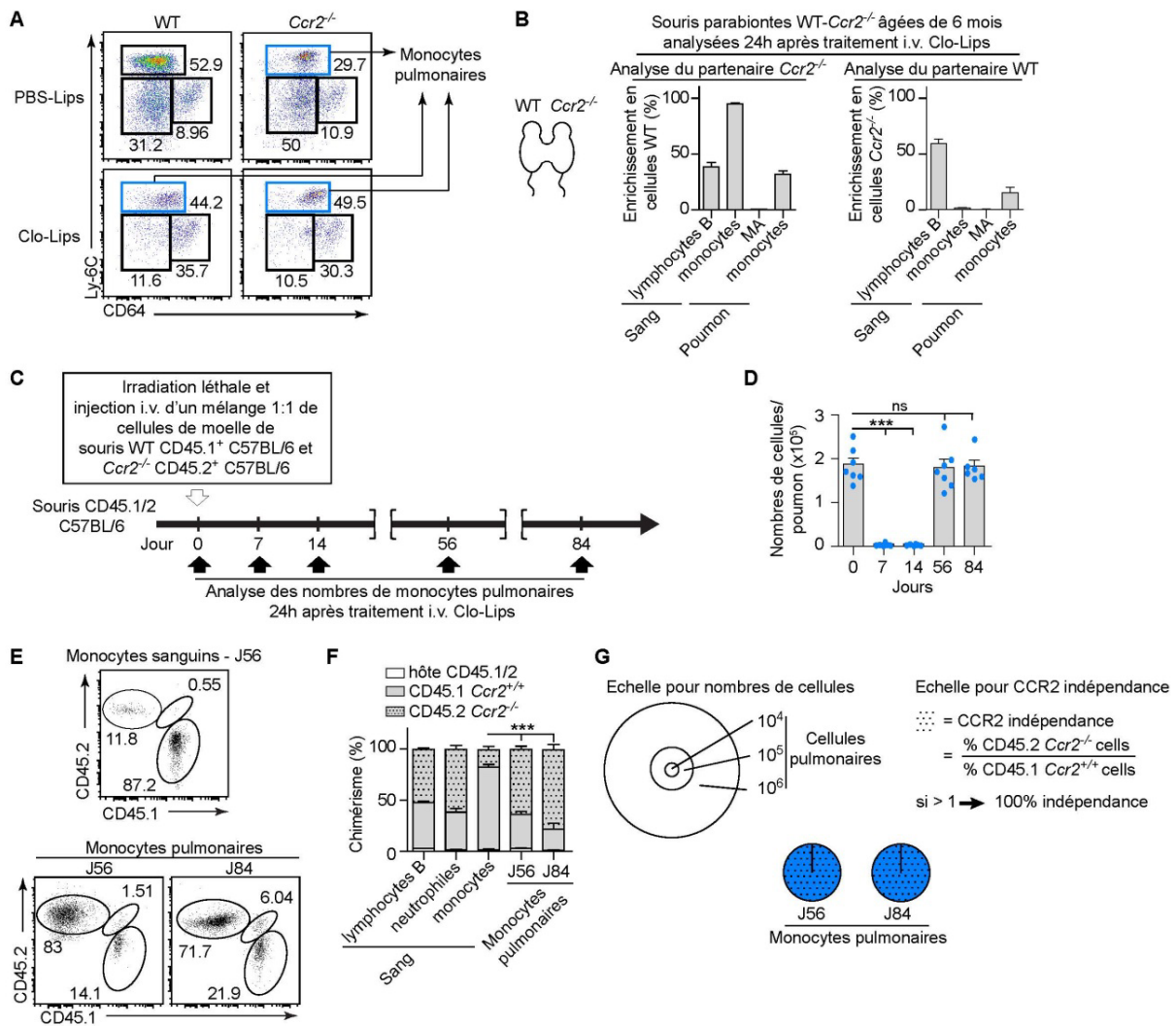
Nous avons identifié des monocytes pulmonaires CCR2 indépendants situés dans le parenchyme pulmonaire (**figure 30A** et **figure 15**). Etant donné que l'expansion des MI en réponse aux CpG était principalement CCR2 indépendante, nous avons émis l'hypothèse que les monocytes pulmonaires pourraient agir comme réservoir local et donner naissance aux  $MI_{CpG}$ .

Tout d'abord, nous avons validé la CCR2 indépendance des monocytes pulmonaires en réalisant des expériences de parabiose et de compétition de greffe de moelle.

Dans les expériences de parabiose, des souris WT  $CD45.1^+$  et  $Ccr2^{-/-}$   $CD45.2^+$  ont été capables d'échanger leur circulation sanguine pendant 6 mois et l'enrichissement en cellules WT et  $Ccr2^{-/-}$  du partenaire dans la souris hôte  $Ccr2^{-/-}$  et WT respectivement a été analysé 24h après une injection i.v. de Clo-Lips. Au niveau des monocytes pulmonaires, un enrichissement comparable en cellules du partenaire a été observé dans les souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  (**figure 30B**) indiquant que ces cellules se régénèrent continuellement à partir de cellules circulantes indépendamment de CCR2.

Dans les expériences de compétition de greffe de moelle, des souris  $CD45.1/2$  ont été irradiées léthalement puis greffées avec des cellules de moelle WT  $CD45.1^+$  et  $Ccr2^{-/-}$   $CD45.2^+$  en quantités égales et les souris ont été analysées 8 et 12 semaines plus tard, 24h après une injection i.v. de Clo-Lips (**figure 30C**). Les nombres de monocytes pulmonaires étaient comparables à ceux obtenus avant irradiation (**figure 30D**) et étaient repeuplés avec des cellules greffées CCR2 indépendantes (**figure 30E-G**) confirmant les résultats obtenus avec les souris parabiontes.

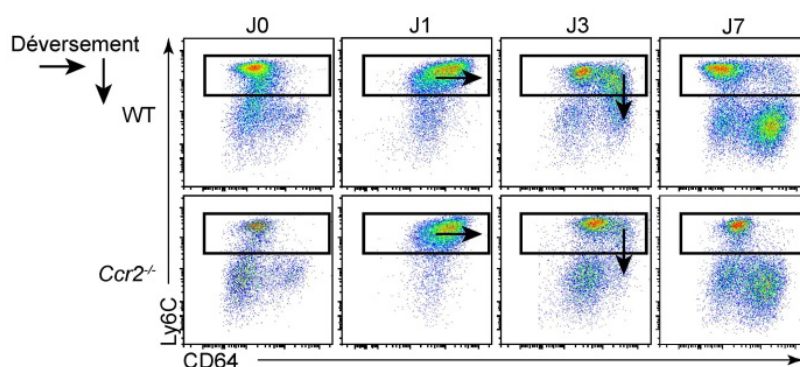




**Figure 30. CCR2 indépendance des monocytes pulmonaires.** (A) Dot plots des monocytes classiques (Ly-6C<sup>hi</sup>), monocytes patrouilleurs (Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup>) et des MI (Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup>) associés au poumon dans les groupes indiqués (même stratégie de gating qu'à la **figure 11A**). Le gate en bleu représente les monocytes pulmonaires et les nombres indiquent les pourcentages de cellules dans chaque population. (B) Analyse de souris parabiontes WT-Ccr2<sup>-/-</sup> âgées de 6 mois 24h après traitement i.v. de Clo-Lips. Le pourcentage d'enrichissement en cellules du partenaire dans chaque hôte est montré. (C) Chronologie expérimentale des données montrées en (D-G). Les souris chimériques ont été analysées au jour 56 et 84, 24h après injection i.v. de Clo-Lips. (D) Nombres absolus des monocytes pulmonaires avant (jour 0, J0) irradiation et 7, 14, 56 et 84 jours après reconstitution de la moelle. (E) Dot plots montrant le pourcentage des cellules dérivées de moelle WT et Ccr2<sup>-/-</sup> et des cellules de l'hôte radiorésistantes dans les différentes populations indiquées. (F) Pourcentages de chimérisme des cellules dérivées de moelle et des cellules de l'hôte radiorésistantes dans les populations cellulaires indiquées. (G) Diagrammes circulaires illustrant la moyenne des nombres absolus (surface) et la CCR2 indépendance (aire hachurée) des populations cellulaires indiquées. (F,G) Les pourcentages de chimérisme et la CCR2 indépendance des lymphocytes B, neutrophiles (i.e., 50% de chimérisme et 100% de CCR2 indépendance) et monocytes (i.e., ≈10% de chimérisme et ≈20% de CCR2 indépendance) sanguins ont été utilisés comme contrôles. Les résultats montrés en (A,E) proviennent d'une souris représentative d'au moins 6 souris issues de 3 expériences indépendantes. Les données montrées en (B,D,F) représentent les moyennes +SEM et proviennent (D,F) d'au moins 2 expériences

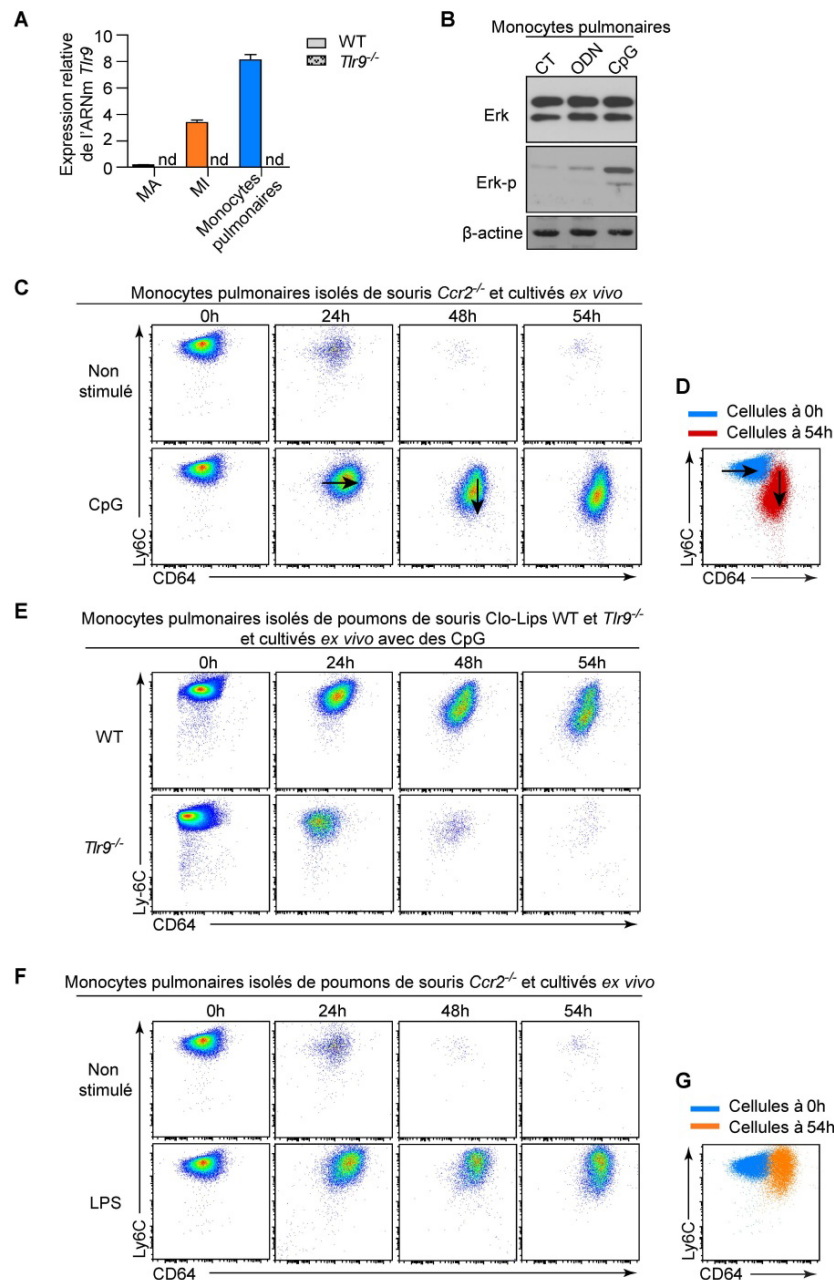
indépendantes groupées ( $n=6-15$  par groupe) ou (B) des données poolées de 2 paires de parabiontes. Les  $p$  value ont été calculées avec une ANOVA à 1 facteur suivie d'un test de Tukey (\*\* $p < 0.001$ ; ns, non significatif). J, jour.

Nos données sont compatibles avec l'idée qu'une relation précurseur - produit pourrait exister entre les monocytes pulmonaires et les  $MI_{CpG}$ . Lorsque nous avons analysé les cinétiques d'apparition des  $MI_{CpG}$  *in vivo*, nous avons observé une différenciation des cellules  $Ly-6C^{hi}CD64^{lo}$  en  $Ly-6C^{lo}CD64^{hi}$  dans des souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  (**figure 31**). Avec l'acquisition progressive du CD64 et la perte subséquente du Ly-6C, les dot plots Ly-6C/CD64 montrent comme un déversement des cellules  $Ly-6C^{hi}CD64^{lo}$  en  $Ly-6C^{lo}CD64^{hi}$ , suggérant que les monocytes pulmonaires pourraient donner naissance aux  $MI_{CpG}$ .



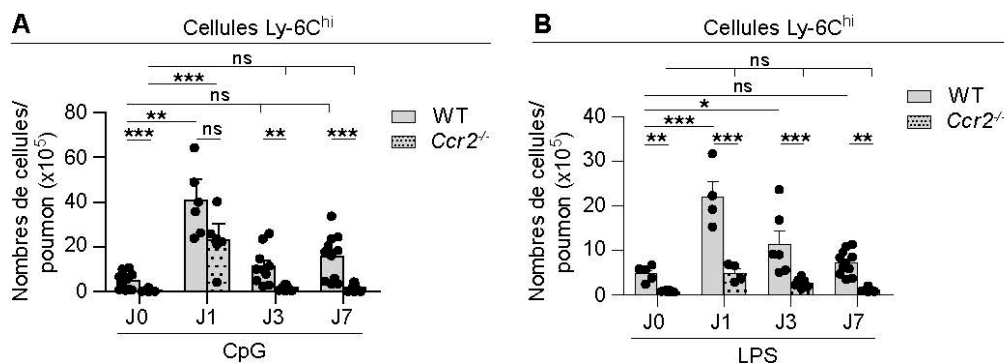
**Figure 31. Cinétique d'apparition des  $MI_{CpG}$  *in vivo*.** Dot plots du profil d'expression Ly-6C/CD64 des cellules  $F4/80^+$  après exclusion des MA et des éosinophiles résidents de poumons de souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  0, 1, 3 et 7 jours après traitement *i.n.* aux CpG indiquant un déversement des cellules  $Ly-6C^{hi}CD64^{lo}$  en  $Ly-6C^{lo}CD64^{hi}$  au cours du temps. Les données proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 3 expériences indépendantes. J, jour.

Nous avons ensuite testé si les monocytes pulmonaires pouvaient répondre aux CpG et se différencier en cellules semblables aux  $MI$  *ex vivo*. Des qRT-PCR ont révélé que les monocytes pulmonaires triés par FACS exprimaient plus fortement le *Tlr9* que les MA ou les  $MI$  (**figure 32A**). De plus, ces cellules étaient capables de répondre aux CpG comme montré par l'augmentation de la phosphorylation des MAP kinases Erk dans ces cellules après exposition aux CpG (**figure 32B**) (Häcker et al., 1999). Le traitement *ex vivo* des monocytes pulmonaires aux CpG a favorisé leur survie et déclenché le même déversement au cours du temps que le traitement *in vivo* (**figure 32C,D**), un phénomène dépendant de TLR9 car il n'a pas été observé suite au traitement aux CpG *ex vivo* de monocytes pulmonaires  $Tlr9^{-/-}$  (**figure 32E**). De plus cette différenciation n'a pas été observée lorsque les monocytes pulmonaires ont été stimulés avec du LPS (**figure 32F**).



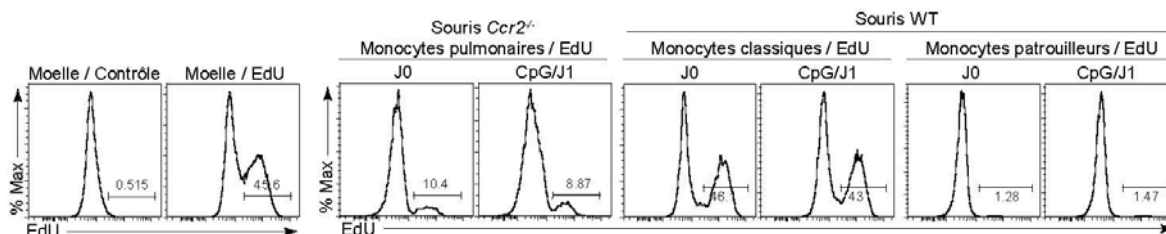
**Figure 32. Différenciation en  $MI_{CpG}$  à partir de monocytes pulmonaires de façon TLR9 dépendante.** (A) Dot plots du profil d'expression Ly-6C/CD64 des cellules  $F4/80^+$  après exclusion des MA et des éosinophiles résidents de poumons de souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  0, 1, 3 et 7 jours après traitement i.n. aux CpG indiquant un déversement des cellules  $Ly-6C^{hi}CD64^{lo}$  en  $Ly-6C^{lo}CD64^{hi}$  au cours du temps. (B) Expression de l'ARNm *Tlr9* dans les MA, MI et monocytes pulmonaires de souris WT et  $Tlr9^{-/-}$ . (C) Western blot de Erk et Erk phosphorylé (Erk-p) dans des monocytes pulmonaires isolés de souris  $Ccr2^{-/-}$  et stimulés ou non (CT) ex vivo avec ODN ou CpG. (D-H) Dot plots de monocytes pulmonaires vivants isolés de souris (D,E,G,H)  $Ccr2^{-/-}$  ou (F) WT et  $Tlr9^{-/-}$  traitées avec des Clo-Lips par voie i.v. et cultivés ex vivo avant et 24, 48 et 54h après stimulation avec (D,E,F) des CpG ou (G,H) du LPS. (E,H) Superposition de dot plots de monocytes pulmonaires vivants cultivés ex vivo avant (0h) et 54h après stimulation avec (E) des CpG ou (H) du LPS. Les données (A,C-H) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 3 expériences indépendantes ou (B) sont issues de 2 expériences indépendantes de tri cellulaire ( $n=4$  par groupe) et montrent les moyennes +SEM. J, jour; CT, contrôle.

La quantité de monocytes pulmonaires présents dans les poumons à l'état basal est cependant trop faible pour générer le pool de  $MI_{CpG}$ . L'analyse du nombre de cellules  $Ly-6C^{hi}$  au cours du temps après exposition i.n. aux CpG a indiqué une forte augmentation le lendemain du traitement dans des souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  (**figure 33A**). Cependant, après traitement au LPS, cette augmentation du nombre de cellules  $Ly-6C^{hi}$  n'a été observée que dans des souris WT et pas dans des souris  $Ccr2^{-/-}$  (**figure 33B**) confirmant que les  $MI_{LPS}$  proviennent de cellules de moelle.



**Figure 33. Nombres de monocytes pulmonaires dans des souris  $Ccr2^{-/-}$  après exposition au LPS ou CpG.** (A,B) Nombres absolus de monocytes pulmonaires dans des poumons de souris WT et  $Ccr2^{-/-}$  avant (J0), 1, 3 et 7 jours après traitement (A) aux CpG (50 µg) ou (B) au LPS (10 µg). Les données représentent les moyennes +SEM et proviennent de 3 expériences indépendantes groupées (n=6-15 par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif). J, jour.

Nous avons donc testé si les monocytes pulmonaires étaient capables de proliférer dans le tissu pulmonaire mais aucune augmentation d'incorporation d'EdU, n'a été détectée dans ces cellules 1 jour après traitement aux CpG (**figure 34**). Ces résultats suggèrent que spécifiquement suite à une stimulation aux CpG, des monocytes CCR2 indépendants additionnels ont été recrutés d'un réservoir distal et se sont différenciés en  $MI_{CpG}$ .



**Figure 34. Analyse de la prolifération des monocytes en réponse aux CpG.** L'incorporation par les monocytes d'EdU injecté par voie i.p. 24h avant chaque analyse a été évaluée 0 et 1 jour après traitement i.n. de CpG à des souris WT ou  $Ccr2^{-/-}$ . Des cellules de moelle ont été utilisées comme contrôles. Les nombres indiquent le pourcentage de cellules  $EdU^+$  et les résultats proviennent d'une souris représentative d'au moins 5 souris issues de 2 expériences indépendantes. J, jour.

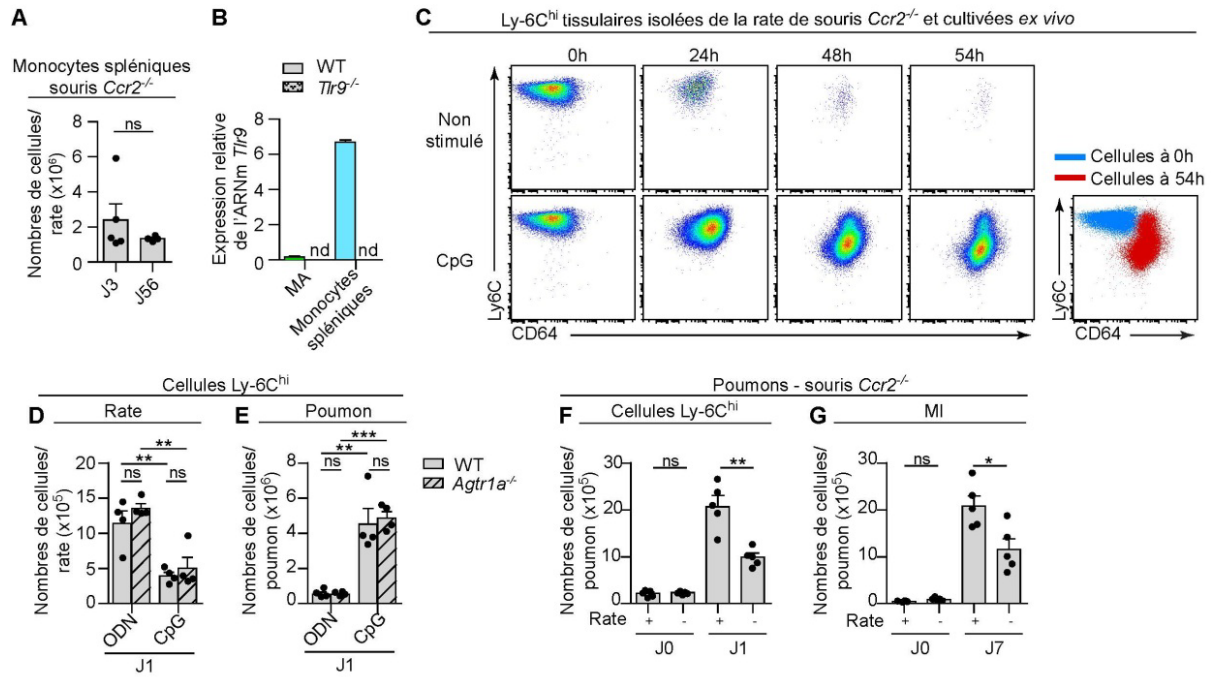
Nos données indiquent donc que suite à une exposition aux CpG, les monocytes pulmonaires ne prolifèrent pas mais peuvent se différencier en  $MI_{CpG}$ . Par ailleurs, le recrutement de monocytes CCR2 indépendants additionnels est nécessaire afin de générer la population importante de  $MI_{CpG}$  obtenue 7 jours après l'exposition aux CpG.

## 6.2 Différenciation des $MI_{CpG}$ à partir de monocytes spléniques

De façon intéressante, la rate a été démontrée comme étant un réservoir de monocytes CCR2 indépendants qui migrent jusqu'aux tissus inflammatoires d'une façon dépendante du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT-1) (Swirski et al., 2009). Ce pool de monocytes pourrait constituer le réservoir distal nécessaire à l'expansion des MI induits par les CpG.

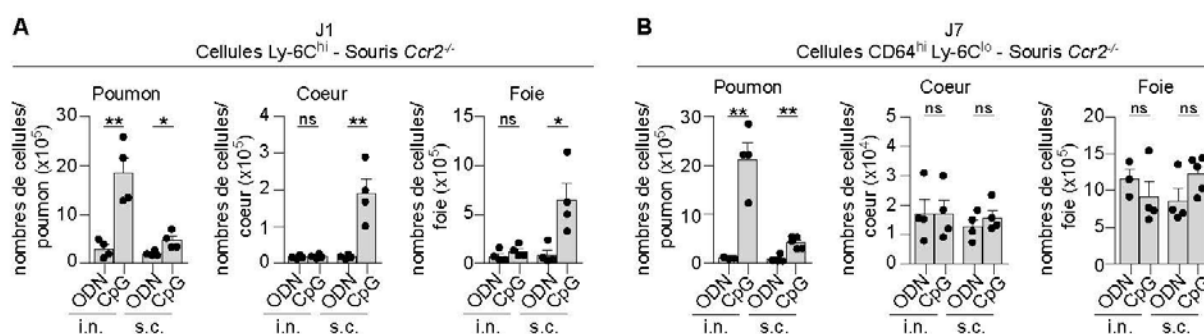
Les monocytes spléniques étaient déjà présents chez des souris âgées de 3 jours (**figure 35A**) et exprimaient de plus grands niveaux de *Tlr9* que les MA (**figure 35B**). Comme pour les monocytes pulmonaires, une stimulation *ex vivo* aux CpG a stimulé leur survie et leur différenciation en cellules semblables aux  $MI_{CpG}$  (**figure 35C**) indiquant qu'ils peuvent répondre aux CpG.

De plus, 1 jour après traitement i.n. aux CpG, les nombres de monocytes spléniques étaient significativement diminués (**figure 35D**), ce qui était associé avec une augmentation en monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> dans les poumons de souris WT ainsi que de souris déficientes pour le récepteur AT-1 (*Agtr1a*<sup>-/-</sup>) (**figure 35E**). Afin d'évaluer la contribution exacte des monocytes spléniques au pool de monocytes pulmonaires et de  $MI_{CpG}$ , nous avons quantifié leurs nombres 1 et 7 jours après traitement aux CpG respectivement dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> splénectomisées. Comme montré à la **figure 35F** et **35G**, les pools de monocytes pulmonaires et de  $MI_{CpG}$  étaient significativement réduits en absence de la rate. Les nombres de MI à l'état basal n'ont quant à eux pas été affectés par la splénectomie (**figure 35G**). La rate constitue donc un réservoir de monocytes qui peuvent peupler le poumon indépendamment d'une signalisation par l'angiotensine et se différencier en  $MI_{CpG}$ .



**Figure 35. Mobilisation de monocytes CCR2 indépendants de la rate et différenciation en  $MI_{CpG}$ .** (A) Nombres absolus de monocytes spléniques à différents temps après la naissance dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup>. (B) Expression de l'ARNm *Tlr9* dans des MA et monocytes spléniques de souris WT et *Tlr9*<sup>-/-</sup>. (C) Dot plots de monocytes spléniques vivants isolés de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> et cultivés *ex vivo* avant et 24, 48 et 54h après stimulation avec des CpG. Panel de droite: superposition de dot plots de monocytes spléniques vivants cultivés *ex vivo* avant (0h) et 54h après stimulation avec des CpG. (D,E) Nombres absolus de monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> dans (D) la rate et (E) le poumon de souris WT et *Agr1a*<sup>-/-</sup> un jour après traitement *i.n.* aux CpG. (F,G) Nombres absolus de (F) monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> ou de (G) MI de souris splénectomisées et de souris contrôles avant et (F) 1 jour ou (G) 7 jours après traitement *i.n.* aux CpG. Les données montrées en (C) proviennent d'une souris représentative d'un groupe d'au moins 6 souris provenant d'au moins 3 expériences indépendantes. Les données en (A,B,D,E,F,G) représentent les moyennes +SEM et (A,B,F,G) proviennent d'au moins 2 expériences indépendantes groupées (n=4-6) ou (D,E) sont issues d'une expérience représentative de 2 expériences indépendantes. Les p value ont été calculées avec une ANOVA (A) à 1 facteur ou (D,E,F,G) à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001; ns, non significatif). J, jour.

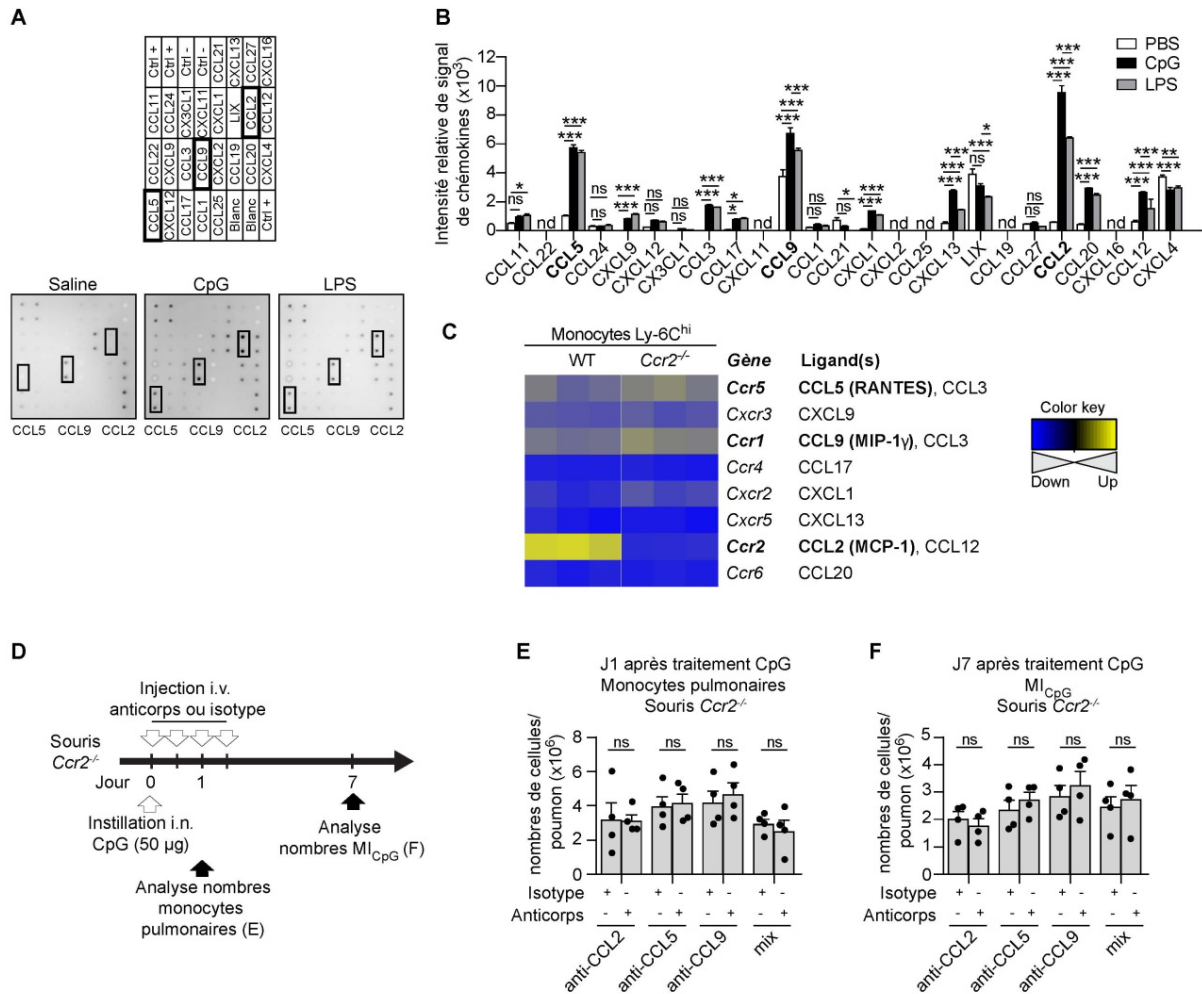
Nous avons également observé que des CpG injectés par voie sous-cutanée à des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> induisent le recrutement de monocytes pas seulement dans le poumon mais aussi dans d'autres organes tels que le cœur et le foie (**figure 36A**). Toutefois, à l'exception du poumon, ce recrutement n'a pas été associé à une augmentation du nombre de macrophages 7 jours plus tard (**figure 36B**). Inversement, l'injection i.n. de CpG à des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> a induit le recrutement de monocytes au niveau du poumon mais pas du cœur ni du foie (**figure 36A**). Ces données suggèrent que les CpG peuvent mobiliser des monocytes CCR2 indépendant mais que seuls des signaux spécifiques du poumon ont dirigé leur migration jusqu'à cet organe et leur différenciation en MI régulateurs.



**Figure 36. Recrutement de monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> et macrophages Ly-6C<sup>lo</sup> CD64<sup>hi</sup> dans divers organes.** (A,B) Nombres absolus de (A) monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> et (B) macrophages Ly-6C<sup>lo</sup> CD64<sup>hi</sup> dans les organes indiqués de souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> (A) un jour et (B) 7 jours après traitement i.n. ou s.c. aux ODN ou CpG. Les données représentent les moyennes +SEM et proviennent de 2 expériences indépendantes (n=3-6 par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; ns, non significatif). J, jour.

Afin d'identifier les chémokines impliquées dans le recrutement des monocytes spléniques, nous avons analysé les chémokines présentes dans des extraits de poumon et découvert que l'instillation de CpG induisait une augmentation de plusieurs chémokines, tout comme le LPS (**figure 37A,B**). Parmi ces chémokines, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) et CCL9 (MIP-1 $\gamma$ ) constituaient les plus abondantes et leur récepteur (i.e. CCR2, CCR5 et CCR1 respectivement) était parmi les plus exprimés sur les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> (**figure 37A-C**). Afin d'évaluer le rôle potentiel de ces chémokines dans le recrutement des monocytes spléniques, nous avons utilisé des anticorps neutralisants *in vivo* (**figure 37D**). L'inhibition individuelle ou combinée de CCL2, CCL5 et CCL9 n'a toutefois pas influencé les nombres de monocytes pulmonaires ni de MI<sub>CpG</sub> dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> 1 jour et 7 jours respectivement après traitement aux CpG (**figure 37E,F**), suggérant que les monocytes spléniques ont été attiré jusqu'au poumon indépendamment de ces signaux.





**Figure 37. Etude de la chémokine responsable de la migration des monocytes spléniques jusqu'aux poumons.** (A,B) Chémokine array réalisé sur des protéines de poumons entiers extraites 8h après traitement i.n. aux CpG de souris WT. (I) Gel représentatif indiquant les signaux détectés; les cadres entourent les chémokines les plus induites. (B) Quantification de l'intensité de signal des chémokines. (C) Heatmap de l'expression de gènes codant pour des récepteurs à chémokines qui sont significativement induites par les CpG en (B). (D) Chronologie expérimentale des expériences de neutralisation de chémokines in vivo montrées en (E,F). (E,F) Nombres absolus de (E) monocytes pulmonaires 1 jour ou (F) MI<sub>CpG</sub> 7 jours après instillation i.n. de CpG à des souris Ccr2<sup>-/-</sup> qui ont reçu par voie i.p. les anticorps indiqués. (B,E,F) Les données représentent les moyennes +SEM et sont issues de 2 expériences indépendantes groupées (n=3-6 par groupe). Les p value ont été calculées avec une ANOVA à 2 facteurs suivie d'un test de Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; ns, non significatif). J, jour; Ctrl, contrôle.

Le traitement aux CpG induit un recrutement de monocytes spléniques CCR2 indépendants au niveau du poumon afin qu'ils se différencient en MI<sub>CpG</sub>.

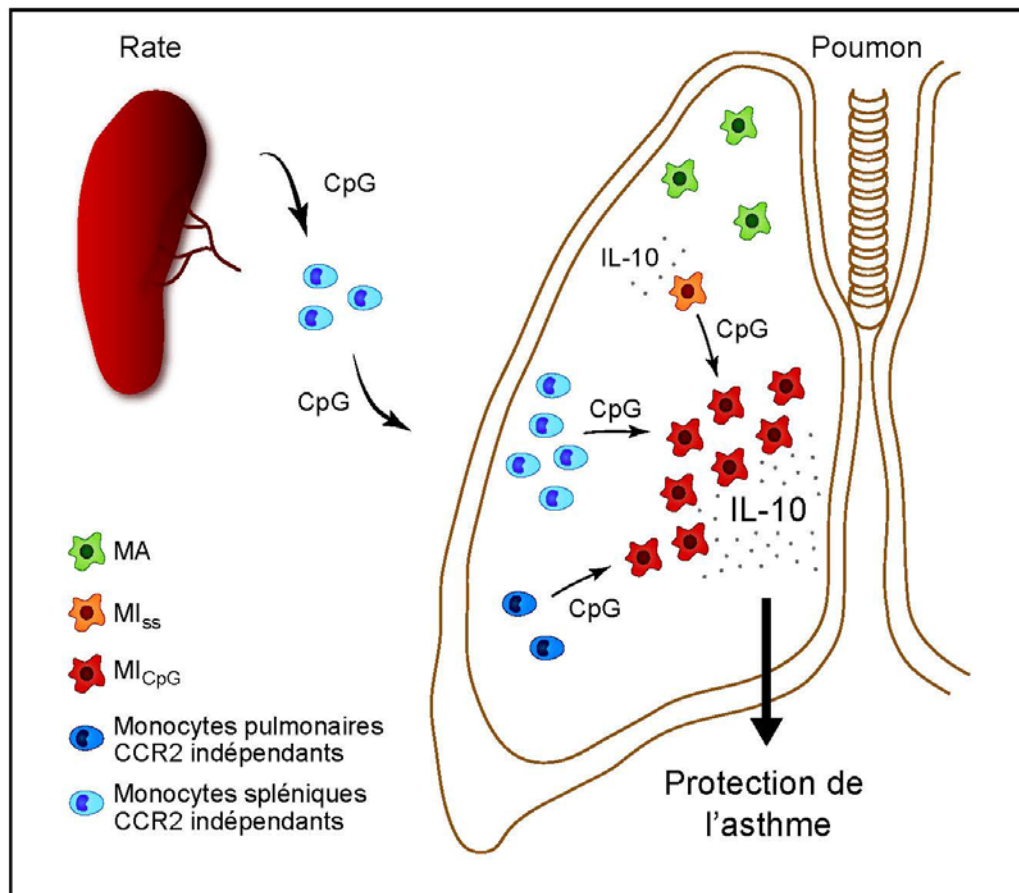
---

# Discussion - Perspectives

---

## Discussion - Perspectives

Nous avons montré dans cette étude qu'un traitement aux CpG chez la souris induit une augmentation importante du nombre de MI aux propriétés hypersuppressives à partir de réservoirs de monocytes pulmonaires et spléniques CCR2 indépendants. Ces MI<sub>CpG</sub> produisent de grandes quantités d'IL-10 qui empêche le développement de l'asthme même lorsque les souris sont sensibilisées et challengées avec de fortes doses d'allergènes (**figure 38**).



**Figure 38.** *Modèle concernant l'origine et la fonction des MI après exposition à des CpG. L'exposition des voies respiratoires aux CpG induit un recrutement de monocytes spléniques CCR2 indépendants jusqu'au poumon. Ces monocytes ainsi que des monocytes pulmonaires CCR2 indépendants se différencient ensuite en MI hypersuppresseurs producteurs de grandes quantités d'IL-10 qui permet une protection à l'encontre de l'asthme allergique.*

La théorie de l'hygiène postule qu'une diminution de l'exposition à des produits bactériens, rencontrée dans un environnement citadin par opposition à un environnement rural, favorise le développement d'allergies. Le LPS est actuellement perçu comme l'agent microbien principalement responsable de la protection conférée par un environnement fermier. En effet, peu de temps après les

premières observations épidémiologiques concernant le potentiel bénéfique d'un cadre agricole pour le développement de l'asthme (Braun-Fahrlander et al., 1999; Riedler et al., 2000, 2001; Von Ehrenstein et al., 2000), la présence de concentrations plus élevées en endotoxines bactériennes dans les maisons d'enfants vivant à la ferme en comparaison aux enfants de familles non agricoles a été mise en évidence (von Mutius et al., 2000). L'exposition à ces endotoxines a ensuite été corrélée à une diminution significative du risque de sensibilisation allergique et d'asthme atopique dans l'enfance (Braun-Fahrlander et al., 2002). D'autres études ont également confirmé une association entre la concentration en endotoxines présente dans la poussière des maisons et une diminution du risque de maladies atopiques, en milieu rural (Böttcher et al., 2003) ou non (Gehring et al., 2002, 2008; Gereda et al., 2000; Sordillo et al., 2010).

Cependant les effets bénéfiques des endotoxines sont controversés. En effet, il a été montré qu'une exposition précoce aux endotoxines protégerait du développement d'allergies mais constituerait un facteur de risque pour une respiration sifflante notamment chez les enfants qui ont une prédisposition familiale à l'asthme ou aux allergies (Celedón et al., 2007; Mendy et al., 2011; Park et al., 2001). De plus, plusieurs études ont montré que le LPS constituerait un facteur de risque pour l'augmentation de la prévalence et la sévérité de l'asthme dans un environnement non rural (Michel et al., 1996; Thorne et al., 2005). L'effet du LPS a également été testé dans des modèles murins d'asthme générant des résultats contradictoires et divergents. En effet, certains modèles ont démontré un effet protecteur du LPS qu'il soit administré avant ou lors de la sensibilisation allergique (Schuijs et al., 2015) ou au moment de la réexposition aux allergènes (Daan de Boer et al., 2013; Gerhold et al., 2002; Hollingsworth et al., 2006; Rodríguez et al., 2003). D'autre part, certaines études ont mis en évidence un effet délétère du LPS ; il serait responsable du développement d'une sensibilisation allergique (Duan et al., 2008; Hammad et al., 2009) et exacerberait l'inflammation des voies aériennes (Murakami et al., 2007). Certains mécanismes responsables des effets anti-allergiques du LPS ont été identifiés dans des modèles animaux. Ainsi le LPS induit l'activation de l'enzyme anti-inflammatoire A20 au niveau des cellules épithéliales diminuant ainsi la production de cytokines par ces cellules (Schuijs et al., 2015), favorise le développement de cellules granulocytaires suppressives au niveau du poumon (Arora et al., 2010), et stimule la production d'IL-10 par les MI (Bedoret et al., 2009). Tous ces mécanismes convergent vers une inhibition des CD<sub>4</sub> pulmonaires afin de supprimer la réponse allergique Th<sub>2</sub>. Cependant, le LPS est également requis pour induire une sensibilisation allergique à l'encontre d'un antigène inhalé inerte (Eisenbarth et al., 2002) et toutes les souris développent une inflammation éosinophilique sévère des voies aériennes dépendante du TLR4 lorsqu'elles sont sensibilisées et challengées avec de grandes quantités de HDM riche en LPS (Hammad et al., 2009).

Toutes ces observations supportent l'idée que d'autres PAMPs sont impliqués dans la prévention de l'allergie des voies respiratoires lorsque les surfaces mucoales sont exposées à de fortes doses de produits microbiens.

Les CpG sont également présents en grandes quantités dans la poussière des maisons rurales (Roy et al., 2003) et contrairement au LPS ont toujours démontré des effets immunomodulateurs protecteurs à l'encontre de l'asthme (Fonseca and Kline, 2009). Dans cette étude, nous avons montré que la population de MI augmente substantiellement en réponse aux CpG. Les  $MI_{CpG}$  sont en moyenne 42 fois plus nombreux que les  $MI_{SS}$  et leur production d'IL-10 est également fortement augmentée car nous avons observé une production d'IL-10 environ 550 fois plus importante. Le LPS induit également une augmentation du nombre de MI mais nettement moindre (i.e. environ 12 fois) et contrairement aux CpG, cette augmentation n'est pas associée à une transition vers un profil hypersuppresseur car la quantité d'IL-10 produite n'est globalement pas modifiée. Le phénotype des  $MI_{LPS}$  est d'ailleurs fort semblable à celui des  $MI_{SS}$  au contraire de celui des  $MI_{CpG}$  qui expriment plus fortement les marqueurs de surface CD11b et CD115 tandis que certains marqueurs sont moins exprimés.

Cette capacité régulatrice augmentée des  $MI_{CpG}$  est associée à une protection contre la sensibilisation et l'exacerbation de l'asthme dans des modèles expérimentaux d'asthme où la capacité régulatrice des  $MI_{SS}$  était dépassée. L'utilisation de transferts adoptifs de  $MI_{CpG}$  WT ou *Il-10*<sup>-/-</sup> et de souris *Tlr9*<sup>-/-</sup> dans lesquelles l'expansion de  $MI_{CpG}$  était abolie a révélé que les  $MI_{CpG}$  sont nécessaires mais également suffisants pour induire les effets protecteurs des CpG via la production d'IL-10.

Le mécanisme d'action le plus communément accepté des CpG serait la réorientation de la réponse immune Th2 allergique vers une réponse Th1 ou Treg (Broide et al., 1998; Campbell et al., 2014; Jain et al., 2002; Kline et al., 1998, 2002; Simons et al., 2004; Sur et al., 1999; Tulic et al., 2004). Ce modèle est d'ailleurs en accord avec la durée de la protection des CpG car plusieurs études ont mis en évidence que les effets anti-allergiques des CpG persistent longtemps après le traitement que ce soit dans des modèles animaux ou chez l'homme (Beeh et al., 2013; Campbell et al., 2014; Creticos et al., 2006; Simons et al., 2004; Sur et al., 1999; Tulic et al., 2004). Cependant, il est maintenant connu que les CpG exercent le même effet immunosuppresseur en absence de l'allergène (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998, 2001; Klimek et al., 2011; Sur et al., 1999). La protection à long terme des CpG ne requerrait donc pas une action directe sur le système adaptatif. Nos résultats confirment l'action indépendante des CpG vis-à-vis de l'allergène pour protéger de l'asthme. Nous avons également observé que le nombre de  $MI_{CpG}$  restait élevé jusqu'à 8 semaines après l'administration des CpG suggérant que l'effet long terme des CpG peut être attribué aux  $MI_{CpG}$ , en accord avec une étude mettant en évidence des modifications épigénétiques dans les macrophages induites par les CpG (Ostuni et al., 2013).

De plus, bien que les CpG soient généralement injecté par voie sous-cutanée dans les tests cliniques, l'augmentation du pool de MI pourrait également être à l'origine de la capacité des CpG à diminuer les réactions asthmatiques chez l'homme (Beeh et al., 2013; Krieg, 2012). Nous avons en effet montré que l'injection sous-cutanée de CpG à des souris augmente également significativement le nombre de MI.

A l'état basal, les MI fonctionnent en inhibant la maturation et la migration des CD<sub>s</sub> pulmonaires (Bedoret et al., 2009) essentielles au développement et à la restimulation des lymphocytes Th2. Comme nos résultats montrent une diminution de l'activation des CD<sub>s</sub> suite à un traitement aux CpG de souris WT exposées au HDM, au contraire des CD<sub>s</sub> *Tlr9*<sup>-/-</sup> ayant subi le même traitement, il est raisonnable de penser que les CpG renforcent durablement la capacité des MI à contrôler l'activation des CD<sub>s</sub> et permettent donc de rompre le lien entre l'immunité innée et adaptative.

Les données que nous avons obtenues permettent donc d'expliquer l'efficacité des CpG dans le traitement et la prévention de l'asthme. De plus, elles fournissent également un mécanisme par lequel la poussière de ferme, qui est riche en ADN bactérien, protège du développement de l'asthme, apportant ainsi une explication mécanistique à la théorie de l'hygiène.

L'ontogénie des macrophages a été fortement revisitée ces dernières années. Le dogme basé sur le modèle MPS selon lequel les monocytes sanguins classiques CCR2 dépendants constitueraient un intermédiaire obligatoire à la différenciation en macrophages lorsque ceux-ci pénétreraient dans les tissus périphériques (van Furth and Cohn, 1968) a en effet été remis en question assez récemment. A l'exception des macrophages du derme, du cœur et de l'intestin dont plusieurs études ont démontré leur origine monocyttaire en accord avec ce modèle (Bain et al., 2014; Epelman et al., 2014b; Molawi et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013), de nombreuses études ont démontré qu'en conditions basales, les macrophages tissulaires ne se différencient pas à partir de monocytes sanguins circulant mais dérivent d'un progéniteur embryonnaire et se renouvellent par prolifération au sein du tissu où ils sont localisés (Ginhoux et al., 2010; Williams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Schulz et al., 2012; Yona et al., 2013). Nos données indiquent que les MI sont présents dans les poumons dès la naissance (i.e. chez des souris âgées de 3 jours) et leur nombre reste constant dans des souris WT. Bien que les MI soient présent en nombres comparables dans des souris WT et *Ccr2*<sup>-/-</sup> à 6 semaines, leurs nombres diminuent au cours du temps dans les souris dépourvues de monocytes classiques. Ces données ainsi que les résultats de parabiose supportent le fait que les MI seraient maintenus chez l'adulte, au moins en partie, par des monocytes classiques circulants, comme une étude l'a récemment suggéré (Tan and Krasnow, 2016). Les macrophages régulateurs du poumon posséderaient donc la même origine que les macrophages intestinaux qui préviennent également du développement de réponses immunes aberrantes, démontrant une origine commune (i.e. à partir de monocytes sanguins) pour les macrophages régulateurs et producteurs d'IL-10.

Lors d'une inflammation, l'origine et le renouvellement des macrophages peuvent être légèrement modifiés. Ainsi plusieurs études ont montré que suite à un stress tissulaire, les macrophages peuvent dériver d'une prolifération locale ou se repeupler à partir de monocytes sanguins classiques CCR2 dépendants en fonction du tissu et du stress engendré (Lavin et al., 2015; Sieweke and Allen, 2013). Des expériences d'évaluation de l'incorporation d'EdU et d'induction de MI<sub>CpG</sub> dans des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> n'ont respectivement indiqué aucune prolifération des macrophages après

exposition aux CpG ainsi qu'une CCR2 indépendance des  $MI_{CpG}$ . Nos résultats obtenus avec les expériences réalisées sur des souris *Ccr2*<sup>-/-</sup> ou traitées au clodronates ainsi qu'avec des souris chimériques, parabiontes et splénectomisées évoquent plutôt une nouvelle origine inattendue. Dans ce nouveau modèle, lors d'une stimulation aux CpG, la majorité des  $MI_{CpG}$  induits par le traitement dériveraient d'un réservoir de monocytes CCR2 indépendants localisés au niveau du poumon et de la rate. Les CpG exercent dans ce modèle diverses fonctions. Tout d'abord, ils induisent la mobilisation du réservoir de monocytes spléniques jusqu'au poumon d'une façon indépendante de MCP-1, RANTES et MIP-1 $\gamma$ . Ensuite, ils permettent la différenciation de ces monocytes recrutés mais également des monocytes pulmonaires CCR2 indépendants en MI aux propriétés hypersuppressives. Ce nouveau modèle représente donc une troisième origine possible, jamais envisagée auparavant, pour des macrophages tissulaires.

Dans cette étude, les CpG et le LPS ont démontré des effets distincts sur le recrutement de monocytes jusqu'au poumon ainsi que sur leur différenciation en MI supresseurs. En effet, les CpG induisent une mobilisation de monocytes de la rate (i.e. réservoir CCR2 indépendant) alors que le LPS favorise un recrutement de cellules de la moelle (i.e. réservoir CCR2 dépendant). Ensuite, les CpG agissent directement sur les monocytes *in vitro* afin de déclencher leur différenciation en macrophages tandis qu'une exposition au LPS ne permet pas ce phénomène. Les CpG induisent également une forte expansion du pool de MI, nettement supérieure au LPS, et modifient le phénotype de surface des MI, y compris des MI qui sont déjà présent dans le poumon à l'état basal comme illustré par l'augmentation uniforme de l'expression de CD11b à la surface des MI suite au traitement aux CpG. Enfin, le traitement aux CpG permet une augmentation remarquable de la capacité des MI à induire de l'IL-10 au contraire du LPS pour lequel le profil hypersuppresseur n'était pas aussi marqué.

Ces différences pourraient s'expliquer par les voies de signalisation distinctes empruntées par les CpG et le LPS. En effet, comme les CpG et le LPS sont connus pour interagir via des TLRs distincts, le TLR9 et le TLR4 respectivement, qui possèdent des niveaux d'expression différents sur des cellules structurales et immunes différentes, il est fort probable que ces deux PAMPs induisent des réponses biologiques distinctes dans la rate, la moelle et le poumon ainsi que sur les monocytes, créant un microenvironnement spécifique qui façonne l'origine, la différenciation et la fonction des MI.

Une question intrigante est de savoir pourquoi la taille et les propriétés régulatrices de la population de MI sont exclusivement régulées par les CpG. Les CpG sont stable dans l'environnement et sont présents à la fois dans les bactéries Gram-négatives et Gram-positives au contraire du LPS qu'on ne trouve que dans les bactéries Gram-négatives. On pourrait dès lors supposer les CpG reflètent de façon plus exacte l'abondance des bactéries environnementales que d'autres produits bactériens tel que le LPS, fournissant ainsi un outil fiable pour adapter la taille de la population de MI en fonction de la charge bactérienne environnementale sans devoir intégrer de multiples signaux. Une autre explication possible pour le rôle important des CpG pour la régulation des MI est basée sur

l'observation de la toxicité de l'inhalation de CpG pour les souris en absence d'IL-10. En effet, une mortalité non négligeable des souris déficientes en IL-10 (i.e. taux de mortalité variant de 40 à 60% pour les souris *Il-10<sup>-/-</sup>* injectées aux CpG au contraire des souris WT) est observée après administration de CpG. On pourrait dès lors envisager que la taille de la population de MI doit s'adapter au niveau de CpG environnemental afin de maintenir l'homéostasie pulmonaire et de prévenir une inflammation induite par les CpG. Le corollaire de cette hypothèse étant que les réponses immunes concomitantes, telles que les réactions allergiques Th2, sont diminuées dans un environnement riche en CpG.

Nous avons identifié une population de monocytes pulmonaires localisés dans le tissu pulmonaire correspondant phénotypiquement aux monocytes tissulaires observés précédemment par Jakubzick et ses collaborateurs (Jakubzick et al., 2013). Comme nos expériences réalisées sur des souris *Ccr2<sup>-/-</sup>* ainsi que les expériences de parabiose et de greffe de moelle compétitive ont révélé la CCR2 indépendance de ces cellules, il était fort probable qu'elles soient différentes des monocytes classiques CCR2 dépendants. Cependant, l'analyse microarray des deux types cellulaires a révélé des transcriptomes indistinguables indiquant que le réservoir de monocytes pulmonaires est en fait constitué de monocytes classiques. Nos résultats montrent que ces monocytes sont présents dès la naissance (i.e. chez des souris âgées de 3 jours) et les expériences de parabiose indiquent que chez la souris adulte, ces monocytes pulmonaires sont maintenus par des cellules provenant de la circulation de souris *Ccr2<sup>-/-</sup>*.

Les monocytes de la rate sont localisés dans le tissu splénique et sont présents en nombres similaires dans des souris WT et *Ccr2<sup>-/-</sup>* (Swirski et al., 2009). Ces monocytes possèdent également un transcriptome identique à celui des monocytes classiques (Swirski et al., 2009) et sont présents chez des souris âgées de 3 jours.

Nous pouvons dès lors envisager qu'une population de monocytes classiques Ly-6C<sup>hi</sup> serait produite au niveau d'un site d'hématopoïèse définitive, peut-être la moelle osseuse, et serait ensuite libérée dans la circulation sanguine par des mécanismes qui ne dépendent pas de CCR2. Ces monocytes CCR2 indépendants constituent ensuite les réservoirs de monocytes pulmonaires et spléniques. Ainsi, bien que les monocytes classiques dépendent de CCR2 pour sortir de la moelle (Serbina and Pamer, 2006), nos résultats suggèrent qu'une fraction de monocytes classiques pourrait sortir de la moelle d'une façon CCR2 indépendante afin d'aller constituer les réservoirs de monocytes pulmonaires et spléniques.

Par ailleurs, une étude a mis en évidence, en conditions inflammatoires, une hématopoïèse extramédullaire générant des monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> au niveau de la rate (Robbins et al., 2012). Il n'est donc pas exclu que l'exposition aux CpG pourrait contribuer à la formation du pool de monocytes spléniques CCR2 indépendants.

Lors d'un infarctus du myocarde, le pool de monocytes splénique est mobilisé d'une façon dépendante du récepteur AT-1 (Swirski et al., 2009). Cependant le recrutement de monocytes au



niveau du poumon après traitement aux CpG est complètement indépendant de la voie de signalisation d'AT-1 comme en attestent nos expériences de nombres absolus réalisées dans des souris *Agtr1a*<sup>-/-</sup> après traitement aux CpG. Nos expériences utilisant des anticorps neutralisants dirigés contre les chémokines les plus abondantes au niveau du poumon suite à une exposition aux CpG (i.e. CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) and CCL9 (MIP-1 $\gamma$ )) et dont les récepteurs étaient exprimés par les monocytes Ly-6C<sup>hi</sup> (i.e., CCR2, CCR5 and CCR1) indiquent que les monocytes spléniques sont attirés jusqu'au poumon indépendamment de ces signaux également. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin d'identifier le réseau de chémokines et récepteurs impliqués dans la migration de ces cellules.

L'administration de CpG par voie s.c. induit un recrutement de monocytes au niveau du poumon mais également au niveau du cœur et du foie. Cependant, la transformation en MI n'est observée que dans le poumon suggérant que les CpG ont des effets systémiques qui favorisent la libération de monocytes de la rate mais que des signaux spécifiques au poumon permettent leur différenciation en macrophages producteurs d'IL-10. Par ailleurs, une injection locale de CpG (i.e. par voie i.n.) n'induit pas de recrutement de monocytes au niveau du cœur et du foie mais uniquement au niveau du poumon, suggérant que l'injection locale au niveau des voies aériennes faciliterait la libération de chémokines spécifiques qui favorisent le recrutement de monocytes spléniques et leur différenciation en MI. Ces données suggèrent que les CpG peuvent mobiliser des monocytes CCR2 indépendants mais que des signaux additionnels spécifiques au poumon dirigent leur migration jusqu'à cet organe ainsi que leur différenciation en MI régulateurs.

Il a été suggéré que les propriétés anti-allergiques des CpG pouvaient être médiées par les pDCs (Krieg, 2006). Ces cellules sont effet connues pour exprimer le TLR9 mais également pour jouer un rôle clé dans la prévention de l'asthme expérimental en induisant la différenciation de Treg (de Heer et al., 2004). Cependant, une étude a montré que le TLR9 n'est pas exprimé par les pDCs du poumon, au contraire des autres sous-populations de pDCs localisées dans d'autres organes (Chen et al., 2006). Comme ces cellules n'expriment pas le TLR9, elles ne peuvent pas être responsables du rôle des CpG dans la régulation de la réponse immune au niveau du poumon. Nous avons montré dans cette étude que les monocytes pulmonaires et spléniques expriment le TLR9 et que ce dernier est requis pour la différenciation des monocytes CCR2 indépendant en MI après stimulation aux CpG. Cette étude identifie donc ces monocytes comme les cellules exprimant le TLR9 et qui médient les effets immunomodulateurs du poumon.

Bien que le TLR9 soit exprimé par les pDCs, les CD<sup>s</sup> myéloïdes, les lymphocytes B et les monocytes chez la souris, il est principalement exprimé par les pDCs et les lymphocytes B chez l'homme (Krieg, 2006). Il a cependant été démontré que les MI présents chez l'homme expriment le TLR9 et sont capables d'augmenter leur production d'IL-10 suite à une stimulation bactérienne (Hoppstädter et al., 2010). Cela suggère que les découvertes que nous avons obtenues dans cette étude

chez la souris pourraient également être applicables chez l'homme. De plus, des polymorphismes dans la région du promoteur du TLR9 ont été associés à une augmentation du risque de développement de l'asthme (Lazarus et al., 2003; Smit et al., 2009), supportant l'idée que les CpG environnementaux exercent un rôle protecteur chez l'homme et que la perte du TLR9 fonctionnel au niveau des MI de l'homme pourrait contribuer au développement de l'asthme.

Nous avons également observé qu'une petite partie de la population de MI<sub>CpG</sub> était présente au niveau du LLBA. Dans la suite de nos recherches, nous comptons étudier et caractériser les différentes populations cellulaires présentes dans des LLBA humains afin de tester l'applicabilité de notre étude chez l'homme.

En conclusion, notre étude montre que lors d'une exposition aux CpG, les MI, contrairement aux autres macrophages qui proviennent soit d'un progéniteur embryonnaire soit de monocytes classiques, augmentent leur nombre à partir de précurseurs monocytaires CCR2 indépendants jamais identifiés auparavant, ce qui représente une troisième origine possible pour les macrophages tissulaires. Ces réservoirs de monocytes CCR2 indépendants sont localisés au niveau du poumon et de la rate et utilisent le TLR9 afin de spécifiquement détecter les CpG bactériens et se différencier massivement en MI aux propriétés anti-allergiques renforcées. Ces découvertes fournissent une explication mécanistique possible à l'hypothèse de l'hygiène ainsi qu'aux effets protecteurs des CpG synthétiques dans les modèles expérimentaux animaux et les essais cliniques. De plus elles renforcent l'idée que des stratégies thérapeutiques impliquant les MI pourraient aider à contrôler l'asthme. Dans cette optique, la suite de ce projet sera basée sur l'application thérapeutique de nos résultats. Nous aimerions en effet développer une stratégie de thérapie cellulaire dans laquelle des macrophages régulateurs, différenciés *ex vivo* à partir de monocytes cultivés en présence de CpG, seraient injectés à des patients asthmatiques. Cette stratégie de thérapie cellulaire pourrait également être appliquée à d'autres maladies pulmonaires inflammatoires chroniques telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive.

---

# Bibliographie

---

## Bibliographie

Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W., and Rossi, F.M.V. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* *10*, 1538–1543.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* *2*, 725–731.

Akbari, O., Freeman, G.J., Meyer, E.H., Greenfield, E.A., Chang, T.T., Sharpe, A.H., Berry, G., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2002). Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* *8*, 1024–1032.

Akbari, O., Stock, P., Meyer, E., Kronenberg, M., Sidobre, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., Grusby, M.J., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* *9*, 582–588.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.

Andrade, E.B., Alves, J., Madureira, P., Oliveira, L., Ribeiro, A., Cordeiro-da-Silva, A., Correia-Neves, M., Trieu-Cuot, P., and Ferreira, P. (2013). TLR2-induced IL-10 production impairs neutrophil recruitment to infected tissues during neonatal bacterial sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 4759–4768.

Arora, M., Poe, S.L., Oriss, T.B., Krishnamoorthy, N., Yarlagadda, M., Wenzel, S.E., Billiar, T.R., Ray, A., and Ray, P. (2010). TLR4/MyD88-induced CD11b+Gr-1 int F4/80+ non-migratory myeloid cells suppress Th2 effector function in the lung. *Mucosal Immunol.* *3*, 578–593.

Aryan, Z., Holgate, S.T., Radzioch, D., and Rezaei, N. (2014). A new era of targeting the ancient gatekeepers of the immune system: toll-like agonists in the treatment of allergic rhinitis and asthma. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *164*, 46–63.

Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2009). MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* *326*, 867–871.

Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* *15*, 929–937.

Barrenschee, M., Lex, D., and Uhlig, S. (2010). Effects of the TLR2 Agonists MALP-2 and Pam3Cys in Isolated Mouse Lungs. *PLoS ONE* *5*.

Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* *119*, 3723–3738.

Beeh, K.-M., Kanniss, F., Wagner, F., Schilder, C., Naudts, I., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Stocker, H., Mueller, P., Bachmann, M.F., et al. (2013). The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *131*, 866–874.

Bernstein, D.I. (2008). ABCs of Asthma. *Clin. Cornerstone* *8*, 9–25.

- Beutler, B., and Rietschel, E.T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 169–176.
- Blumenthal, R.L., Campbell, D.E., Hwang, P., DeKruyff, R.H., Frankel, L.R., and Umetsu, D.T. (2001). Human alveolar macrophages induce functional inactivation in antigen-specific CD4 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *107*, 258–264.
- Böttcher, M.F., Björkstén, B., Gustafson, S., Voor, T., and Jenmalm, M.C. (2003). Endotoxin levels in Estonian and Swedish house dust and atopy in infancy. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *33*, 295–300.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 3165–3176.
- Bradding, P., Walls, A.F., and Holgate, S.T. (2006). The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, 1277–1284.
- Braman, S.S. (2006). The global burden of asthma. *Chest* *130*, 4S–12S.
- Braun-Fahrländer, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F.H., Varonier, H.S., Vuille, J.C., and Wüthrich, B. (1999). Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *29*, 28–34.
- Braun-Fahrländer, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., et al. (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* *347*, 869–877.
- Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M.D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E.W., and Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 7054–7062.
- Broide, D.H., Stachnick, G., Castaneda, D., Nayar, J., Miller, M., Cho, J.Y., Roman, M., Zubeldia, J., Hayashi, T., Raz, E., et al. (2001). Systemic administration of immunostimulatory DNA sequences mediates reversible inhibition of Th2 responses in a mouse model of asthma. *J. Clin. Immunol.* *21*, 175–182.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S.-H., Colombo, M.P., Frey, A.B., Greten, T.F., Mandruzzato, S., Murray, P.J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., et al. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat. Commun.* *7*, 12150.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C. (2015). Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu. Rev. Immunol.* *33*, 257–290.
- Burke, H., Leonardi-Bee, J., Hashim, A., Pine-Abata, H., Chen, Y., Cook, D.G., Britton, J.R., and McKeever, T.M. (2012). Prenatal and passive smoke exposure and incidence of asthma and wheeze: systematic review and meta-analysis. *Pediatrics* *129*, 735–744.
- Burnet, F.M. (1959). *The clonal selection theory of acquired immunity.* (Nashville,: Vanderbilt University Press,).
- Busse, W.W., and Rosenwasser, L.J. (2003). Mechanisms of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, S799-804.

- Busse, W.W., Lemanske, R.F., and Gern, J.E. (2010). Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations. *Lancet Lond. Engl.* *376*, 826–834.
- Campbell, J.D., Kell, S.A., Kozy, H.M., Lum, J.A., Sweetwood, R., Chu, M., Cunningham, C.R., Salamon, H., Lloyd, C.M., Coffman, R.L., et al. (2014). A limited CpG-containing oligodeoxynucleotide therapy regimen induces sustained suppression of allergic airway inflammation in mice. *Thorax thoraxjnl-2013-204605*.
- Celedón, J.C., Milton, D.K., Ramsey, C.D., Litonjua, A.A., Ryan, L., Platts-Mills, T.A.E., and Gold, D.R. (2007). Exposure to dust mite allergen and endotoxin in early life and asthma and atopy in childhood. *J. Allergy Clin. Immunol.* *120*, 144–149.
- Chang, H.-C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.-N., Han, L., et al. (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat. Immunol.* *11*, 527–534.
- Chen, H., Wu, S., Lu, R., Zhang, Y., Zheng, Y., and Sun, J. (2014). Pulmonary permeability assessed by fluorescent-labeled dextran instilled intranasally into mice with LPS-induced acute lung injury. *PLoS One* *9*, e101925.
- Chen, L., Arora, M., Yarlagadda, M., Oriss, T.B., Krishnamoorthy, N., Ray, A., and Ray, P. (2006). Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 2373–2383.
- Chen, Y.-G., Zhang, Y., Deng, L.-Q., Chen, H., Zhang, Y.-J., Zhou, N.-J., Yuan, K., Yu, L.-Z., Xiong, Z.-H., Gui, X.-M., et al. (2016). Control of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Pneumonia Utilizing TLR2 Agonist Pam3CSK4. *PLoS One* *11*, e0149233.
- Cho, J.Y., Miller, M., McElwain, K., McElwain, S., Shim, J.Y., Raz, E., and Broide, D.H. (2006). Remodeling associated expression of matrix metalloproteinase 9 but not tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in airway epithelium: modulation by immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* *117*, 618–625.
- Chow, A., Brown, B.D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 788–798.
- Coban, C., Igari, Y., Yagi, M., Reimer, T., Koyama, S., Aoshi, T., Ohata, K., Tsukui, T., Takeshita, F., Sakurai, K., et al. (2010). Immunogenicity of whole-parasite vaccines against *Plasmodium falciparum* involves malarial hemozoin and host TLR9. *Cell Host Microbe* *7*, 50–61.
- Cochez, P.M., Michiels, C., Hendrickx, E., Van Belle, A.B., Lemaire, M.M., Dauguet, N., Warnier, G., de Heusch, M., Togbe, D., Ryffel, B., et al. (2016). AhR modulates the IL-22-producing cell proliferation/recruitment in imiquimod-induced psoriasis mouse model. *Eur. J. Immunol.* *46*, 1449–1459.
- Coleman, M.M., Ruane, D., Moran, B., Dunne, P.J., Keane, J., and Mills, K.H.G. (2013). Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *48*, 773–780.
- Coomes, J.L., Siddiqui, K.R.R., Arancibia-Cárcamo, C.V., Hall, J., Sun, C.-M., Belkaid, Y., and Powrie, F. (2007). 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.* *204*, 1757–1764.
- Coquet, J.M., Rausch, L., and Borst, J. (2015). The importance of co-stimulation in the orchestration of T helper cell differentiation. *Immunol. Cell Biol.* *93*, 780–788.

- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., Yu, J., Snyder, N.W., Worth, A.J., Iyer, S.S., Wang, J., Ben-Sahra, I., Byles, V., Polynne-Stapornkul, T., et al. (2016). Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *ELife* 5.
- Creticos, P.S., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Balcer-Whaley, S.L., Khattignavong, A.P., Lindblad, R., Li, H., Coffman, R., Seyfert, V., Eiden, J.J., et al. (2006). Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* 355, 1445–1455.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* 29, 621–663.
- Curotto de Lafaille, M.A., Kutchukhidze, N., Shen, S., Ding, Y., Yee, H., and Lafaille, J.J. (2008). Adaptive Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29, 114–126.
- Daan de Boer, J., Roelofs, J.J.T.H., de Vos, A.F., de Beer, R., Schouten, M., Hommes, T.J., Hoogendijk, A.J., de Boer, O.J., Stroo, I., van der Zee, J.S., et al. (2013). Lipopolysaccharide inhibits Th2 lung inflammation induced by house dust mite allergens in mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 48, 382–389.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 986–995.
- Denning, T.L., Wang, Y., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat. Immunol.* 8, 1086–1094.
- Duan, W., So, T., and Croft, M. (2008). Antagonism of airway tolerance by endotoxin/lipopolysaccharide through promoting OX40L and suppressing antigen-specific Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 8650–8659.
- Duan, W., So, T., Mehta, A.K., Choi, H., and Croft, M. (2011). Inducible CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress allergic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 6499–6507.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863.
- Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* 355, 2226–2235.
- Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W.O.C.M., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E., and GABRIELA Transregio 22 Study Group (2011). Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.* 364, 701–709.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 196, 1645–1651.
- Eivazi, S., Bagheri, S., Hashemzadeh, M.S., Ghalavand, M., Qamsari, E.S., Dorostkar, R., and Yasemi, M. (2016). Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 84, 1668–1678.
- Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014a). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* 41, 21–35.

- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014b). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* *40*, 91–104.
- Errea, A., González Maciel, D., Hiriart, Y., Hozbor, D., and Rumbo, M. (2015). Intranasal administration of TLR agonists induces a discriminated local innate response along murine respiratory tract. *Immunol. Lett.* *164*, 33–39.
- Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorasio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., et al. (2009). Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.* *119*, 3573–3585.
- Fahy, J.V. (2015). Type 2 inflammation in asthma — present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 57–65.
- Finkelman, F.D., Hogan, S.P., Hershey, G.K.K., Rothenberg, M.E., and Wills-Karp, M. (2010). Importance of cytokines in murine allergic airway disease and human asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 1663–1674.
- Fonseca, D.E., and Kline, J.N. (2009). Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *61*, 256–262.
- Fonseca, D.M., Paula, M.O., Wowk, P.F., Campos, L.W., Gembre, A.F., Turato, W.M., Ramos, S.G., Dias-Baruffi, M., Barboza, R., Gomes, E., et al. (2011). IFN- $\gamma$ -mediated efficacy of allergen-free immunotherapy using mycobacterial antigens and CpG-ODN. *Immunol. Cell Biol.* *89*, 777–785.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* *128*, 415–435.
- Gabrilovich, D.I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol. Res.* *5*, 3–8.
- Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* *454*, 445–454.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* *13*, 1118–1128.
- Gehring, U., Bischof, W., Fahlbusch, B., Wichmann, H.-E., and Heinrich, J. (2002). House dust endotoxin and allergic sensitization in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *166*, 939–944.
- Gehring, U., Strikwold, M., Schram-Bijkerk, D., Weinmayr, G., Genuneit, J., Nagel, G., Wickens, K., Siebers, R., Crane, J., Doekes, G., et al. (2008). Asthma and allergic symptoms in relation to house dust endotoxin: Phase Two of the International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC II). *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *38*, 1911–1920.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71–82.
- Gereda, J.E., Leung, D.Y., Thatayatikom, A., Streib, J.E., Price, M.R., Klinnert, M.D., and Liu, A.H. (2000). Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet Lond. Engl.* *355*, 1680–1683.



- Gerhold, K., Blümchen, K., Bock, A., Seib, C., Stock, P., Kallinich, T., Löhning, M., and Wahn, U. (2002). Endotoxins prevent murine IgE production, T(H)2 immune responses, and development of airway eosinophilia but not airway hyperreactivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* *110*, 110–116.
- Gibbings, S.L., Thomas, S.M., Atif, S.M., McCubbrey, A.L., Desch, A.N., Danhorn, T., Leach, S.M., Bratton, D.L., Henson, P.M., Janssen, W.J., et al. (2017). Three Unique Interstitial Macrophages in the Murine Lung at Steady State. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*
- Ginhoux, F., and Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* *44*, 439–449.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 392–404.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Gowers, A.M., Cullinan, P., Ayres, J.G., Anderson, H.R., Strachan, D.P., Holgate, S.T., Mills, I.C., and Maynard, R.L. (2012). Does outdoor air pollution induce new cases of asthma? Biological plausibility and evidence; a review. *Respirol. Carlton Vic* *17*, 887–898.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515–548.
- Guarnieri, M., and Balmes, J.R. (2014). Outdoor air pollution and asthma. *Lancet Lond. Engl.* *383*, 1581–1592.
- Guilliams, M., and Scott, C.L. (2017). Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 451–460.
- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., de Bovis, B., Alexopoulou, L., Dalod, M., and Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* *115*, 1958–1968.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* *210*, 1977–1992.
- Guillot, L., Balloy, V., McCormack, F.X., Golenbock, D.T., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2002). Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J. Immunol. Baltim. Md* *168*, 5989–5992.
- Häcker, H., Mischak, H., Häcker, G., Eser, S., Prenzel, N., Ullrich, A., and Wagner, H. (1999). Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* *18*, 6973–6982.
- Hadis, U., Wahl, B., Schulz, O., Hardtke-Wolenski, M., Schippers, A., Wagner, N., Müller, W., Sparwasser, T., Förster, R., and Pabst, O. (2011). Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity* *34*, 237–246.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* *15*, 410–416.

- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C- monocytes. *Nat. Immunol.* *12*, 778–785.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 275–308.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* *38*, 792–804.
- Hawrylowicz, C.M. (2005). Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J. Exp. Med.* *202*, 1459–1463.
- Hawrylowicz, C.M., and O’Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 271–283.
- Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A., and Raz, E. (2004). Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* *114*, 270–279.
- de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A.M., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* *200*, 89–98.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740–745.
- Hickey, A.J., Lin, J.-S., Kummer, L.W., Szaba, F.M., Duso, D.K., Tighe, M., Parent, M.A., and Smiley, S.T. (2013). Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against *Yersinia pestis* infection. *Infect. Immun.* *81*, 2123–2132.
- Hiroshima, Y., Hsu, K., Tedla, N., Chung, Y.M., Chow, S., Herbert, C., and Geczy, C.L. (2014). S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *192*, 2800–2811.
- Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2015). Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* *6*, 486.
- Holgate, S.T. (2008). Pathogenesis of asthma. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *38*, 872–897.
- Holgate, S.T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat. Med.* *18*, 673–683.
- Holgate, S.T., Wenzel, S., Postma, D.S., Weiss, S.T., Renz, H., and Sly, P.D. (2015). Asthma. *Nat. Rev. Dis. Primer* *1*, 15025.
- Hollingsworth, J.W., Whitehead, G.S., Lin, K.L., Nakano, H., Gunn, M.D., Schwartz, D.A., and Cook, D.N. (2006). TLR4 signaling attenuates ongoing allergic inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *176*, 5856–5862.
- Holt, P.G., and Thomas, W.R. (2005). Sensitization to airborne environmental allergens: unresolved issues. *Nat. Immunol.* *6*, 957–960.

- Holt, P.G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P.G., Kraal, G., and Thepen, T. (1993). Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* *177*, 397–407.
- Hoppstädter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C.-M., Huwer, H., et al. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir. Res.* *11*, 124.
- Huggins, J.L., and Looney, R.J. (2004). Allergen immunotherapy. *Am. Fam. Physician* *70*, 689–696.
- Humbert, M., Menz, G., Ying, S., Corrigan, C.J., Robinson, D.S., Durham, S.R., and Kay, A.B. (1999). The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences. *Immunol. Today* *20*, 528–533.
- Ikeda, H., Chamoto, K., Tsuji, T., Suzuki, Y., Wakita, D., Takeshima, T., and Nishimura, T. (2004). The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy. *Cancer Sci.* *95*, 697–703.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Jain, V.V., Kitagaki, K., Businga, T., Hussain, I., George, C., O’shaughnessy, P., and Kline, J.N. (2002). CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *110*, 867–872.
- Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* *39*, 599–610.
- Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., and Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 349–362.
- Joeris, T., Müller-Luda, K., Agace, W.W., and Mowat, A.M. (2017). Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunol.*
- Josefowicz, S.Z., Niec, R.E., Kim, H.Y., Treuting, P., Chinen, T., Zheng, Y., Umetsu, D.T., and Rudensky, A.Y. (2012). Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* *482*, 395–399.
- Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 295–307.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 984–993.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* *11*, 373–384.
- Kawano, H., Kayama, H., Nakama, T., Hashimoto, T., Umemoto, E., and Takeda, K. (2016). IL-10-producing lung interstitial macrophages prevent neutrophilic asthma. *Int. Immunol.* *28*, 489–501.
- Klimek, L., Willers, J., Hammann-Haenni, A., Pfaar, O., Stocker, H., Mueller, P., Renner, W.A., and Bachmann, M.F. (2011). Assessment of clinical efficacy of CYT003-QbG10 in patients with allergic rhinoconjunctivitis: a phase IIb study. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *41*, 1305–1312.

- Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S., and Krieg, A.M. (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 2555–2559.
- Kline, J.N., Krieg, A.M., Waldschmidt, T.J., Ballas, Z.K., Jain, V., and Businga, T.R. (1999). CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *104*, 1258–1264.
- Kline, J.N., Kitagaki, K., Businga, T.R., and Jain, V.V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *283*, L170–179.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 485–517.
- Korsgren, M., Persson, C.G., Sundler, F., Bjerke, T., Hansson, T., Chambers, B.J., Hong, S., Van Kaer, L., Ljunggren, H.G., and Korsgren, O. (1999). Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice. *J. Exp. Med.* *189*, 553–562.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* *5*, 471–484.
- Krieg, A.M. (2012). CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* *22*, 77–89.
- Kurts, C. (2000). Cross-presentation: inducing CD8 T cell immunity and tolerance. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *78*, 326–332.
- van de Laar, L., Saelens, W., De Prijck, S., Martens, L., Scott, C.L., Van Isterdael, G., Hoffmann, E., Beyaert, R., Saeys, Y., Lambrecht, B.N., et al. (2016). Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* *44*, 755–768.
- Lahn, M., Kanehiro, A., Takeda, K., Joetham, A., Schwarze, J., Köhler, G., O'Brien, R., Gelfand, E.W., Born, W., and Kanehio, A. (1999). Negative regulation of airway responsiveness that is dependent on gammadelta T cells and independent of alphabeta T cells. *Nat. Med.* *5*, 1150–1156.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2014). Allergens and the airway epithelium response: gateway to allergic sensitization. *J. Allergy Clin. Immunol.* *134*, 499–507.
- Lambrecht, B.N., and Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* *16*, 45–56.
- Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., and Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 731–744.
- Lazarus, R., Klimecki, W.T., Raby, B.A., Vercelli, D., Palmer, L.J., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E.K., Martinez, F., and Weiss, S.T. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* *81*, 85–91.
- Lemanske, R.F., and Busse, W.W. (2003). 6. Asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, S502–519.
- Lemanske, R.F., Jackson, D.J., Gangnon, R.E., Evans, M.D., Li, Z., Shult, P.A., Kirk, C.J., Reisdorf, E., Roberg, K.A., Anderson, E.L., et al. (2005). Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 571–577.

- LeMessurier, K.S., Häcker, H., Chi, L., Tuomanen, E., and Redecke, V. (2013). Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung. *PLoS Pathog.* 9, e1003727.
- Li, Y.-F., Langholz, B., Salam, M.T., and Gilliland, F.D. (2005). Maternal and grandmaternal smoking patterns are associated with early childhood asthma. *Chest* 127, 1232–1241.
- Licona-Limón, P., Kim, L.K., Palm, N.W., and Flavell, R.A. (2013). TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 14, 536–542.
- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon- $\gamma$  in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 15137–15142.
- Lipscomb, M.F., Pollard, A.M., and Yates, J.L. (1993). A role for TGF-beta in the suppression by murine bronchoalveolar cells of lung dendritic cell initiated immune responses. *Reg. Immunol.* 5, 151–157.
- Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845–858.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 45–54.
- Lloyd, C.M., and Hessel, E.M. (2010). Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 838–848.
- Lloyd, C.M., and Murdoch, J.R. (2010). Tolerizing allergic responses in the lung. *Mucosal Immunol.* 3, 334–344.
- Locksley, R.M. (2010). Asthma and allergic inflammation. *Cell* 140, 777–783.
- Loftus, P.A., and Wise, S.K. (2016). Epidemiology of asthma. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 24, 245–249.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- Marino, R., Thuraisingam, T., Camateros, P., Kanagaratham, C., Xu, Y.Z., Henri, J., Yang, J., He, G., Ding, A., and Radzioch, D. (2011). Secretory leukocyte protease inhibitor plays an important role in the regulation of allergic asthma in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4433–4442.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* 6, 13.
- Masoli, M., Fabian, D., Holt, S., Beasley, R., and Global Initiative for Asthma (GINA) Program (2004). The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report. *Allergy* 59, 469–478.
- Mass, E., Ballesteros, I., Farlik, M., Halbritter, F., Günther, P., Crozet, L., Jacome-Galarza, C.E., Händler, K., Klughammer, J., Kobayashi, Y., et al. (2016). Specification of tissue-resident macrophages during organogenesis. *Science* 353.
- Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Köllnberger, M., Tubo, N., Moseman, E.A., Huff, I.V., Junt, T., Wagers, A.J., Mazo, I.B., et al. (2007). Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues. *Cell* 131, 994–1008.

- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 991–1045.
- Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science* *296*, 301–305.
- McKeever, T.M., and Britton, J. (2004). Diet and asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *170*, 725–729.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* *449*, 819–826.
- Mendy, A., Gasana, J., Vieira, E.R., Forno, E., Patel, J., Kadam, P., and Ramirez, G. (2011). Endotoxin exposure and childhood wheeze and asthma: a meta-analysis of observational studies. *J. Asthma Off. J. Assoc. Care Asthma* *48*, 685–693.
- Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., Weissman, I.L., Cyster, J.G., and Engleman, E.G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat. Immunol.* *3*, 1135–1141.
- Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M.A., Pirotin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* *126*, 3279–3295.
- Michel, O., Kips, J., Duchateau, J., Vertongen, F., Robert, L., Collet, H., Pauwels, R., and Sergysels, R. (1996). Severity of asthma is related to endotoxin in house dust. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *154*, 1641–1646.
- Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* *40*, 642–656.
- Mildner, A., Schönheit, J., Giladi, A., David, E., Lara-Astiaso, D., Lorenzo-Vivas, E., Paul, F., Chappell-Maor, L., Priller, J., Leutz, A., et al. (2017). Genomic Characterization of Murine Monocytes Reveals C/EBP $\beta$  Transcription Factor Dependence of Ly6C(-) Cells. *Immunity* *46*, 849–862.e7.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 6166–6173.
- Molawi, K., Wolf, Y., Kandalla, P.K., Favret, J., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Pinto, A.R., Klapproth, K., Henri, S., Malissen, B., et al. (2014). Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J. Exp. Med.* *211*, 2151–2158.
- Monsalve, E., Ruiz-García, A., Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Sánchez-Solana, B., Rivero, S., García-Ramírez, J.J., Rubio, A., Laborda, J., and Díaz-Guerra, M.J.M. (2009). Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF-kappaB activity. *Eur. J. Immunol.* *39*, 2556–2570.
- Moon, T.C., St Laurent, C.D., Morris, K.E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., and Befus, A.D. (2010). Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* *3*, 111–128.
- Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit+Sca-1+ lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544.
- Movahedi, K., Guillems, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-

- derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* *111*, 4233–4244.
- Muc, M., Mota-Pinto, A., and Padez, C. (2016). Association between obesity and asthma - epidemiology, pathophysiology and clinical profile. *Nutr. Res. Rev.* 1–8.
- Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J. Clin. Invest.* *115*, 1923–1933.
- Muñoz, N., Van Maele, L., Marqués, J.M., Rial, A., Sirard, J.-C., and Chabalgoity, J.A. (2010). Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.* *78*, 4226–4233.
- Murakami, D., Yamada, H., Yajima, T., Masuda, A., Komune, S., and Yoshikai, Y. (2007). Lipopolysaccharide inhalation exacerbates allergic airway inflammation by activating mast cells and promoting Th2 responses. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *37*, 339–347.
- Murk, W., Risnes, K.R., and Bracken, M.B. (2011). Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: a systematic review. *Pediatrics* *127*, 1125–1138.
- Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 723–737.
- von Mutius, E. (2009). Gene-environment interactions in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *123*, 3-11; quiz 12-13.
- von Mutius, E. (2016). The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.* *137*, 680–689.
- von Mutius, E., Braun-Fahrländer, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlermann, S., Maisch, S., Waser, M., and Nowak, D. (2000). Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *30*, 1230–1234.
- Naito, M., Umeda, S., Yamamoto, T., Moriyama, H., Umezu, H., Hasegawa, G., Usuda, H., Shultz, L.D., and Takahashi, K. (1996). Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J. Leukoc. Biol.* *59*, 133–138.
- Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., et al. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* *464*, 1367–1370.
- Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.-H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* *325*, 1001–1005.
- Ober, C. (2005). Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J. Allergy Clin. Immunol.* *116*, 274–278.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E.S., Young, D.W., Ishizaka, S.T., Rose, J., Chow, J.C., and Strauss, J.F. (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* *276*, 10229–10233.
- O’Shea, J.J., Lahesmaa, R., Vahedi, G., Laurence, A., and Kanno, Y. (2011). Genomic views of STAT function in CD4+ T helper cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 239–250.

- Ostroukhova, M., Seguin-Devaux, C., Oriss, T.B., Dixon-McCarthy, B., Yang, L., Ameredes, B.T., Corcoran, T.E., and Ray, A. (2004). Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J. Clin. Invest.* *114*, 28–38.
- Ostuni, R., Piccolo, V., Barozzi, I., Polletti, S., Termanini, A., Bonifacio, S., Curina, A., Prosperini, E., Ghisletti, S., and Natoli, G. (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* *152*, 157–171.
- Park, B.S., and Lee, J.-O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* *45*, e66.
- Park, J.H., Gold, D.R., Spiegelman, D.L., Burge, H.A., and Milton, D.K. (2001). House dust endotoxin and wheeze in the first year of life. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *163*, 322–328.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., and Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 7370–7377.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1919–1924.
- Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 225–235.
- Pelaia, G., Vatrella, A., and Maselli, R. (2012). The potential of biologics for the treatment of asthma. *Nat. Rev. Drug Discov.* *11*, 958–972.
- Perdiguero, E.G., and Geissmann, F. (2016). The development and maintenance of resident macrophages. *Nat. Immunol.* *17*, 2–8.
- Price, A.E., Liang, H.-E., Sullivan, B.M., Reinhardt, R.L., Easley, C.J., Erle, D.J., and Locksley, R.M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11489–11494.
- Raetz, C.R.H., and Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 635–700.
- Reppe, K., Radünzel, P., Dietert, K., Tschernig, T., Wolff, T., Hammerschmidt, S., Gruber, A.D., Suttorp, N., and Witznath, M. (2015). Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infect. Immun.* *83*, 4617–4629.
- Riedler, J., Eder, W., Oberfeld, G., and Schreuer, M. (2000). Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *30*, 194–200.
- Riedler, J., Braun-Fahrländer, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., von Mutius, E., et al. (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet Lond. Engl.* *358*, 1129–1133.
- Risnes, K.R., Belanger, K., Murk, W., and Bracken, M.B. (2011). Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: Findings in a cohort of 1,401 US children. *Am. J. Epidemiol.* *173*, 310–318.



- Robbins, C.S., Chudnovskiy, A., Rauch, P.J., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Gorbatov, R., Eitzrodt, M., Weber, G.F., Ueno, T., van Rooijen, N., et al. (2012). Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation* *125*, 364–374.
- Robinson, D.S. (2010). The role of the T cell in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 1081-1091; quiz 1092-1093.
- Rodríguez, D., Keller, A.C., Faquim-Mauro, E.L., de Macedo, M.S., Cunha, F.Q., Lefort, J., Vargaftig, B.B., and Russo, M. (2003). Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 1001–1008.
- Roy, S.R., Schiltz, A.M., Marotta, A., Shen, Y., and Liu, A.H. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J. Allergy Clin. Immunol.* *112*, 571–578.
- Sabatel, C., Radermecker, C., Fievez, L., Paulissen, G., Chakarov, S., Fernandes, C., Olivier, S., Toussaint, M., Pirottin, D., Xiao, X., et al. (2017). Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages. *Immunity* *46*, 457–473.
- Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., and Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* *133*, 775–787.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 317–334.
- Sawyer, R.T., Strausbauch, P.H., and Volkman, A. (1982). Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *46*, 165–170.
- Schuijs, M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J., Madeira, F.B., Beyaert, R., van Loo, G., Bracher, F., et al. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* *349*, 1106–1110.
- Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* *336*, 86–90.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A., and Paul, W.E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 10188–10192.
- Senti, G., Johansen, P., Haug, S., Bull, C., Gottschaller, C., Müller, P., Pfister, T., Maurer, P., Bachmann, M.F., Graf, N., et al. (2009). Use of A-type CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant in allergen-specific immunotherapy in humans: a phase I/IIa clinical trial. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *39*, 562–570.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* *7*, 311–317.
- Sheng, J., Ruedl, C., and Karjalainen, K. (2015). Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity* *43*, 382–393.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 762–774.

- Sieweke, M.H., and Allen, J.E. (2013). Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* 342, 1242974.
- Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F., and Kjellman, B. (2000). Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161, 1501–1507.
- Simons, F.E.R., Shikishima, Y., Van Nest, G., Eiden, J.J., and HayGlass, K.T. (2004). Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 1144–1151.
- Singh, A., Carson, W.F., Secor, E.R., Guernsey, L.A., Flavell, R.A., Clark, R.B., Thrall, R.S., and Schramm, C.M. (2008). Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 7318–7326.
- Smiley, S.T., King, J.A., and Hancock, W.W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 2887–2894.
- Smit, L.A.M., Siroux, V., Bouzigon, E., Oryszczyn, M.-P., Lathrop, M., Demenais, F., Kauffmann, F., and Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA) Cooperative Group (2009). CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 363–368.
- Solito, S., Pinton, L., and Mandruzzato, S. (2017). In Brief: Myeloid-derived suppressor cells in cancer. *J. Pathol.* 242, 7–9.
- Sordillo, J.E., Hoffman, E.B., Celedón, J.C., Litonjua, A.A., Milton, D.K., and Gold, D.R. (2010). Multiple microbial exposures in the home may protect against asthma or allergy in childhood. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 40, 902–910.
- Soroosh, P., Doherty, T.A., Duan, W., Mehta, A.K., Choi, H., Adams, Y.F., Mikulski, Z., Khorram, N., Rosenthal, P., Broide, D.H., et al. (2013). Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J. Exp. Med.* 210, 775–788.
- Stein, M.M., Hrusch, C.L., Gozdz, J., Igartua, C., Pivniouk, V., Murray, S.E., Ledford, J.G., Marques dos Santos, M., Anderson, R.L., Metwali, N., et al. (2016). Innate Immunity and Asthma Risk in Amish and Hutterite Farm Children. *N. Engl. J. Med.* 375, 411–421.
- Stock, P., Kallinich, T., Akbari, O., Quarcoo, D., Gerhold, K., Wahn, U., Umetsu, D.T., and Hamelmann, E. (2004). CD8(+) T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur. J. Immunol.* 34, 1817–1827.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299, 1259–1260.
- Strickland, D., Kees, U.R., and Holt, P.G. (1996). Regulation of T-cell activation in the lung: alveolar macrophages induce reversible T-cell anergy in vitro associated with inhibition of interleukin-2 receptor signal transduction. *Immunology* 87, 250–258.
- Sun, C.-M., Hall, J.A., Blank, R.B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J.R., and Belkaid, Y. (2007). Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J. Exp. Med.* 204, 1775–1785.
- Sur, S., Wild, J.S., Choudhury, B.K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D.M. (1999). Long Term Prevention of Allergic Lung Inflammation in a Mouse Model of Asthma by CpG Oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* 162, 6284–6293.

Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.

Takada, Y., Hisamatsu, T., Kamada, N., Kitazume, M.T., Honda, H., Oshima, Y., Saito, R., Takayama, T., Kobayashi, T., Chinen, H., et al. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 2671–2676.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.

Tamoutounour, S., Guillemins, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.

Tan, S.Y.S., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev. Camb. Engl.* 143, 1318–1327.

Tartey, S., and Takeuchi, O. (2017). Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int. Rev. Immunol.* 0, 1–17.

Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., Fieber, C., Voith, U., Ahrens, T., Miyake, K., Freudenberg, M., Galanos, C., and Simon, J.C. (2002). Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 195, 99–111.

Thepen, T., McMennamin, C., Girn, B., Kraal, G., and Holt, P.G. (1992). Regulation of IgE production in pre-sensitized animals: in vivo elimination of alveolar macrophages preferentially increases IgE responses to inhaled allergen. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 22, 1107–1114.

Thorne, P.S., Kulhánková, K., Yin, M., Cohn, R., Arbes, S.J., and Zeldin, D.C. (2005). Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1371–1377.

Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K., and Spits, H. (2009). Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.* 10, 864–871.

Trompette, A., Divanovic, S., Visintin, A., Blanchard, C., Hegde, R.S., Madan, R., Thorne, P.S., Wills-Karp, M., Giovannini, T.L., Weiss, J.P., et al. (2009). Allergenicity resulting from functional mimicry of a Toll-like receptor complex protein. *Nature* 457, 585–588.

Tulic, M.K., Fiset, P.-O., Christodoulopoulos, P., Vaillancourt, P., Desrosiers, M., Lavigne, F., Eiden, J., and Hamid, Q. (2004). Amb a 1-immunostimulatory oligodeoxynucleotide conjugate immunotherapy decreases the nasal inflammatory response☆. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 235–241.

Upham, J.W., Strickland, D.H., Bilyk, N., Robinson, B.W., and Holt, P.G. (1995). Alveolar macrophages from humans and rodents selectively inhibit T-cell proliferation but permit T-cell activation and cytokine secretion. *Immunology* 84, 142–147.

Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C.J., Häcker, H., and Wagner, H. (2001). Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the

- toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31332–31339.
- Van, L.P., Bardel, E., Gregoire, S., Vanoirbeek, J., Schneider, E., Dy, M., and Thieblemont, N. (2011). Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur. J. Immunol.* 41, 1992–1999.
- Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmbj, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor- $\beta$  “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* 9, 1341–1346.
- Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., and Pauwels, R.A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 193, 51–60.
- Vogel, A.J., and Brown, D.M. (2015). Single-Dose CpG Immunization Protects Against a Heterosubtypic Challenge and Generates Antigen-Specific Memory T Cells. *Front. Immunol.* 6, 327.
- Vollmer, J., and Krieg, A.M. (2009). Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 195–204.
- Vollmer, J., Weeratna, R., Payette, P., Jurk, M., Schetter, C., Laucht, M., Wader, T., Tluk, S., Liu, M., Davis, H.L., et al. (2004). Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* 34, 251–262.
- Von Ehrenstein, O.S., Von Mutius, E., Illi, S., Baumann, L., Böhm, O., and von Kries, R. (2000). Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 30, 187–193.
- Vork, K.L., Broadwin, R.L., and Blaisdell, R.J. (2007). Developing asthma in childhood from exposure to secondhand tobacco smoke: insights from a meta-regression. *Environ. Health Perspect.* 115, 1394–1400.
- Wang, E., and Hoyte, F.C.L. (2016). Traditional Therapies for Severe Asthma. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 36, 581–608.
- Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 821–852.
- Wenzel, S.E. (2012). Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. *Nat. Med.* 18, 716–725.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 171–192.
- Wilson, R.H., Whitehead, G.S., Nakano, H., Free, M.E., Kolls, J.K., and Cook, D.N. (2009). Allergic Sensitization through the Airway Primes Th17-dependent Neutrophilia and Airway Hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180, 720–730.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91.

Youn, C.J., Miller, M., Baek, K.J., Han, J.W., Nayar, J., Lee, S.Y., McElwain, K., McElwain, S., Raz, E., and Broide, D.H. (2004). Immunostimulatory DNA Reverses Established Allergen-Induced Airway Remodeling. *J. Immunol.* 173, 7556–7564.

Youn, J.-I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 5791–5802.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu. Rev. Immunol.* 28, 445–489.

---

**Annexes**  
**Articles publiés**

---

---

## Annexes - Articles publiés

Etude 1 :

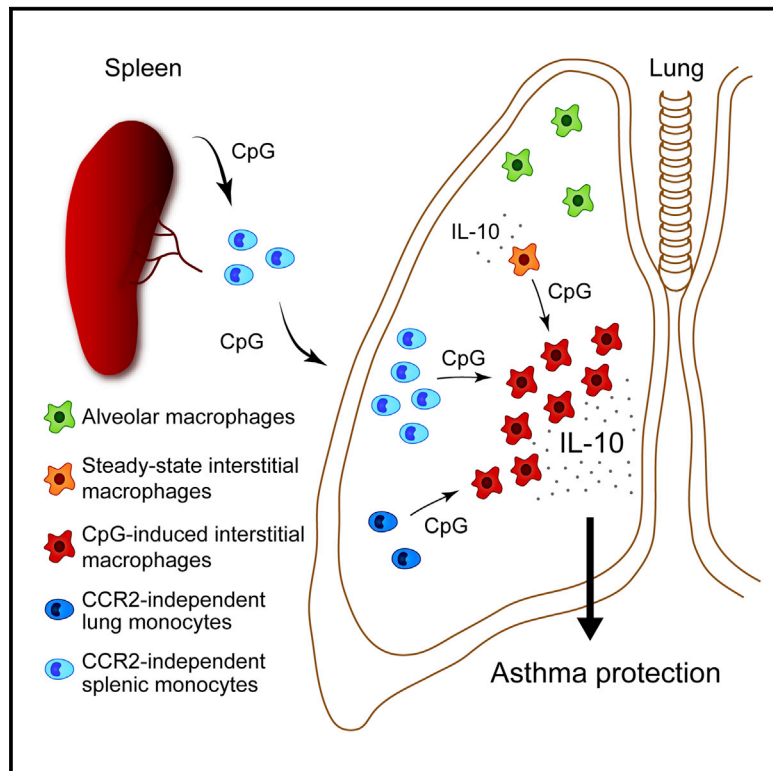
Exposure to bacterial CpG DNA protects from airway  
allergic inflammation by expanding regulatory lung  
interstitial macrophages

---

# Immunity

## Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages

### Graphical Abstract



### Authors

Catherine Sabatel,  
Coraline Radermecker,  
Laurence Fievez, ..., Florent Ginhoux,  
Thomas Marichal, Fabrice Bureau

### Correspondence

t.marichal@ulg.ac.be (T.M.),  
fabrice.bureau@ulg.ac.be (F.B.)

### In Brief

Exposure to unmethylated CpG DNA (CpG) from bacteria is associated with a reduced risk of developing asthma. Sabatel et al. find that CpG exposure leads to higher numbers of lung interstitial macrophages that prevent allergic inflammation through the production of the regulatory cytokine interleukin-10.

### Highlights

- Exposure to bacterial CpG DNA (CpG) expands regulatory lung interstitial macrophages (IMs)
- Transfer of WT but not *Il10*<sup>-/-</sup> IMs protects from allergen-induced airway inflammation
- CpG-induced IMs arise from local and splenic reservoir monocytes
- Migration of regulatory IM precursors to the lung does not require CCR2

### Accession Numbers

E-MTAB-5012





# Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages

Catherine Sabatel,<sup>1,2,11</sup> Coraline Radermecker,<sup>1,2,11</sup> Laurence Fievez,<sup>1,11</sup> Genevieve Paulissen,<sup>1</sup> Svetoslav Chakarov,<sup>3</sup> Claudia Fernandes,<sup>1</sup> Sabine Olivier,<sup>1</sup> Marie Toussaint,<sup>4</sup> Dimitri Pirottin,<sup>1,2</sup> Xue Xiao,<sup>2,5</sup> Pascale Quatresooz,<sup>6</sup> Jean-Claude Sirard,<sup>7</sup> Didier Cataldo,<sup>8</sup> Laurent Gillet,<sup>2,5</sup> Hicham Bouabe,<sup>9</sup> Christophe J. Desmet,<sup>1</sup> Florent Ginhoux,<sup>3</sup> Thomas Marichal,<sup>1,2,\*</sup> and Fabrice Bureau<sup>1,2,10,12,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA Research, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

<sup>3</sup>Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology, and Research, Singapore 138648, Singapore

<sup>4</sup>Airway Disease Infection Section, National Heart and Lung Institute, Imperial College London, London W2 1PG, UK

<sup>5</sup>Laboratory of Immunology-Vaccinology, Fundamental and Applied Research for Animals & Health, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

<sup>6</sup>Centre de Recherche sur les Protéines Prion, Department of Human Histology, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

<sup>7</sup>INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Center for Infection and Immunity of Lille, University of Lille, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, 59000 Lille, France

<sup>8</sup>Laboratory of Tumor and Developmental Biology, GIGA Research, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

<sup>9</sup>Laboratory of Lymphocyte Signalling and Development, Babraham Institute, Cambridge CB22 3AT, UK

<sup>10</sup>Wallon Excellence in Life Sciences and Biotechnology, Wallonia, Belgium

<sup>11</sup>Co-first author

<sup>12</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [t.marichal@ulg.ac.be](mailto:t.marichal@ulg.ac.be) (T.M.), [fabrice.bureau@ulg.ac.be](mailto:fabrice.bureau@ulg.ac.be) (F.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>

## SUMMARY

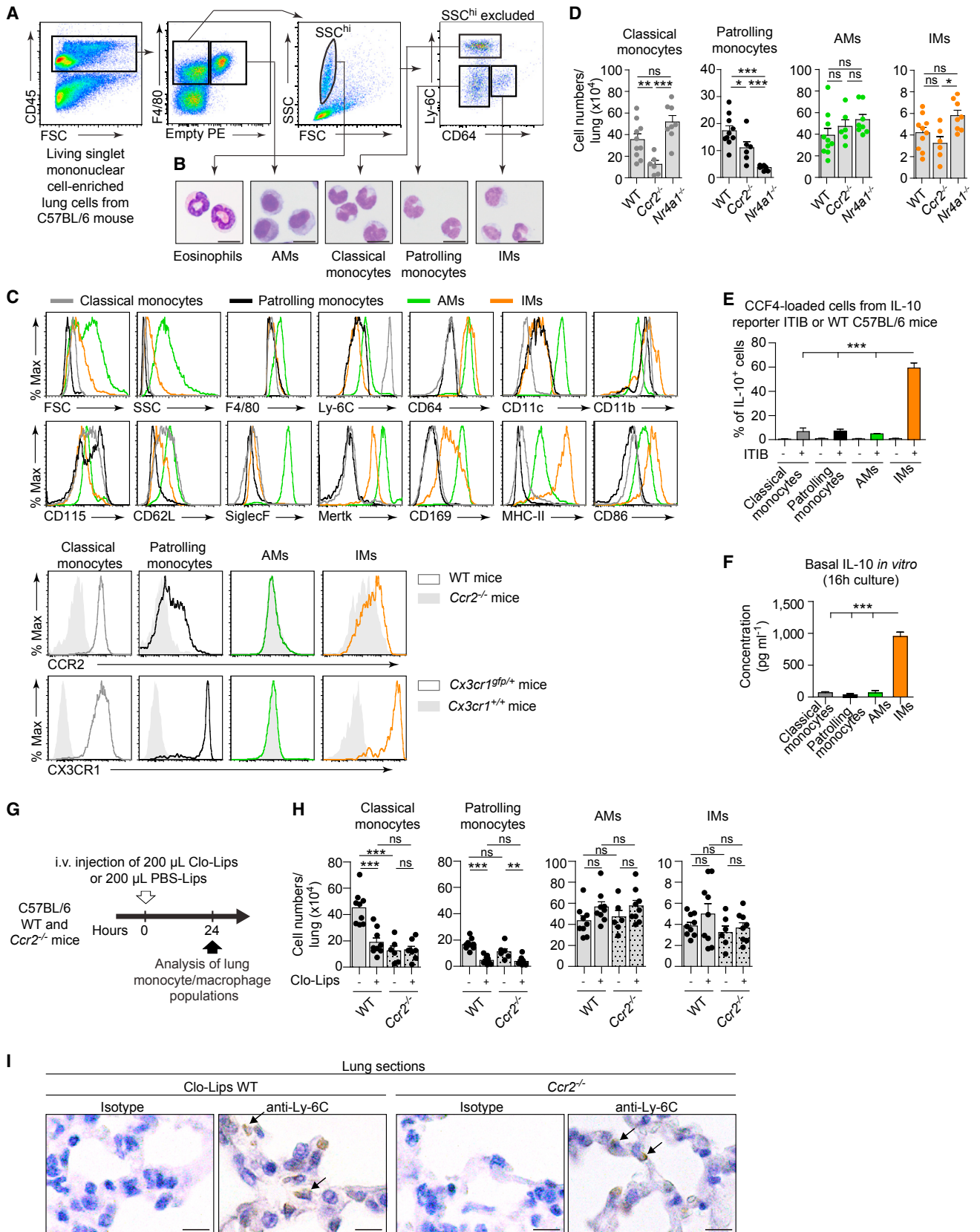
Living in a microbe-rich environment reduces the risk of developing asthma. Exposure of humans or mice to unmethylated CpG DNA (CpG) from bacteria reproduces these protective effects, suggesting a major contribution of CpG to microbe-induced asthma resistance. However, how CpG confers protection remains elusive. We found that exposure to CpG expanded regulatory lung interstitial macrophages (IMs) from monocytes infiltrating the lung or mobilized from the spleen. Trafficking of IM precursors to the lung was independent of CCR2, a chemokine receptor required for monocyte mobilization from the bone marrow. Using a mouse model of allergic airway inflammation, we found that adoptive transfer of IMs isolated from CpG-treated mice recapitulated the protective effects of CpG when administered before allergen sensitization or challenge. IM-mediated protection was dependent on IL-10, given that *Il10*<sup>-/-</sup> CpG-induced IMs lacked regulatory effects. Thus, the expansion of regulatory lung IMs upon exposure to CpG might underlie the reduced risk of asthma development associated with a microbe-rich environment.

## INTRODUCTION

The increased prevalence of allergic asthma over the past few decades points to alterations in the environment (Eder et al.,

2006). The hygiene hypothesis postulates that decreased exposure to environmental and commensal microbes or their products, partly because of changes associated with urban lifestyles, is responsible for this rise (Strachan, 1989; von Mutius, 2016). In line with this hypothesis, epidemiological studies associate growing up on a farm, where exposure to bacterial endotoxin (lipopolysaccharide [LPS]) is high, with reduced risk of allergic sensitization (Braun-Fahrlander et al., 2002; von Mutius, 2016). However, whether LPS mediates the aforementioned protective effects is uncertain. Indeed, concurrent studies in non-rural environments have suggested that exposure to LPS is instead a risk factor for increased asthma prevalence and severity (Thorne et al., 2005). Moreover, although LPS has demonstrated protective effects in some animal models (Schuijs et al., 2015), it has also been shown to promote experimental asthma (Eisenbarth et al., 2002; Hammad et al., 2009).

Another candidate for mediating the protective effects of microbe-rich environments is bacterial DNA, which contains unmethylated CpG motifs with immunomodulatory properties (Krieg, 2006). Bacterial DNA, like LPS, is present in high amounts in dust from rural homes (Roy et al., 2003), and treatment with synthetic CpG DNA (CpG) consistently prevents allergic sensitization in animal models (Kline et al., 1998; Sur et al., 1999). Moreover, CpG is able to reverse established asthma in animals (Broide et al., 1998; Kline et al., 2002) and has shown efficacy in attenuating allergic disorders in human clinical trials (Beeh et al., 2013; Creticos et al., 2006; Krieg, 2006). How CpG exerts these immunomodulatory effects remains unclear. It was initially proposed that CpG, which is often co-administered with allergens, redirects allergen-specific T helper 2 (Th2) cell responses toward Th1 or regulatory T cell responses (Broide et al., 1998; Kline et al., 2002; Kline et al., 1998; Krieg, 2012). However,



(legend on next page)

CpG is capable of conferring protection in the absence of allergens (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998; Krieg, 2012), suggesting that it acts independently of the adaptive immune system.

In 2009, we identified a small population of regulatory macrophages in the lung interstitium of mice (Bedoret et al., 2009). These lung interstitial macrophages (IMs), also found in humans (Hoppstädter et al., 2010), spontaneously produce the immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10), a hallmark of regulatory macrophages (Mosser and Edwards, 2008). Moreover, when exposed to low doses of LPS, IMs, which are located in the vicinity of lung dendritic cells (DCs), can counteract the capacity of LPS-activated DCs to induce Th2 responses against harmless antigens (Bedoret et al., 2009). In agreement with this, mice lacking functional IMs, but not wild-type (WT) mice, develop overt asthmatic reactions when exposed to low doses of a mixture of allergen and LPS (Bedoret et al., 2009). However, the immunosuppressive effects of IMs are overwhelmed when the airways are exposed to high levels of allergens and LPS, given that 100% of WT mice develop asthma upon exposure to high doses of house dust mite (HDM) extracts, a phenomenon that requires Toll-like receptor 4 (TLR4) activation by HDM-borne LPS (Hammad et al., 2009). We therefore reasoned that pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) other than LPS could improve the immunosuppressive effects of IMs and thereby explain how a microbe-rich environment reduces the risk of asthma development.

Here, we found that CpG is able to robustly expand the IM population. CpG-induced IMs (CpG IMs) developed from local and splenic reservoir monocytes and were able, by producing IL-10, to confer protection against allergic inflammation even when mice were sensitized and challenged with high doses of HDM. Our findings reveal a role for regulatory IMs shed in the protective effect of CpG exposure in allergic airway inflammation and suggest that similar mechanisms might underlie the reduced risk of human asthma development that is associated with exposure to a microbe-rich environment.

## RESULTS

### A Simplified Flow Cytometry Strategy Discriminates Lung Monocyte and Macrophage Subsets in Mice

In order to identify the monocyte and macrophage populations associated with the lung at steady state, we set up a simplified six-step, five-color flow cytometry staining procedure on mono-

nuclear-cell-enriched lung cells isolated from whole, non-lavaged, perfused lungs of naive C57BL/6 WT mice. To encompass all monocyte and macrophage populations, we gated sequentially on living singlet cells (step 1), CD45<sup>+</sup> immune cells (step 2), and cells positive for the pan-monocyte and -macrophage marker F4/80 (step 3) (Figure 1A). Alveolar macrophages (AMs), the most abundant lung phagocytic cells present in the airways (Figure S1A), were identified as large (FSC<sup>hi</sup>) autofluorescent CD11c<sup>hi</sup>Siglec<sup>F</sup><sup>hi</sup>CD64<sup>+</sup>Mertk<sup>+</sup>CD169<sup>+</sup> cells (step 4) (Figures 1A–1C). F4/80-expressing lung-resident eosinophils (Mennil et al., 2016) were excluded on the basis of their high granularity (SSC<sup>hi</sup>) (step 5). The remaining CD45<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells were further separated into three populations according to their expression of the monocyte and macrophage markers Ly-6C (Geissmann et al., 2003) and CD64 (Gautier et al., 2012) (step 6) (Figures 1A and 1B).

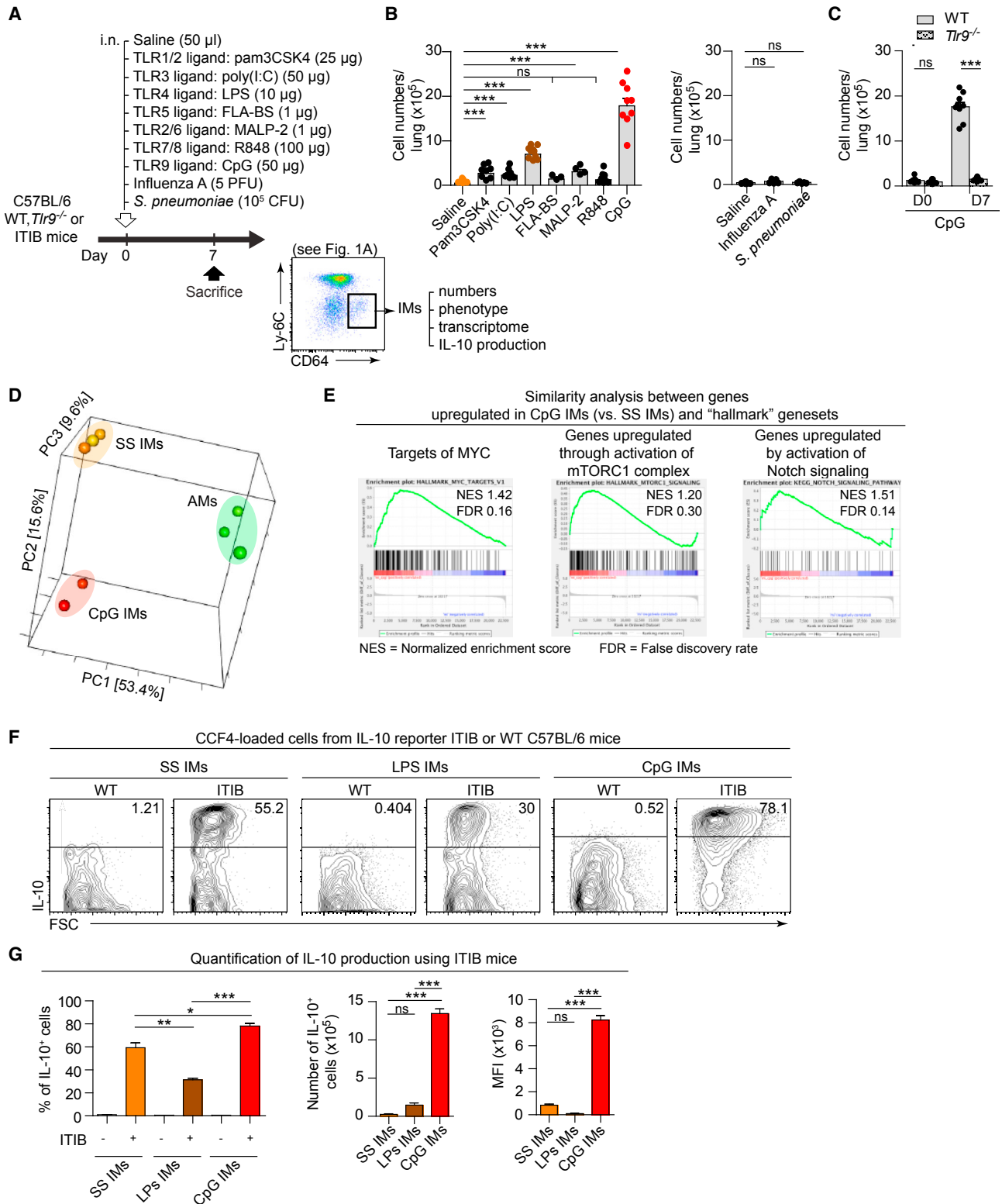
Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> cells were classical monocytes, given that they exhibited a monocytic morphology, expressed the typical markers of classical monocytes (Ly-6C<sup>hi</sup>CCR2<sup>+</sup>CX3CR1<sup>int</sup>CD62L<sup>+</sup>), and were less abundant in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 1B–1D), in which classical monocyte emigration from the bone marrow (BM) is compromised (Serbina and Pamer, 2006). Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup> cells also displayed a monocytic morphology, expressed the characteristic markers of patrolling monocytes (Ly-6C<sup>lo</sup>CCR2<sup>lo</sup>CX3CR1<sup>hi</sup>CD62L<sup>-</sup>), and were significantly reduced in mice lacking NR4A1 (Figure 1B–1D), a transcription factor controlling differentiation and survival of patrolling monocytes (Hanna et al., 2011), demonstrating that these cells were patrolling monocytes.

Finally, Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup> cells were identified as IMs. Indeed, these cells were absent in the broncho-alveolar lavage fluid (BALF) (Figure S1A) and were positive for MHC-II and the macrophage markers Mertk and CD169 (Figure 1C). IMs were already present after birth (Figure S1B), expressed low levels of CCR2, and were found in similar numbers in 6- to 10-week-old *Ccr2*<sup>-/-</sup>, *Nr4a1*<sup>-/-</sup>, and WT mice (Figure 1D). However, their numbers were significantly lower in 1-year-old *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice than in age-matched controls (Figure S1C), suggesting that IMs represent a heterogeneous population and are partially maintained by classical monocytes in adults, as reported by others (Tan and Krasnow, 2016). To test this, we sutured CD45.1<sup>+</sup> WT and CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice together for 6 months and analyzed the enrichment in WT partner cells within the *Ccr2*<sup>-/-</sup> host (Figure S1D). Parabiotic mice efficiently exchanged their circulation, as attested by the percentage of enrichment in blood B cells that

### Figure 1. Identification of Monocyte and Macrophage Populations in the Mouse Lung

- (A) Gating strategy.  
 (B) Photographs of FACS-sorted populations gated in (A).  
 (C and D) Surface phenotype (C) and absolute numbers (D) of the indicated populations in the lungs of WT (C and D), *Ccr2*<sup>-/-</sup> (D), and *Nr4a1*<sup>-/-</sup> (D) mice.  
 (E) Percentage of IL-10<sup>+</sup> cells within the cell populations as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue product) in CCF4-substrate-loaded cells isolated from IL-10- $\beta$ -lactamase reporter IT1B or WT mice.  
 (F) Basal IL-10 concentration in culture supernatants of primary cell culture.  
 (G) Experimental outline for data in (H).  
 (H) Absolute numbers of the indicated populations in the lungs of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice treated with i.v. PBS-Lips or Clo-Lips.  
 (I) Representative anti-Ly-6C immunostainings of lung sections from Clo-Lip-treated WT mice and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice.

Data in (A)–(C) and (I) represent one of at least six mice from at least three independent experiments. Data in (D) and (H) show the mean + SEM pooled from three independent experiments (n = 6–10 per group). Data in (E) and (F) show the mean + SEM from one of three independent experiments (n = 3–4 per group). p values were calculated with a one-way (D–F) or two-way (H) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant). Scale bars, 10  $\mu$ m. See also Figure S1 for additional information regarding the phenotype, localization, and IL-10 production by lung monocytes and macrophages.



**Figure 2. TLR9-Dependent Expansion of IL-10-Producing IMs upon Intranasal CpG Treatment**

(A) Experimental outline.

(B and C) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT mice 7 days after i.n. stimulation with the indicated TLR ligands or i.n. infection with influenza A or *S. pneumoniae* (B) and *Tlr9*<sup>-/-</sup> and control mice before and 7 days after i.n. injection of CpG (C). Data show mean + SEM and are pooled from three independent experiments (n = 6–12 per group).

(legend continued on next page)

reached 50%. Conversely, because CCR2 is required for the egress of classical monocytes from the BM, WT monocytes constituted more than 90% of the monocytes present in the blood of *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. Lung AMs were not enriched in WT cells, confirming that AMs can self-renew by local proliferation at steady state (Hashimoto et al., 2013). However, 35% of the IM pool was constituted by WT partner cells after 6 months of parabiosis, strongly supporting that IMs are, at least in part, replenished by circulating blood monocytes in adults, a feature shared with gut macrophages (Bain et al., 2014).

IMs constitutively expressed IL-10, as quantified in vivo by the use of IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB mice (Bouabe et al., 2011) and ex vivo by ELISA (Figures 1E and 1F; Figure S1E). Notably, a spontaneous IM-derived IL-10 production was dependent on the adaptor molecule MYD88 but independent of TLR9 (Figure S1F), concordant with the fact that LPS, which mediates signaling through MYD88, sustains IM-derived IL-10 at steady state (Bedoret et al., 2009). Upon CpG or LPS stimulation, the increased ability of IMs to produce IL-10 relied on TLR9 and MyD88 or only MyD88, respectively (Figure S1F).

When applied to the lungs during HDM-induced airway allergy, the flow cytometry strategy identified similar cell populations (Figure S1G).

To determine which cells were truly located in the lung tissue, we depleted blood-vessel-associated monocytes and macrophages by injecting clodronate-containing liposomes (Clo-Lips) intravenously 24 hr before analysis (Figure 1G). This regimen had no effect on AMs or IMs but efficiently depleted patrolling monocytes and a substantial part ( $\approx 60\%$ ) of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes (Figure 1H), showing that most monocytes, except some Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes, were associated with the lung vasculature. Concordant with this, combined in vivo and ex vivo anti-CD45 stainings confirmed that AMs, IMs, and only a fraction of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes were truly located in the lungs of WT mice (Figures S1H and S1I). Anti-Ly-6C immunostaining of lung sections from Clo-Lip-treated WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice confirmed that the Ly-6C<sup>+</sup> cells were located in the lung parenchyma (Figure 1I). Notably, in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, Clo-Lip injection did not affect the amount of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes, whose numbers and localization were similar to those from Clo-Lip-treated WT mice (Figures 1H and 1I), indicating that these monocytes established in the lung independently of CCR2. In the following sections, we refer to these CCR2-independent, lung-infiltrating monocytes, which were already present at the age of 3 days (Figure S1J), as lung monocytes. To assess whether lung monocytes represented a monocyte population distinct from classical CCR2-dependent blood monocytes, we performed a transcriptomic comparison of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes recovered from perfused lung of WT mice ( $\approx 60\%$  of CCR2-dependent classical blood monocytes

and  $\approx 40\%$  of lung monocytes) and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice (more than 95% of lung monocytes). This analysis revealed only one differentially expressed gene, namely *Ccr2* (Figures S1K and S1L), showing that lung monocytes fully corresponded to classical Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes.

### CpG Induces TLR9-Dependent IM Expansion

We hypothesized that exposure to certain PAMPs, such as LPS or CpG, might protect against asthma by enhancing the immunosuppressive potential of IMs. First, we confirmed expression of most TLRs on IMs (Figure S2A) and assessed how local exposure to PAMPs, especially TLR ligands, or a local infection would quantitatively affect IMs (Figure 2A; Figure S2B). Although several PAMPs, including LPS, were able to significantly expand IMs, CpG was by far the most potent in increasing IM numbers 1 week after a single intranasal (i.n.) exposure (42.5-fold with an average of  $1.7 \times 10^6$  cells) (Figure 2B; Figure S2C), a phenomenon that was dependent on signaling through TLR9 (Figure 2C). Such expansion persisted up to 8 weeks after treatment, was also observed to a lesser extent when CpG was administered by a systemic route, and was associated with the presence of a small fraction of CpG IMs into the BALF (Figures S2D–S2G). Conversely, pulmonary infection with *Influenza A virus* (PR8) or *Streptococcus pneumoniae* did not have any significant effect on IM numbers 7 days after infection (Figure 2B). Of note, AM counts remained unchanged after CpG treatment and were moderately increased after LPS treatment (Figures S2H and S2I).

We compared gene expression profiles between CpG IMs and steady-state IMs (SS IMs). Principal-component analysis (PCA) revealed that CpG IMs clustered more closely with SS IMs than with AMs (Figure 2D), but 285 genes were differentially regulated between CpG IMs and SS IMs (fold change  $> 2$ ,  $p < 0.01$ ). Among genes upregulated in CpG IMs, gene-set enrichment analysis (GSEA) revealed a significant enrichment of genes implicated in macrophage activation and differentiation, such as targets of c-MYC (Aziz et al., 2009) or genes upregulated by activation of mTORC1 or NOTCH signaling (Covarrubias et al., 2016; Monsalve et al., 2009) (Figure 2E).

Protein expression of several surface markers was comparable between CpG IMs and SS IMs, except for CD11b and CD115, which were upregulated in CpG IMs, and for CD62L, SiglecF, and CD169, which were downregulated (Figure S2J).

Functionally, in comparison with SS IMs, CpG IMs exhibited a hypersuppressive profile. Indeed, the percentage of IL-10<sup>+</sup> cells within CpG IMs was increased, leading to a 55-fold increase in the numbers of IL-10-producing IMs upon CpG treatment (Figures 2F and 2G). Furthermore, the level of IL-10 expression within CpG IMs was substantially greater than that in SS IMs (Figures 2F and 2G), leading to a global 550-fold increase in

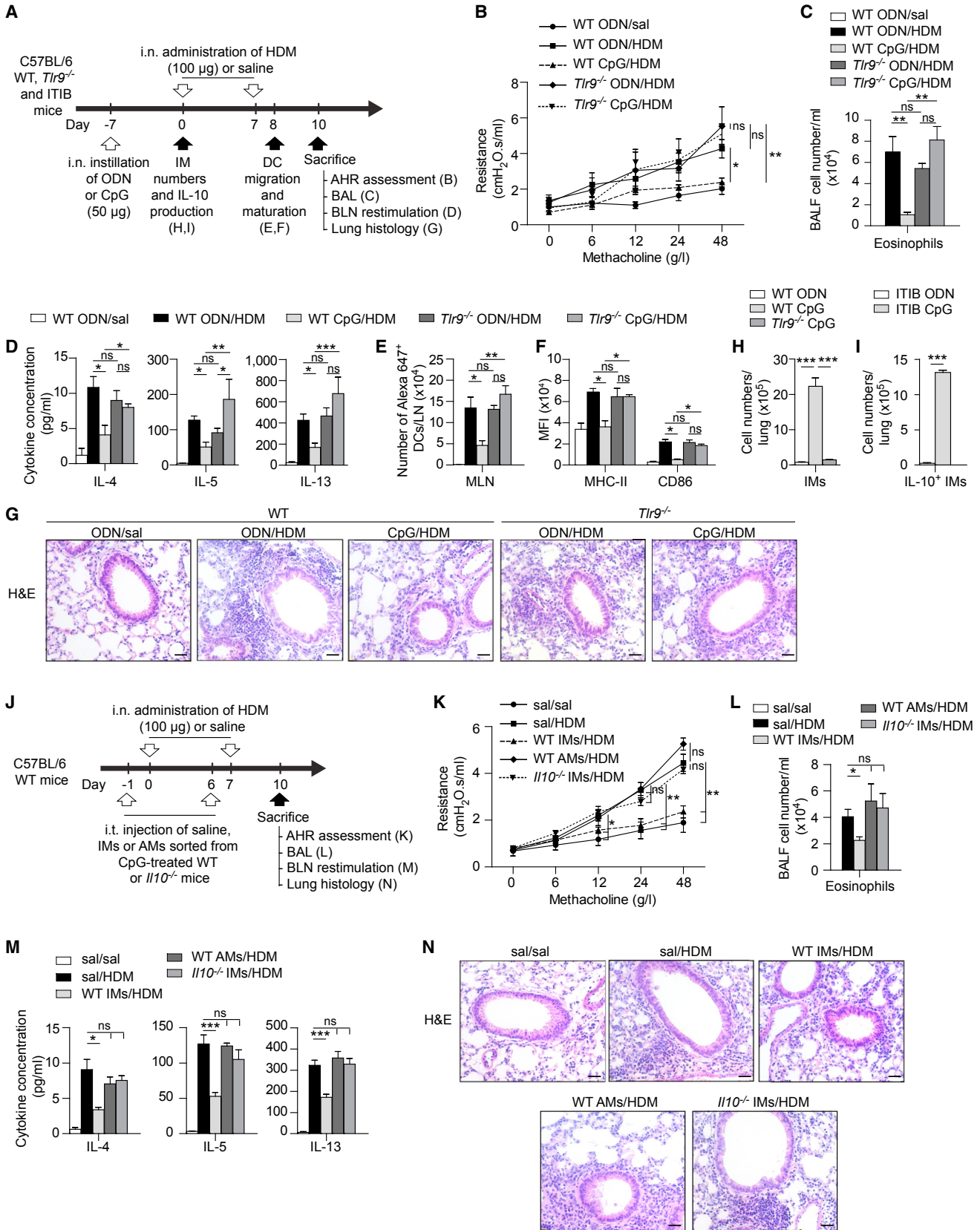
(D) PCA comparing SS IMs, CpG IMs, and AMs. Percentages indicate the variability explained by each component.

(E) GSEA between CpG IMs and defined gene sets.

(F) Density plots showing IL-10 expression of IMs as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue product) in CCF4-substrate-loaded cells isolated from IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB or WT mice. Numbers indicate the percentage of IL-10<sup>+</sup> cells within the population, quantified in (G).

(G) Percentages (left), numbers (middle), and geometric mean fluorescence intensity (MFI, right) of IL-10<sup>+</sup> cells within the cell populations. Data show the mean  $\pm$  SEM and represent one of two independent experiments ( $n = 3\text{--}4$  per group).

p values were calculated with a one-way (B and G) or two-way (C) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant). Abbreviations: D, day; PFU, plaque-forming units; and CFU, colony-forming units. See also Figure S2 for additional information regarding IM numbers, localization, phenotype, and AM numbers.



(legend on next page)

the amount of IM-derived IL-10 expressed in the lungs after CpG treatment. LPS stimulation did not promote such an enhanced suppressive profile (Figures 2F and 2G).

All together, our data show that IMs specifically expanded in response to CpG exposure and that CpG IMs acquired distinct transcriptomic, phenotypic, and functional features.

### CpG-Induced IMs Prevent Allergic Sensitization to Inhaled Allergens

We wondered whether the hypersuppressive profile of CpG IMs might contribute to the protective effects of CpG on asthmatic sensitization. First, we developed a mouse model of asthma prevention by CpG, during which WT mice were intranasally exposed to CpG 7 days before two weekly i.n. instillations of 100  $\mu$ g HDM (Figure 3A). This regimen of HDM exposure bypassed the regulatory functions of SS IMs, given that 100% of HDM-exposed WT mice developed airway hyperreactivity (AHR), BALF eosinophilia, HDM-specific lymph node (LN) Th2 responses, peribronchial inflammation, and increased mucus production, as well as increased activation of lung DCs and enhanced DC migration to the LNs (Figures 3B–3G; Figures S3A and S3B). In this model, CpG pre-exposure promoted robust expansion of IL-10-producing CpG IMs (Figures 3H and 3I) and protected WT mice, but not *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice, from HDM-induced asthmatic features and DC activation (Figures 3B–3G; Figures S3A and S3B).

Second, to test whether CpG IMs were sufficient to confer such protection, we performed adoptive-transfer experiments (Figure 3J). AHR, eosinophilia, HDM-specific Th2 responses, lung inflammation, and mucus production were significantly reduced when CpG IMs sorted from lungs of CpG-treated WT mice were transferred before HDM exposures (Figures 3K–3N; Figures S3C and S3D). Such protection was specific to CpG IMs and relied on CpG-IM-derived IL-10, given that transfer of WT AMs or *Il10*<sup>-/-</sup> CpG IMs failed to improve the characteristic features of asthma (Figures 3J–3N; Figures S3C and S3D).

These results demonstrate that IL-10-producing IMs were essential for the protective effects of CpG against sensitization to inhaled allergens.

### CpG-Induced IMs Mediate the Immunotherapeutic Effects of CpG on Established Asthma

CpG has already proven its efficacy in attenuating established asthma in animal models and in human clinical trials. Here, we developed a model of immunotherapy based on CpG treatment of HDM-sensitized WT mice before HDM challenge (Figure 4A).

CpG was more potent in expanding IL-10-producing CpG IMs and in decreasing AHR, eosinophilic inflammation, HDM-spe-

cific Th2 responses, mucus production, and DC activation than in sham-treated asthmatic counterparts, features that were not observed in *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice (Figures 4B–4I; Figures S4A and S4B). Moreover, CpG IMs were sufficient to confer protection, given that adoptive transfer of CpG IMs before HDM challenge markedly decreased airway allergy in HDM-sensitized mice, an effect that was not observed when WT AMs or *Il10*<sup>-/-</sup> CpG IMs were transferred (Figures 4J–4N; Figures S4C and S4D). Importantly, the expansion of IL-10-producing IMs and the immunotherapeutic effects of CpG persisted up to 8 weeks after CpG treatment (Figures S4E–S4L). Moreover, similar CpG-induced IM-mediated protection was observed in an asthma model based on systemic sensitization with ovalbumin and alum (Figures S4M–S4Q).

### CpG Expands IMs Mainly from CCR2-Independent Monocytes

Given the crucial contribution of CpG IMs to asthma prevention and treatment in our models, we sought to determine the origin of these macrophages. In adult tissues, macrophages are maintained or expanded by local proliferation or differentiation from CCR2-dependent BM-derived classical monocytes (Ginhoux and Guilliams, 2016).

First, to assess the proliferative ability of IMs, we analyzed the incorporation of EdU by IMs after CpG treatment. CpG exposure did not increase the percentage of EdU<sup>+</sup> IMs at the time points analyzed, providing no support for local proliferation of IMs after CpG treatment (Figure 5A).

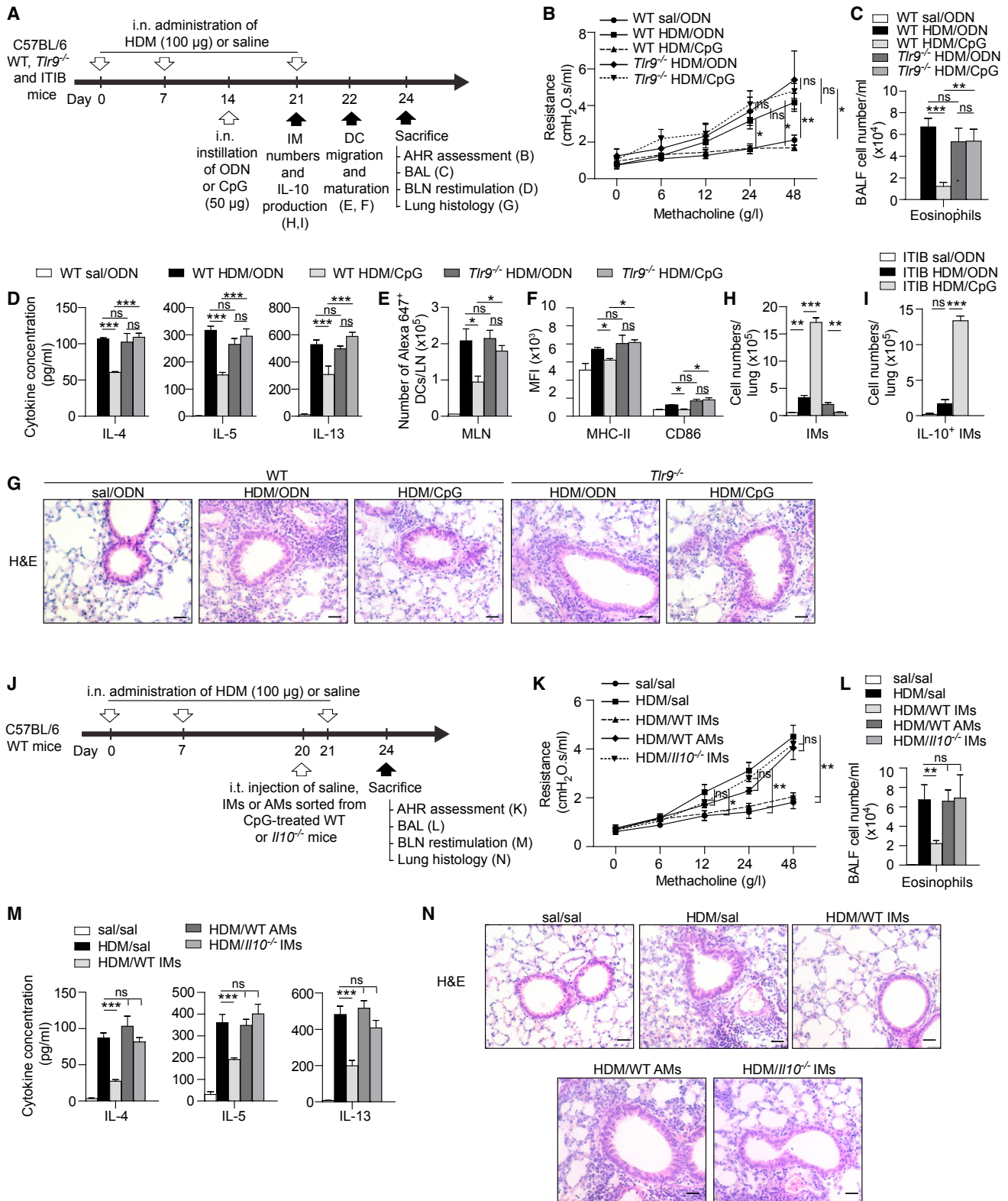
Second, we quantified the numbers of CpG IMs in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. Surprisingly, CpG IM numbers were only slightly decreased in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 5B), whereas LPS IM numbers were robustly reduced (Figure S5A), supporting the idea that CpG IMs, unlike LPS IMs, developed mostly from monocytes that were recruited independently of the BM. To test this, we used mixed BM competitive CD45.1/2 chimeras engrafted with CD45.1<sup>+</sup> WT and CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> BM cells (Figure 5C). 8 weeks after reconstitution, >85% of blood Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes were of CD45.1<sup>+</sup> WT origin, whereas B lymphocytes and neutrophils had a 1:1 ratio of CD45.1<sup>+</sup> WT to CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> cells (Figures 5D and 5E). 8 and 12 weeks after reconstitution, the numbers of lung AMs and IMs were comparable with those before irradiation (Figures S5B and S5C) and originated mainly from CD45.1<sup>+</sup> WT donor cells, showing that the depleted niches were repopulated by CCR2-dependent classical monocytes after irradiation (Figures 5D–5F). 7 days after CpG treatment, BM-competitive chimeras exhibited increased IM numbers (Figures S5B and S5C), and this expansion was associated with a drastic enrichment of CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> donor

#### Figure 3. Contribution of CpG IMs to the Prevention of Experimental Asthma

(A–I) Experimental outline (A), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (B), BALF eosinophil counts (C), cytokine concentrations in culture supernatants of bronchial LN (BLN) cells restimulated with HDM (D), quantification of lung DC migration to the BLN (E) and expression of MHC-II and CD86 at day 8 (F), H&E staining of lung sections (G), and numbers of CpG IMs (H) and IL-10<sup>+</sup> CpG IMs (I) at day 0.

(J–N) Experimental outline (J), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (K), BALF eosinophil counts (L), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (M), and H&E staining of lung sections (N).

Data show the mean + SEM (B and K) or mean + SEM and are pooled from at least three independent experiments (n = 6–16 per group) (C–F, H, I, L, and M) or represent one of two independent experiments (n = 4 per group) (H and I). p values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (B–F, H, and K–M) or a two-tailed Student's t test (I) (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant). Data in (G) and (N) represent one of at least six mice from at least two independent experiments. Scale bars, 32  $\mu$ m. See also Figure S3 for periodic-acid-Schiff (PAS) stainings.



**Figure 4. Contribution of CpG IMs to the Treatment of Experimental Asthma**

(A–I) Experimental outline (A), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (B), BALF eosinophil counts (C), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (D), quantification of lung DC migration to the BLN (E) and expression of MHC-II and CD86 at day 22 (F), H&E staining of lung sections (G), and numbers of CpG IMs (H) and IL-10<sup>+</sup> CpG IMs (I) at day 21.

(legend continued on next page)



cells to the level of that observed in blood B lymphocytes, namely 100% of CCR2 independence when mice were analyzed at 12 weeks of age (Figures 5D–5F). These results demonstrate that CpG IMs mainly arose from CCR2-independent precursors. Notably, when chimeric mice were exposed to LPS, IM chimerism was not substantially affected and was similar to that of blood Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes, demonstrating that LPS IMs arose from BM-derived classical monocytes (Figures S5D and S5E).

All together, these results support that CpG IMs neither expanded through local proliferation nor substantially differentiated from CCR2-dependent BM-derived classical monocytes but instead mainly originated from CCR2-independent cells.

### Lung and Splenic Monocytes Are the Precursors of CpG IMs

Earlier in this article, we defined lung monocytes as CCR2-independent classical monocytes infiltrating the lung parenchyma (Figure 6A). Given that IM expansion upon CpG sensing was mainly independent of CCR2, we hypothesized that lung monocytes could act as a local reservoir for CpG IMs.

First, we validated the CCR2 independence of lung monocytes by conducting parabiosis and mixed-BM-chimera experiments. CD45.1<sup>+</sup> WT and CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice exchanged their circulation for 6 months, and the enrichment of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> partner cells within the *Ccr2*<sup>-/-</sup> and WT hosts, respectively, was analyzed 24 hr after intravenous (i.v.) Clo-Lip treatment (Figure 6B). Notably, for lung monocytes, a comparable enrichment of partner cells was observed in WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> hosts (Figure 6B), indicating that these cells were continually replenished by circulating cells independently of CCR2. In BM-reconstituted competitive chimeras, lung monocytes were also repopulated with CCR2-independent engrafted cells, consistent with our findings in parabiotic mice (Figures 6C–6E; Figures S6A and S6B).

Our data so far are consistent with the idea that a precursor-product relationship could exist between lung monocytes and CpG IMs. When we analyzed the kinetics of the appearance of CpG IMs in vivo, we observed a differentiation pattern from Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> to Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup> cells in both WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 6F). With the progressive acquisition of CD64 and the subsequent loss of Ly-6C, the Ly-6C/CD64 plot looked like a waterfall (arrows in Figure 6F), suggesting that lung monocytes might give rise to CpG IMs.

Next, we tested whether lung monocytes could respond to CpG and differentiate into IM-like cells ex vivo. Lung monocytes sorted via fluorescence-activated cell sorting (FACS) expressed higher levels of *Tlr9* than did AMs or IMs (Figure 6G) and were able to respond to CpG, as shown by increased phosphorylation of Erk kinase (Häcker et al., 1999) (Figure 6H). Ex vivo CpG treatment of lung monocytes promoted their survival and triggered

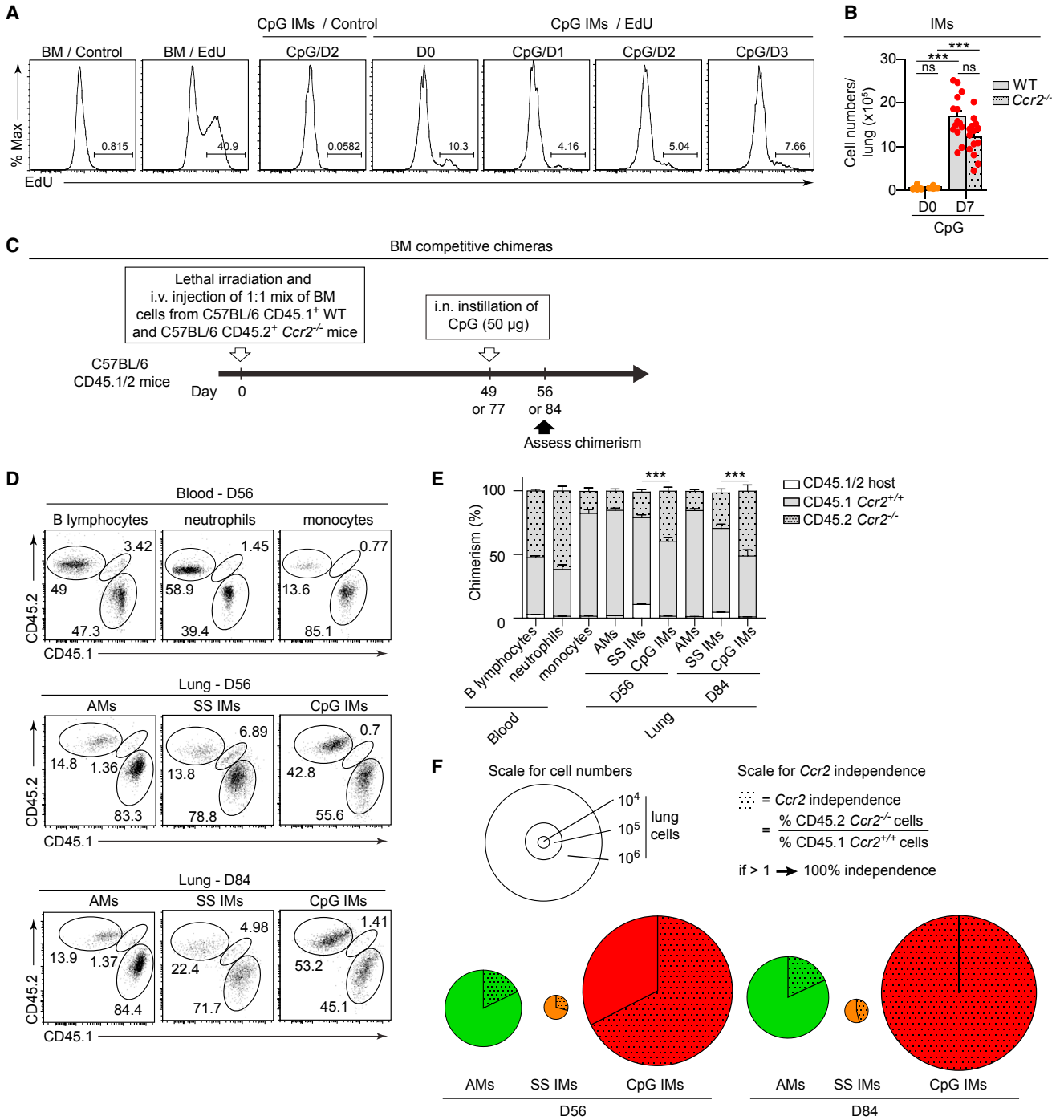
the same waterfall over time as in vivo treatment did (Figures 6I and 6J), a phenomenon that was dependent on TLR9 (Figure S6C). Of note, this waterfall was not observed in LPS-stimulated lung monocytes (Figure S6D). Our data thus support that lung monocytes can differentiate into CpG IMs. Nevertheless, the quantity of lung Ly-6C<sup>hi</sup> cells and CpG IMs 1 and 7 days after CpG treatment, respectively (Figures 6K and 5B), largely exceeded the number of lung monocytes present at steady state (Figure 1H). We thus tested whether such lung monocytes were able to proliferate in situ, but no increase in EdU incorporation was detected 1 day after CpG treatment (Figure 6L; Figure S6E), when their numbers were >10-fold higher than on day 0 in both WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice (Figure 6K). Of note, after LPS treatment, this increased number of Ly-6C<sup>hi</sup> cells was seen only in WT mice and not in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, adding further support to the BM origin of LPS IMs (Figure S6F). These results suggest that, specifically upon CpG stimulation, additional CCR2-independent monocytes were recruited from a distal reservoir and differentiated into CpG IMs.

Interestingly, the spleen has been shown to constitute a reservoir of CCR2-independent monocytes, which were already present in 3-day-old mice (Figure S7A) and which can migrate to inflammatory tissues in an angiotensin II type 1 (AT-1)-receptor-dependent manner (Swirski et al., 2009). Splenic monocytes expressed higher levels of *Tlr9* than did AMs (Figure 7A), and, like for lung monocytes, ex vivo CpG stimulation promoted their survival and differentiation into CpG-IM-like cells (Figure 7B), showing that they can respond to CpG. Notably, 1 day after i.n. CpG treatment, splenic monocyte numbers were significantly decreased, which was associated with an increase in Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in the lungs of both WT mice and mice lacking AT-1 receptor (*Agtr1a*<sup>-/-</sup>) (Figures 7C and 7D). To assess the exact contribution of splenic monocytes to the pool of lung monocytes and CpG IMs, we quantified their numbers 1 and 7 days after CpG treatment, respectively, in splenectomized *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. As shown in Figures 7E and 7F, the pools of lung monocytes and CpG IMs were significantly reduced when the spleen was absent. SS IM numbers were unaffected by splenectomy (Figure 7F). Thus, the spleen constitutes a reservoir of monocytes that can seed the lung independently of angiotensin signaling and differentiate into CpG IMs.

Of note, when injected subcutaneously in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, CpG induced recruitment of monocytes not only in the lung but also in other organs such as the heart and liver. However, except in the lung, this was not associated with an increase in macrophage numbers 7 days later. Conversely, i.n. CpG injection in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice promoted the recruitment of monocytes in the lung, but not in the heart or liver (Figures 7G and 7H). All together, these data suggest that CpG could mobilize CCR2-independent monocytes but that additional lung-specific signals directed their seeding into the lung and their differentiation into regulatory IMs.

(J–N) Experimental outline (J), dynamic airway resistance upon methacholine inhalation (K), BALF eosinophil counts (L), cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM (M), and H&E staining of lung sections (N).

Data show the mean + SEM (B and K) or mean + SEM and are pooled from at least three independent experiments (n = 6–16 per group) (C–F, H, I, L, and M) or represent one of two independent experiments (n = 4 per group) (H and I). p values were calculated with one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant). Data in (G) and (N) represent one of at least six mice from at least two independent experiments. Scale bars, 32 μm. See also Figure S4 for PAS stainings, the long-term therapeutic model, and the assessment of the protective effects of CpG IMs in an ovalbumin and alum model.



**Figure 5. Level of Dependence of CpG IMs on CCR2**

(A) IM incorporation of i.p. EdU injection 24 hr before each time point was assessed at day 0 and 1, 2, or 3 days after i.n. CpG treatment of WT mice. BM cells were used as controls. Numbers indicate the percentage of EdU<sup>+</sup> cells. Results represent one of at least five mice from two independent experiments.

(B) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice before and 7 days after i.n. CpG treatment (50 µg).

(C) Experimental outline for experiments using mixed BM competitive chimeras shown in (D)–(F).

(D) Dot plots showing the percentage of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> BM-derived cells and host radio-resistant cells within the indicated populations.

(E) Percentage of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations.

(F) Pie charts depicting the average absolute cell number (surface area) and the CCR2 independence (dotted area) in the indicated cell populations.

(legend continued on next page)

In an attempt to identify the chemokines involved in splenic monocyte recruitment, we performed a chemokine array on lung extracts and found that CpG instillation induced increased levels of several chemokines, an effect that was, however, also observed with LPS (Figures 7I and 7J). Among those chemokines, CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), and CCL9 (MIP-1 $\gamma$ ) were not only the most prominent ones but also the ones whose receptors (i.e., CCR2, CCR5, and CCR1, respectively) were the most expressed in Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes (Figures 7I–7K). To assess the potential role of these chemokines, we used neutralizing antibodies *in vivo*. Individual or combined inhibition of CCL2, CCL5, and CCL9, however, did not influence the numbers of lung monocytes in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice 1 day after CpG treatment (Figures S7B–S7D), suggesting that splenic monocytes were attracted to the lung independently of those signals.

## DISCUSSION

We have shown that IMs substantially expanded in response to CpG, which, unlike LPS, has demonstrated consistent anti-allergic effects in humans and animals (Beeh et al., 2013; Broide et al., 1998; Creticos et al., 2006; Krieg, 2006; Sur et al., 1999). Not only were CpG IMs 42 times more numerous than SS IMs, but their overall IL-10 production was also increased 550-fold. This increased regulatory capacity of CpG IMs was associated with protection against asthma sensitization and exacerbation in experimental models in which the suppressive activity of SS IMs was overcome. Using WT mice adoptively transferred with WT or *Il10*<sup>-/-</sup> CpG IMs and *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice, in which CpG-mediated IM expansion was abolished, we further demonstrated that CpG IMs were not only necessary but also sufficient for mediating the protective effects of CpG through the production of IL-10. Finally, we showed that the number of CpG IMs remained elevated for at least 8 weeks after CpG administration, which, in addition to the fact that CpG has been reported to induce sustained epigenetic modifications in macrophages (Ostuni et al., 2013), could account for the long-lasting innate effects of CpG. Given that SS IMs exert their suppressive activity by inhibiting maturation and migration of lung DCs (Bedoret et al., 2009), which are essential for both development and restimulation of Th2 cells (Lambrecht et al., 2000; van Rijt et al., 2005), and that DC activation was dampened in CpG-treated HDM-challenged mice, we speculate that CpG durably reinforces the ability of IMs to control DC function and, therefore, to break the link between innate and adaptive immunity. This study thus provides a possible mechanism, i.e., induction of hypersuppressive IMs, by which CpG exerts its immunotherapeutic effects in animals and humans and by which exposure to the environmental microbiome, especially to farm dust, which is known to be rich in bacterial DNA (Roy et al., 2003), protects from asthma (Braun-Fahrlander et al., 2002; von Mutius, 2016).

The “mononuclear phagocyte system” model, proposed in 1968 by van Furth and collaborators (van Furth and Cohn,

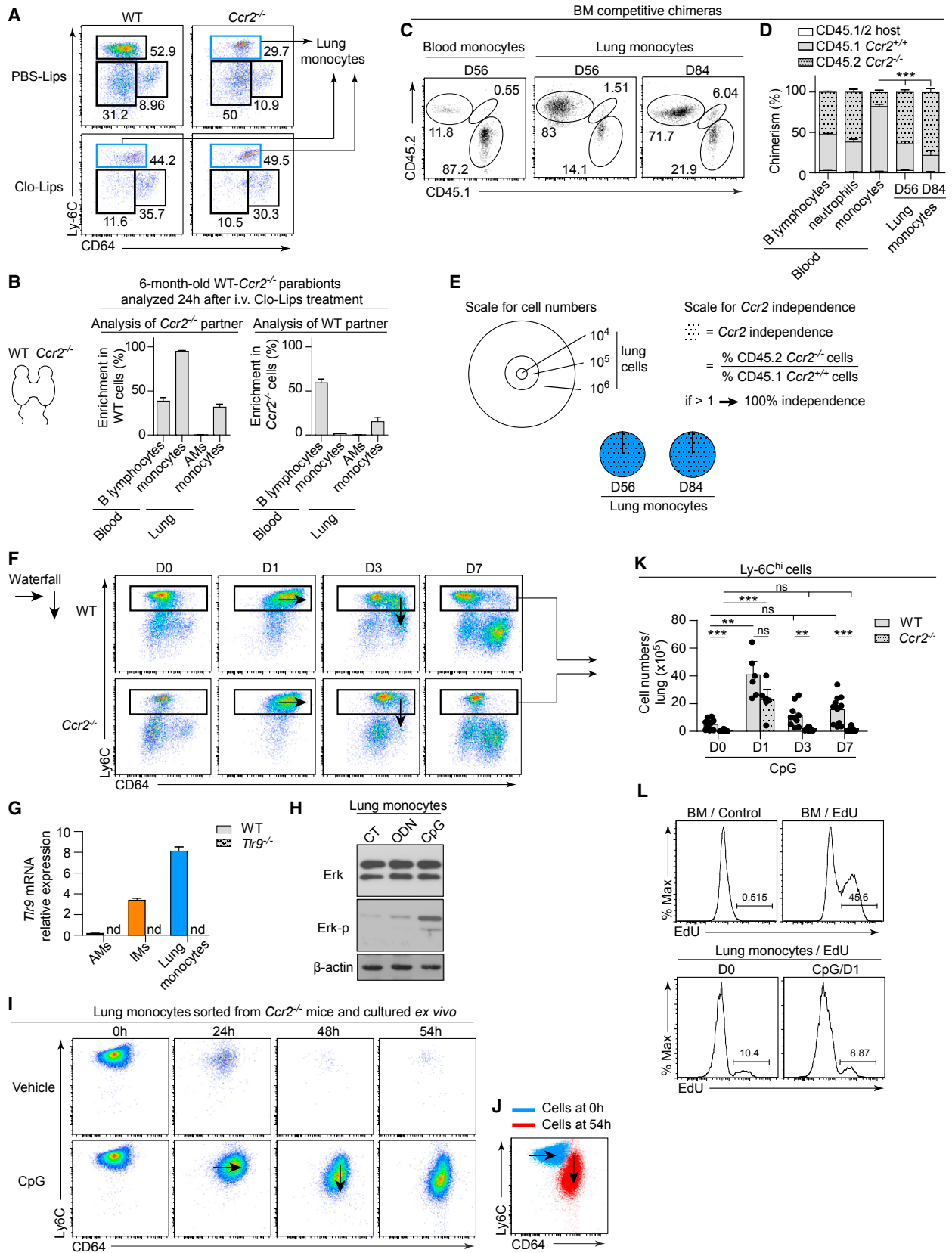
1968), postulates that tissue-resident macrophages are maintained from a constant supply of blood monocytes that extravasate into tissues. However, this model has been challenged by recent studies demonstrating that, under normal conditions, most macrophages arise from embryonic progenitors and self-renew in tissues throughout adulthood (Ginhoux and Guilliams, 2016; Gomez Perdiguero et al., 2015). The only exceptions are gut, dermis, and heart macrophages that, in accordance with the model of van Furth, rely on the constant recruitment of CCR2-dependent classical monocytes to maintain their population (Bain et al., 2014; Epelman et al., 2014; Tamoutounour et al., 2013). Our data from parabiotic mice support that IMs are also, at least in part, maintained by circulating monocytes in adults, as reported recently (Tan and Krasnow, 2016). During inflammation, macrophages expand through the same mechanisms, namely local proliferation and differentiation from recruited CCR2-dependent BM-derived classical monocytes (Davies et al., 2013). Our results from experiments in *Ccr2*<sup>-/-</sup>, clodronate-treated, chimeric, parabiotic, and splenectomized mice are consistent with an unexpected model in which most CpG IMs can expand from CCR2-independent lung and splenic reservoir monocytes after CpG stimulation. In this model, CpG exerts multiple functions. First, it promotes the mobilization of splenic reservoir monocytes to the lung independently of MCP-1, RANTES, and MIP-1 $\gamma$ . Second, it triggers differentiation of not only these recruited monocytes but also the herein identified CCR2-independent, lung-infiltrating monocytes into IMs with a hypersuppressive profile.

Noteworthy, CpG and LPS appeared to have distinct effects on the recruitment of monocytes to the lung and their differentiation into suppressive IMs. First, CpG induced a substantial mobilization of monocytes from the spleen (i.e., a CCR2-independent reservoir), whereas LPS mainly triggered mobilization from the BM (i.e., a CCR2-dependent reservoir). Second, CpG acted directly on monocytes *in vitro* to promote their differentiation into macrophages, whereas LPS did not. Third, CpG exposure was able to strikingly increase IM ability to produce IL-10, which was not the case for LPS. Because CpG and LPS are known to act via distinct TLRs, which are expressed at different levels on different structural and immune cells, CpG and LPS most likely induce distinct biological responses in the spleen, BM, lungs, and monocytes themselves, creating a specific microenvironment tailoring IM origin, differentiation, and function.

Given that the numbers of lung reservoir monocytes were identical in WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, it was tempting to speculate that these cells were different from classical monocytes. However, both cell types had indistinguishable transcriptomes, attesting that lung reservoir monocytes are actually classical monocytes. Although classical monocytes are thought to depend on CCR2 to leave the BM, our results indicate that a fraction of classical monocytes might exit the BM in a CCR2-independent manner to seed the pulmonary and splenic monocyte

(E and F) The percentages of chimerism and of CCR2 independence of blood B lymphocytes, neutrophils (i.e., 50% chimerism and 100% CCR2 independence), and monocytes (i.e.,  $\approx$ 10% chimerism and  $\approx$ 20% CCR2 independence) were used as controls.

Data in (B) and (E) show the mean  $\pm$  SEM and are pooled from three independent experiments ( $n = 12$ – $15$  per group).  $p$  values were calculated with a two-way (B) or one-way (E) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns, not significant). D, day. See also Figure S5 for the CCR2 dependence of LPS IMs and numbers of AMs, SS IMs, LPS IMs, and CpG IMs before irradiation and after BM reconstitution.



(legend on next page)

reservoirs. Identifying the network of chemokine(s) and chemokine receptor(s) orchestrating the traffic of these cells will require additional work.

It has been suggested that the anti-allergic properties of CpG were mediated by plasmacytoid DCs (pDCs), which are known to not only express TLR9 but also play a key role in preventing experimental asthma (de Heer et al., 2004; Krieg, 2006). However, lung pDCs, unlike the other pDC subsets, lack TLR9 expression and therefore cannot account for the role of CpG in regulating lung immune responses (Chen et al., 2006). We have shown here that lung and splenic reservoir monocytes expressed TLR9, which was required for differentiation of CCR2-independent monocytes into IMs after CpG stimulation. Our study thus identifies those reservoir monocytes as the TLR9-expressing cells mediating the immunomodulatory effects of CpG in the lung. Of note, it has been demonstrated that human IMs express TLR9 and are able to increase their production of IL-10 upon bacterial DNA stimulation (Hoppstädter et al., 2010), suggesting that our findings in mice are relevant to humans. Moreover, polymorphisms in the TLR9 promoter region have been associated with an increased risk of asthma development (Lazarus et al., 2003; Smit et al., 2009), supporting the idea that environmental CpG exerts a protective role in humans and that loss of functional TLR9 in human IMs might contribute to asthma development.

In conclusion, our study shows that lung and splenic reservoir monocytes use TLR9 to specifically sense bacterial CpG and massively differentiate into IMs endowed with enhanced anti-allergic properties. These findings are of pathophysiological importance because they provide a possible mechanistic explanation for the hygiene hypothesis and for the protective effects of synthetic CpG in experimental models and human clinical trials. Moreover, they reinforce the idea that therapeutic strategies aimed at ameliorating the inhibitory properties of IMs could help control asthma.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

A full description of the experimental procedures can be found in the [Supplemental Information](#).

### Mice

WT, *Cx3cr1<sup>GFP/+</sup>*, *Ccr2<sup>-/-</sup>*, *Nr4a1<sup>-/-</sup>*, *Myd88<sup>-/-</sup>*, *Il10<sup>-/-</sup>*, and *Agtr1a<sup>-/-</sup>* C57BL/6 mice were from the Jackson Laboratory. *Tlr9<sup>-/-</sup>* and IL-10- $\beta$ -lactamase reporter (ITIB) mice were generated by others (see [Supplemental Information](#)). All mice were used at 6–10 weeks of age unless otherwise indicated. All experimental procedures and protocols were approved by the local ethics committee. Additional information can be found in the [Supplemental Information](#).

### Reagents and Antibodies

Mouse non-CpG DNA (ODN, 5'-GCTTGTGACTCAGCCGGAA-3'; reference no. HC4034) and CpG DNA (5'-TCCATGACGTTCTGATGCT-3'; reference no. HC4033) were from Sanbio. HDM extracts (HDM from *Dermatophagoides farinae*) were from Greer Laboratories. Additional reagents and antibodies are described in the [Supplemental Information](#).

### Cell Isolation, Staining, and Flow Cytometry

To obtain single-lung-cell suspensions, we perfused lungs with 10 mL of PBS through the right ventricle, cut them into small pieces, and digested them for 1 hr at 37°C in HBSS containing 1 mg/mL collagenase A (Roche) and 0.05 mg/mL DNase I (Roche). We then enriched single-cell suspensions in mononuclear cells by harvesting cells from the 1.080:1.038 g/mL interface with a density gradient (Easycoll from VWR).

Cell phenotyping and sorting were performed on a FACSCANTO II and a FACSARIA III (BD Biosciences), respectively. Additional information can be found in the [Supplemental Information](#).

### Vascular Monocyte and Macrophage Depletion

WT or *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice were injected intravenously with 200  $\mu$ L of Clo-Lips or empty liposomes (PBS-Lips), and lung cells were harvested 24 hr later.

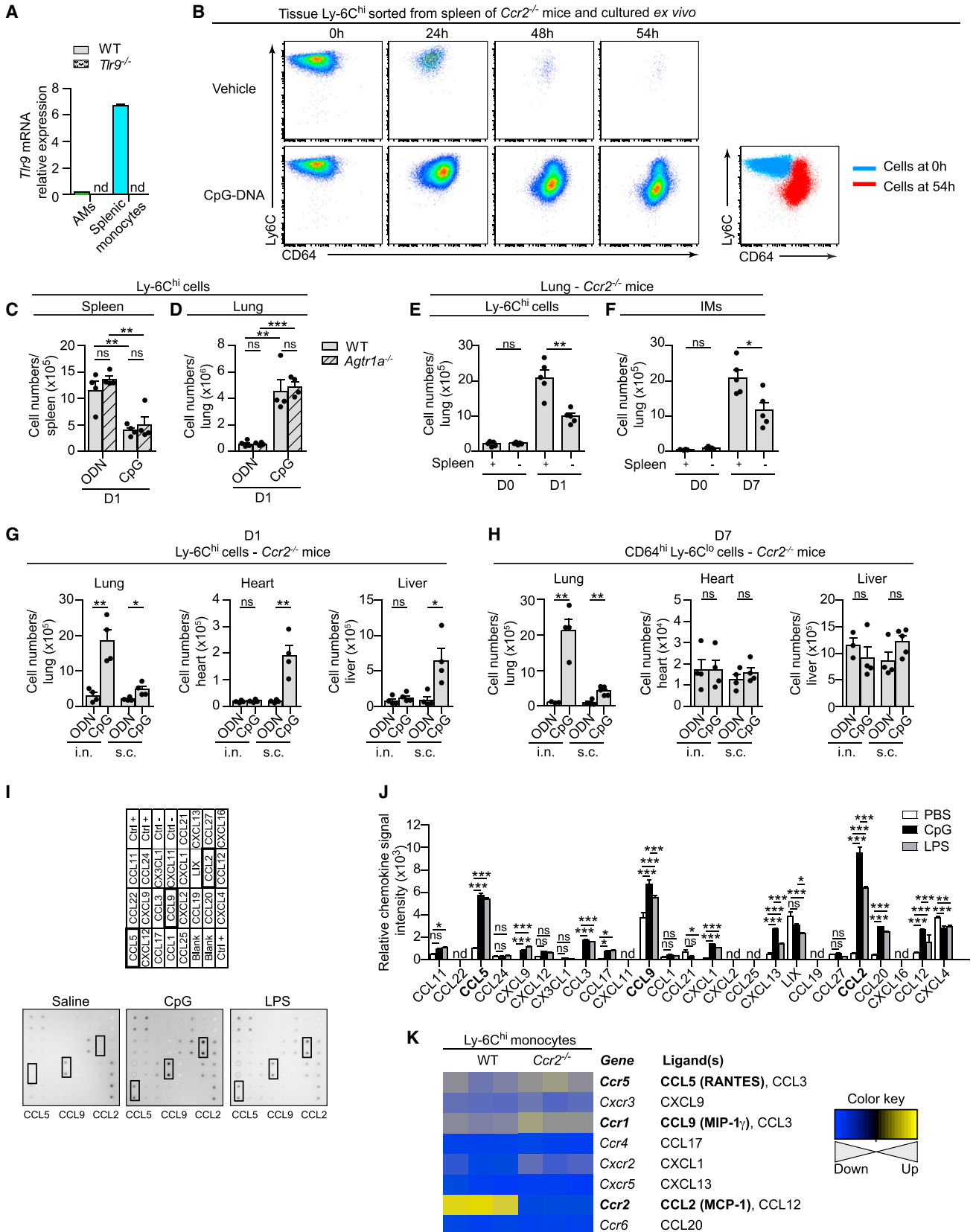
### HDM-Induced Model of Asthma and CpG Treatments

Lightly isoflurane-anesthetized WT, *Tlr9<sup>-/-</sup>*, or ITIB mice were sensitized by two weekly i.n. instillations of vehicle (LPS-free saline) or HDM extracts (100  $\mu$ g in 50  $\mu$ L) on days 0 and 7. In experiments shown in [Figure 3](#), mice received i.n. installation of 50  $\mu$ L saline containing 50  $\mu$ g ODN or 50  $\mu$ g CpG 7 days before the first HDM treatment (day -7) and were sacrificed at day 10. In experiments shown in [Figure 4](#), mice received i.n. installation of 50  $\mu$ L saline containing 50  $\mu$ g ODN or 50  $\mu$ g CpG 7 days after the second HDM treatment (day 14). Mice were then challenged by an i.n. instillation of vehicle or HDM (100  $\mu$ g in 50  $\mu$ L) and were sacrificed at day 24. For adoptive-transfer experiments, WT mice were transferred intratracheally with  $1.5 \times 10^6$  AMs or CpG IMs sorted from CpG-treated WT or *Il10<sup>-/-</sup>* mice or with vehicle (50  $\mu$ L saline) 24 hr before HDM administrations.

## Figure 6. CpG-Induced Differentiation of IMs from TLR9-Responsive CCR2-Independent Lung Monocytes

- (A) Dot plots of lung-associated classical monocytes (Ly-6C<sup>hi</sup>), patrolling monocytes (Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup>), and IMs (Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup>) in the indicated groups (same strategy as in [Figure 1A](#)). The gate in blue represents lung monocytes. Numbers indicate the percentages of gated cells in the subpopulation.
- (B) Analysis of 6-month-old WT *Ccr2<sup>-/-</sup>* parabionts 24 hr after i.v. Clo-Lip treatment. The percentage of enrichment in partner cells within each host is shown. Bar graphs (mean + SEM) show summary data pooled from two pairs of parabionts.
- (C–E) Mixed BM competitive chimeras were analyzed at day 56 or 84, 24 hr after i.v. injection of Clo-Lip. (C) Dot plots showing the percentage of WT and *Ccr2<sup>-/-</sup>* BM-derived cells and host radio-resistant cells within the indicated populations. (D) Percentage of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations. (E) Pie charts depicting the average absolute cell number and the CCR2 independence (dotted area) in the indicated cell populations.
- (F) Waterfall (i.e., differentiation pattern from Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> to Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup> cells) after i.n. CpG treatment in vivo.
- (G) *Tlr9* mRNA expression in AMs, IMs, and lung monocytes sorted from WT or *Tlr9<sup>-/-</sup>* mice.
- (H) Western blot of Erk and phospho-Erk (Erk-p) in lung monocytes sorted from *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice and stimulated ex vivo with saline (CT), ODN, or CpG.
- (I) Waterfall of lung monocytes sorted from *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice and stimulated ex vivo with vehicle or CpG.
- (J) Superposition of dot plots of living lung monocytes before and 54 hr after stimulation with CpG.
- (K) Absolute numbers of lung monocytes in WT and *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice before and 1, 3, and 7 days after i.n. CpG instillation.
- (L) Incorporation of i.p. EdU injection 24 hr before was assessed at day 0 and 1 day after i.n. CpG instillation in *Ccr2<sup>-/-</sup>* mice. WT BM cells were used as controls. Numbers indicate the percentage of EdU<sup>+</sup> cells.

Data in (A), (F), (H), (I), and (L) represent one of at least six samples from three independent experiments. Data in (D), (G), and (K) show the mean + SEM and are pooled from three independent experiments (n = 6–15 per group) (D and K) or two independent sorting experiments (n = 4 samples per group) (G). p values were calculated with a one-way (D) or two-way (K) ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant). D, day. See also [Figure S6](#) for numbers of lung monocytes before irradiation and after BM reconstitution, as well as after LPS treatment, and ex vivo differentiation of LPS- or CpG-stimulated lung monocytes from WT or *Tlr9<sup>-/-</sup>* mice, respectively.



(legend on next page)

We estimated AHR by assessing dynamic airway resistance in anesthetized animals with a FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ). Mice were sacrificed, and BALF, lung, and LN cells were harvested and analyzed as described previously (Marichal et al., 2010).

Additional details can be found in the [Supplemental Information](#).

#### Additional Methods

Methodological details regarding cytologic examination, immunohistochemistry, microarrays, GSEAs, IL-10 detection, generation of mixed BM chimeras and parabiotic mice, EdU incorporation, ex vivo stimulation of tissue monocytes with CpG and LPS, western blot, real-time PCR, splenectomy, chemokine detection, and inhibition are described in the [Supplemental Information](#).

#### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed with R (version 3.2.4). Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel unless otherwise indicated. Raw data were transformed when needed and were back-transformed for graphical presentation. Assumptions of the normal distribution of residuals and homoscedasticity were verified with diagnostic plots. We considered a p value lower than 0.05 to be significant (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant).

#### ACCESSION NUMBERS

The accession number for the microarray data reported in this paper is Array Express: E-MTAB-5012.

#### SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information include Supplemental Experimental Procedures and seven figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.016>.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.B. conceived the project; C.S., C.R., L.F., C.J.D., T.M., and F.B. designed the experiments with help from F.G.; T.M. and F.B. supervised the project; C.S., C.R., and L.F. did most of the experiments and compiled the data; C.F., S.O., and M.T. participated in several experiments; S.C. performed the experiments with parabiotic mice; J.-C.S. provided the *S. pneumoniae* clinical isolate; G.P. performed the immunohistochemistry and helped with histological examinations; X.X., D.P., and L.G. performed the microarray analyses; T.M. and L.F. performed splenectomies; H.B. provided the ITIB mice and helped with experiments involving such mice; D.C. and P.Q. made their equipment and facilities available for AHR measurement and microbial infection, respectively; C.S. and L.F. prepared the figures; T.M. and F.B. wrote the manuscript; and all authors provided feedback on the manuscript.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. François Trottein (Institut Pasteur de Lille) for providing *Influenza A virus*; Prof. Hans Nauwynck (Ghent University) for advice; Dr. Natalia Kosovilka from the Stanford PAN facility; Dr. Sandra Ormenese and Raafat Stephan from the Cell Imaging and Flow Cytometry GIGA Platform; Dr. Pierre Drion and other staff members from the Mouse Facility and Transgenics GIGA Platform; Dr. Chantal Humblet from the GIGA Immunohistology Platform; and Raja Fares, Cédric François, and Ilham Sbai for excellent technical and secretarial assistance. The Laboratory of Cellular and Molecular Immunology is supported by the F.R.S.-FNRS for the FRFS-WELBIO under grant CR-2012S-01R, by the Belgian Program on Interuniversity Attraction Poles (IUAP; T-TIME; P7/39), and by an "Action de Recherche Concertée de la Fédération Wallonie-Bruxelles de Belgique" (12/07-03-ITPKC). C.S. and C.R. are research fellows of the F.R.S.-FNRS, L.F. is supported by the FRFS-WELBIO (CR-2012S-01R), T.M. is supported by the Acteria Foundation, and C.D. and T.M. are research associates of the F.R.S.-FNRS.

Received: August 9, 2016

Revised: December 21, 2016

Accepted: January 24, 2017

Published: March 21, 2017

#### REFERENCES

- Aziz, A., Soucie, E., Sarrazin, S., and Sieweke, M.H. (2009). MafB/c-Maf deficiency enables self-renewal of differentiated functional macrophages. *Science* **326**, 867–871.
- Bain, C.C., Bravo-Blas, A., Scott, C.L., Gomez Perdiguero, E., Geissmann, F., Henri, S., Malissen, B., Osborne, L.C., Artis, D., and Mowat, A.M. (2014). Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat. Immunol.* **15**, 929–937.
- Bedoret, D., Wallemacq, H., Marichal, T., Desmet, C., Quesada Calvo, F., Henry, E., Closset, R., Dewals, B., Thielen, C., Gustin, P., et al. (2009). Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3723–3738.
- Beeh, K.M., Kanniss, F., Wagner, F., Schilder, C., Naudts, I., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Stocker, H., Mueller, P., Bachmann, M.F., and Renner, W.A. (2013). The novel TLR-9 agonist QbG10 shows clinical efficacy in persistent allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 866–874.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J. Immunol.* **187**, 3165–3176.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufe, A., et al.; Allergy and Endotoxin

#### Figure 7. Mobilization of CCR2-Independent Spleen Reservoir Monocytes to the Lung and Differentiation into CpG IMs

- (A) *Tlr9* mRNA expression in splenic monocytes and AMs sorted from WT or *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice.
- (B) Waterfall of splenic monocytes sorted from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and stimulated ex vivo with vehicle or CpG. The right panel shows the superposition of dot plots of living lung monocytes before and 54 hr after stimulation with CpG. Data represent one of at least four samples from two independent experiments.
- (C and D) Absolute numbers of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes in the spleen (C) and lung (D) of WT and *Agtr1a*<sup>-/-</sup> mice 1 day after i.n. CpG treatment. Data show the mean + SEM and represent one of two independent experiments (n = 4 per group).
- (E and F) Absolute numbers of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes (E) or IMs (F) in splenectomized and sham-operated mice before (day 0) and 1 day (E) or 7 days (F) after i.n. CpG treatment.
- (G and H) Absolute numbers of Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes (G) and Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>hi</sup> macrophages (H) 1 day (G) and 7 days (H) after i.n. or subcutaneous ODN or CpG treatment of *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice.
- (I and J) Chemokine array was performed on whole lung proteins extracted 8 hr after i.n. PBS, LPS, or CpG treatment of WT mice. (I) Representative blots depicting the detected signals; the boxes show the most induced chemokines. (J) Quantification of chemokine signal intensity.
- (K) Heatmap showing gene expression of the receptors for chemokines that were significantly induced by CpG in (J).
- Data in (A), (E)–(H), and (J) show the mean + SEM and are pooled from two (A, F–H, and J) or three (E) independent experiments (n = 3–6 per group). p values were calculated with a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; ns, not significant). Ctrl, control; D, day. See also [Figure S7](#) for the numbers of spleen monocytes in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and in vivo chemokine neutralization experiments.

- Study Team (2002). Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N. Engl. J. Med.* **347**, 869–877.
- Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M.D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E.W., and Raz, E. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J. Immunol.* **161**, 7054–7062.
- Chen, L., Arora, M., Yarlagadda, M., Oriss, T.B., Krishnamoorthy, N., Ray, A., and Ray, P. (2006). Distinct responses of lung and spleen dendritic cells to the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide. *J. Immunol.* **177**, 2373–2383.
- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., Yu, J., Snyder, N.W., Worth, A.J., Iyer, S.S., Wang, J., Ben-Sahra, I., Byles, V., Polynne-Stapomkul, T., et al. (2016). Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *eLife* **5**, e11612.
- Creticos, P.S., Schroeder, J.T., Hamilton, R.G., Balcer-Whaley, S.L., Khattignavong, A.P., Lindblad, R., Li, H., Coffman, R., Seyfert, V., Eiden, J.J., and Broide, D.; Immune Tolerance Network Group (2006). Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.* **355**, 1445–1455.
- Davies, L.C., Rosas, M., Jenkins, S.J., Liao, C.T., Scurr, M.J., Brombacher, F., Fraser, D.J., Allen, J.E., Jones, S.A., and Taylor, P.R. (2013). Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat. Commun.* **4**, 1886.
- de Heer, H.J., Hammad, H., Soullié, T., Hijdra, D., Vos, N., Willart, M.A., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2004). Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **200**, 89–98.
- Eder, W., Ege, M.J., and von Mutius, E. (2006). The asthma epidemic. *N. Engl. J. Med.* **355**, 2226–2235.
- Eisenbarth, S.C., Piggott, D.A., Huleatt, J.W., Visintin, I., Herrick, C.A., and Bottomly, K. (2002). Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* **196**, 1645–1651.
- Epelman, S., Lavine, K.J., Beaudin, A.E., Sojka, D.K., Carrero, J.A., Calderon, B., Brija, T., Gautier, E.L., Ivanov, S., Satpathy, A.T., et al. (2014). Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al.; Immunological Genome Consortium (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* **13**, 1118–1128.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* **19**, 71–82.
- Ginhoux, F., and Guillemins, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* **44**, 439–449.
- Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., and Rodewald, H.R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythromyeloid progenitors. *Nature* **518**, 547–551.
- Häcker, H., Mischak, H., Häcker, G., Eser, S., Prenzel, N., Ullrich, A., and Wagner, H. (1999). Cell type-specific activation of mitogen-activated protein kinases by CpG-DNA controls interleukin-12 release from antigen-presenting cells. *EMBO J.* **18**, 6973–6982.
- Hammad, H., Chieppa, M., Perros, F., Willart, M.A., Germain, R.N., and Lambrecht, B.N. (2009). House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat. Med.* **15**, 410–416.
- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C<sup>+</sup> monocytes. *Nat. Immunol.* **12**, 778–785.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M.B., Leboeuf, M., Becker, C.D., See, P., Price, J., Lucas, D., et al. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* **38**, 792–804.
- Hoppstädter, J., Diesel, B., Zarbock, R., Breinig, T., Monz, D., Koch, M., Meyerhans, A., Gortner, L., Lehr, C.M., Huwer, H., and Kiemer, A.K. (2010). Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages. *Respir. Res.* **11**, 124.
- Kline, J.N., Waldschmidt, T.J., Businga, T.R., Lemish, J.E., Weinstock, J.V., Thorne, P.S., and Krieg, A.M. (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. Immunol.* **160**, 2555–2559.
- Kline, J.N., Kitagaki, K., Businga, T.R., and Jain, V.V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **283**, L170–L179.
- Krieg, A.M. (2006). Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 471–484.
- Krieg, A.M. (2012). CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* **22**, 77–89.
- Lambrecht, B.N., De Veerman, M., Coyle, A.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Thielemans, K., and Pauwels, R.A. (2000). Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J. Clin. Invest.* **106**, 551–559.
- Lazarus, R., Klimecki, W.T., Raby, B.A., Vercelli, D., Palmer, L.J., Kwiatkowski, D.J., Silverman, E.K., Martinez, F., and Weiss, S.T. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* **81**, 85–91.
- Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Gorieli, S., Trottein, F., Cataldo, D., Goldman, M., Lekeux, P., Bureau, F., and Desmet, C.J. (2010). Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 836–844.e13.
- Mesnil, C., Raulier, S., Paulissen, G., Xiao, X., Birrell, M.A., Pirotin, D., Janss, T., Starkl, P., Ramery, E., Henket, M., et al. (2016). Lung-resident eosinophils represent a distinct regulatory eosinophil subset. *J. Clin. Invest.* **126**, 3279–3295.
- Monsalve, E., Ruiz-García, A., Baladrón, V., Ruiz-Hidalgo, M.J., Sánchez-Solana, B., Rivero, S., García-Ramírez, J.J., Rubio, A., Laborda, J., and Díaz-Guerra, M.J. (2009). Notch1 upregulates LPS-induced macrophage activation by increasing NF- $\kappa$ B activity. *Eur. J. Immunol.* **39**, 2556–2570.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969.
- Ostuni, R., Piccolo, V., Barozzi, I., Polletti, S., Termanini, A., Bonifacio, S., Curina, A., Prosperini, E., Ghisletti, S., and Natoli, G. (2013). Latent enhancers activated by stimulation in differentiated cells. *Cell* **152**, 157–171.
- Roy, S.R., Schiltz, A.M., Marotta, A., Shen, Y., and Liu, A.H. (2003). Bacterial DNA in house and farm barn dust. *J. Allergy Clin. Immunol.* **112**, 571–578.
- Schuijs, M.J., Willart, M.A., Vergote, K., Gras, D., Deswarte, K., Ege, M.J., Madeira, F.B., Beyaert, R., van Loo, G., Bracher, F., et al. (2015). Farm dust and endotoxin protect against allergy through A20 induction in lung epithelial cells. *Science* **349**, 1106–1110.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* **7**, 311–317.
- Smit, L.A., Siroux, V., Bouzigon, E., Oryszczyn, M.P., Lathrop, M., Demenais, F., and Kauffmann, F.; Epidemiological Study on the Genetics and Environment of Asthma, Bronchial Hyperresponsiveness, and Atopy (EGEA) Cooperative Group (2009). CD14 and toll-like receptor gene polymorphisms, country living, and asthma in adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **179**, 363–368.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259–1260.
- Sur, S., Wild, J.S., Choudhury, B.K., Sur, N., Alam, R., and Klinman, D.M. (1999). Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **162**, 6284–6293.



- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612–616.
- Tamoutounour, S., Guillemins, M., Montanana Sanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., Pollet, E., Ardouin, L., Luche, H., Sanchez, C., et al. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39, 925–938.
- Tan, S.Y., and Krasnow, M.A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development* 143, 1318–1327.
- Thorne, P.S., Kulhánková, K., Yin, M., Cohn, R., Arbes, S.J., Jr., and Zeldin, D.C. (2005). Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1371–1377.
- van Furth, R., and Cohn, Z.A. (1968). The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 128, 415–435.
- van Rijt, L.S., Jung, S., Kleinjan, A., Vos, N., Willart, M., Duez, C., Hoogsteden, H.C., and Lambrecht, B.N. (2005). In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J. Exp. Med.* 201, 981–991.
- von Mutius, E. (2016). The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life. *J. Allergy Clin. Immunol.* 137, 680–689.

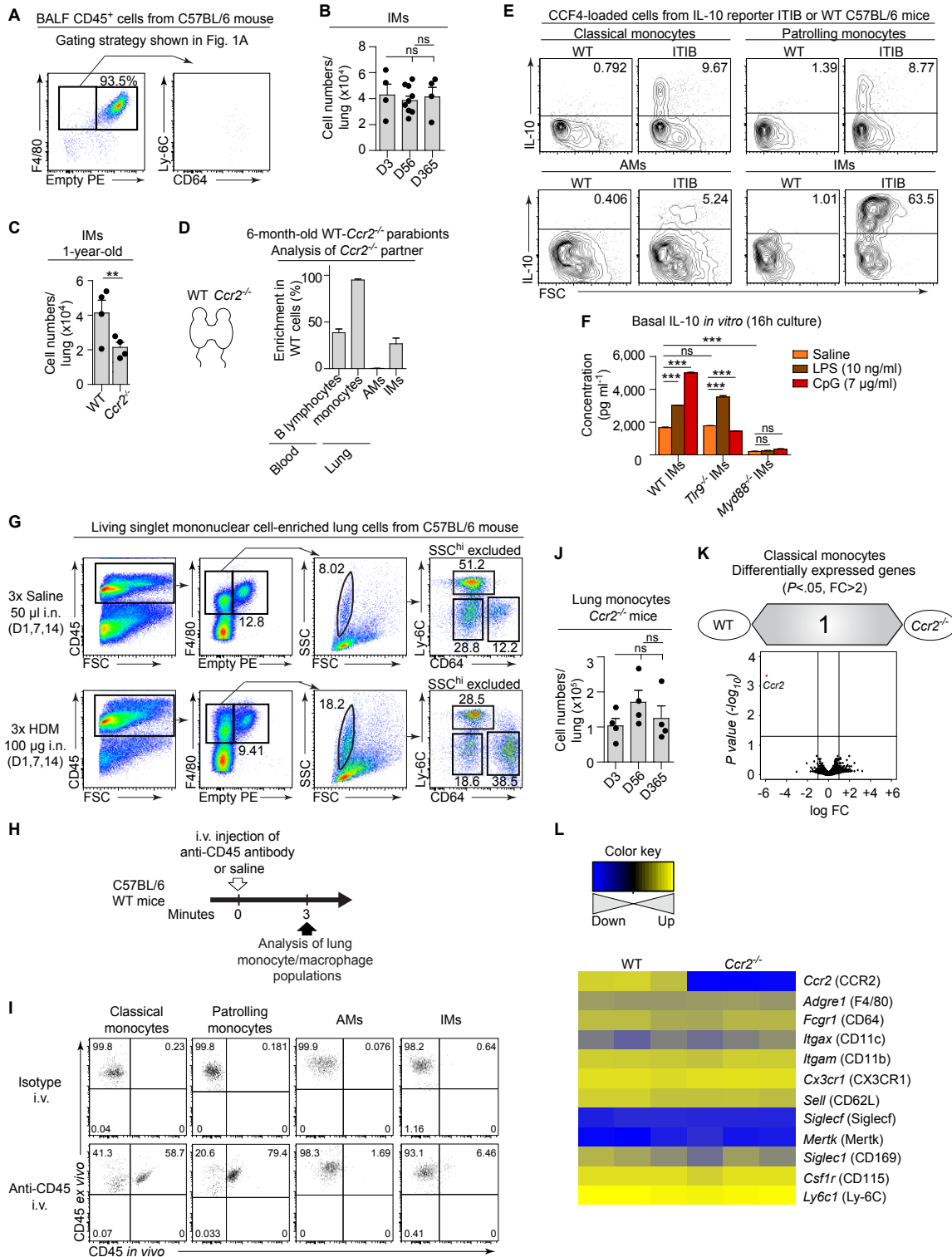
**Immunity, Volume 46**

## **Supplemental Information**

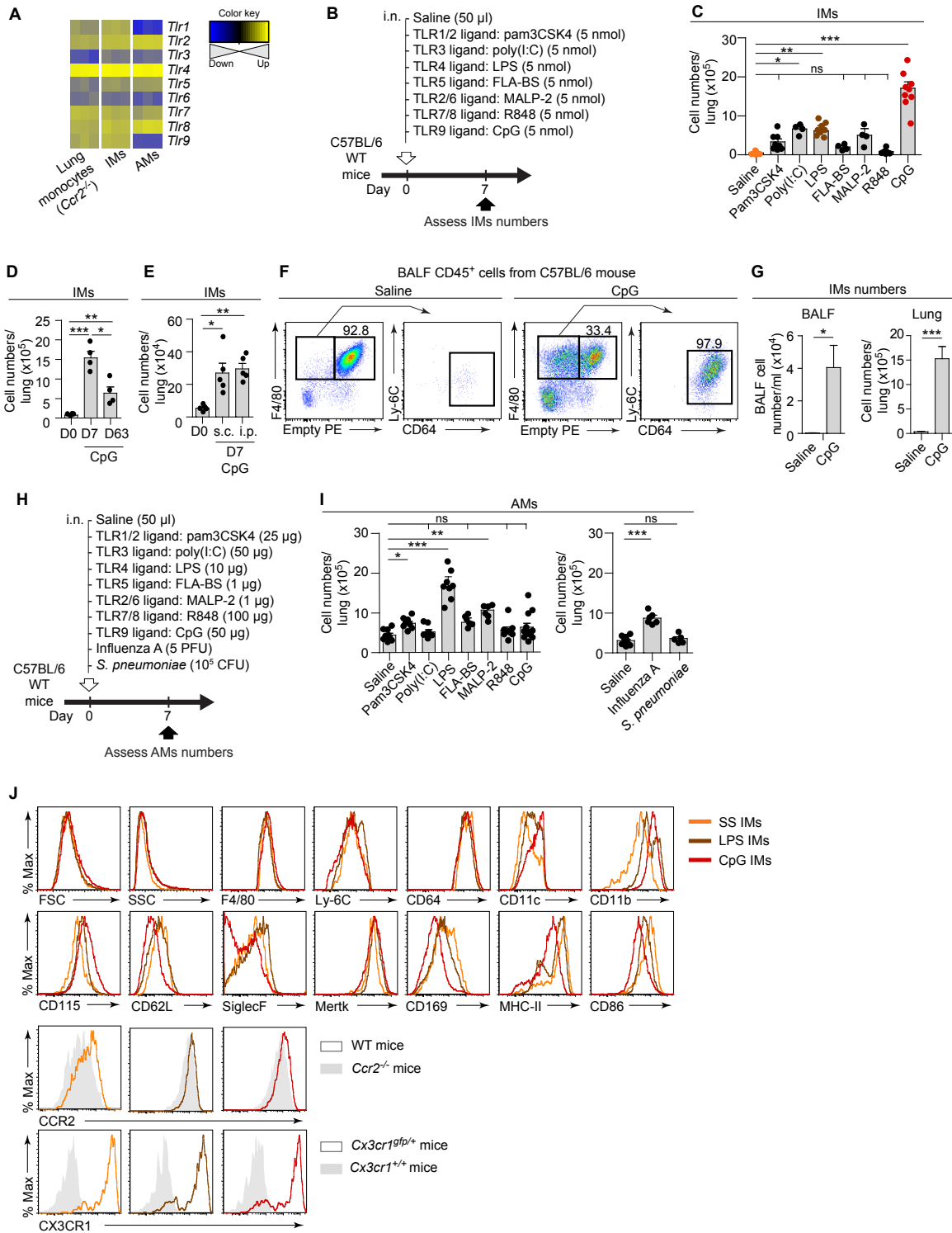
### **Exposure to Bacterial CpG DNA Protects from Airway Allergic Inflammation by Expanding Regulatory Lung Interstitial Macrophages**

**Catherine Sabatel, Coraline Radermecker, Laurence Fievez, Genevieve Paulissen, Svetoslav Chakarov, Claudia Fernandes, Sabine Olivier, Marie Toussaint, Dimitri Pirottin, Xue Xiao, Pascale Quatresooz, Jean-Claude Sirard, Didier Cataldo, Laurent Gillet, Hicham Bouabe, Christophe J. Desmet, Florent Ginhoux, Thomas Marichal, and Fabrice Bureau**

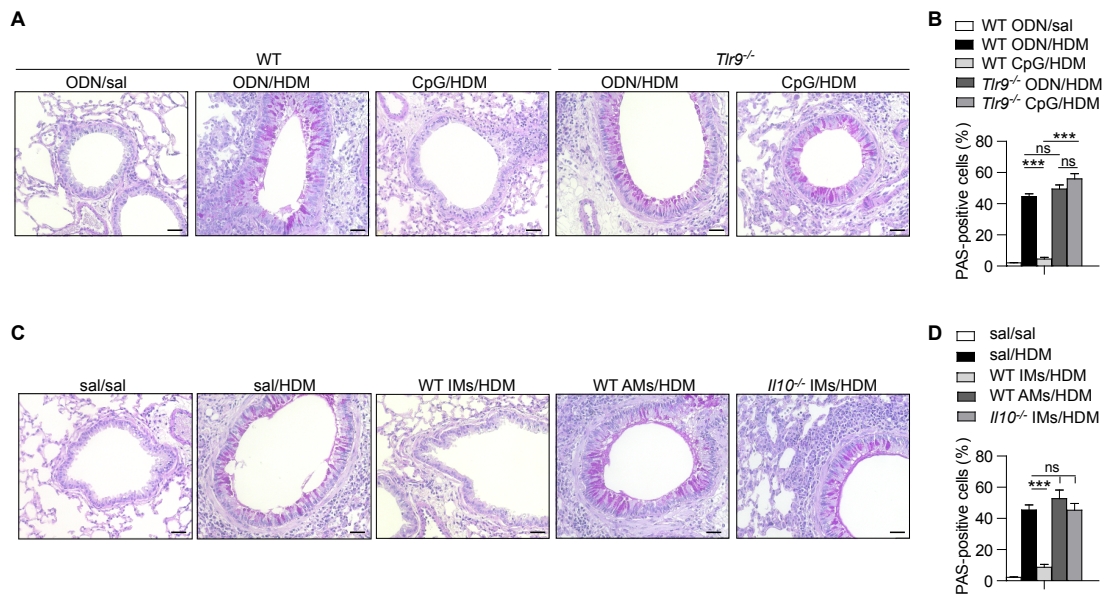
Supplemental Figures and Legends



**Figure S1, related to Figure 1. Identification of monocyte and macrophage populations in the mouse lung: additional analyses.** (A) Analysis of steady-state BALF CD45<sup>+</sup> cells using the gating strategy shown in Figure 1A. >90% of cells are identified as AMs at steady-state. (B-C) Absolute numbers of IMs (B) at different time points after birth in WT mice and (C) in 1-year-old WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. (D) WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were sutured together for 6 months. The % of enrichment in WT partner cells within the *Ccr2*<sup>-/-</sup> host is shown. (E) Density plots showing steady-state IL-10 expression as assessed by detection of 450 nm fluorescence (blue fluorescent product of the CCF4 substrate) in CCF4 substrate-loaded cells isolated from IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB or WT control mice. Numbers indicate % of IL-10<sup>+</sup> cells within the cell populations. (F) IL-10 concentration in culture supernatants of FACS-sorted IMs from WT, *Tlr9*<sup>-/-</sup> or *Myd88*<sup>-/-</sup> mice stimulated with LPS (10 ng ml<sup>-1</sup>) or CpG (7  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) for 16 hours. (G) Gating strategy identifying monocytes and macrophages in the mouse lung (developed in Figure 1A) applied at day 17 to WT mice having received 3 weekly i.n. instillations of saline (50 $\mu$ L) or HDM (100  $\mu$ g in 50  $\mu$ L). (H) Experimental outline for data shown in I. Briefly, APC-conjugated anti-CD45 antibodies were given i.v. 3 minutes before euthanasia, and the indicated cell populations were analyzed by flow cytometry. (I) Representative dot plots showing binding of anti-CD45 *in vivo* vs. anti-CD45 *ex vivo* staining on the indicated populations. (J) Absolute numbers of lung monocytes at different time points after birth in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. (K) Summary of differentially expressed genes (DE) ( $P < 0.05$ , FC  $> 2$ ) showing DE genes in red in volcano plot and the total number of DE genes in the middle of the bidirectional arrows. (L) Heatmap showing relative expression of DE genes of cell surface markers displayed in Figure 1C. (A,E,G,I) Results are representative of 1 of  $\geq 5$  mice coming from  $\geq 2$  independent experiments, each of them giving similar results. (D) Bar graphs (mean + SEM) showing summary data pooled from two pairs of parabionts. (B,C,J) Data shown mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-9/group). (F) Data show mean + SEM and are representative of 1 of 2 independent sorting experiments. *P* values were calculated using (B,J) a one-way or (F) a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests, or (C) a two-tailed Student's *t* test. D, day.

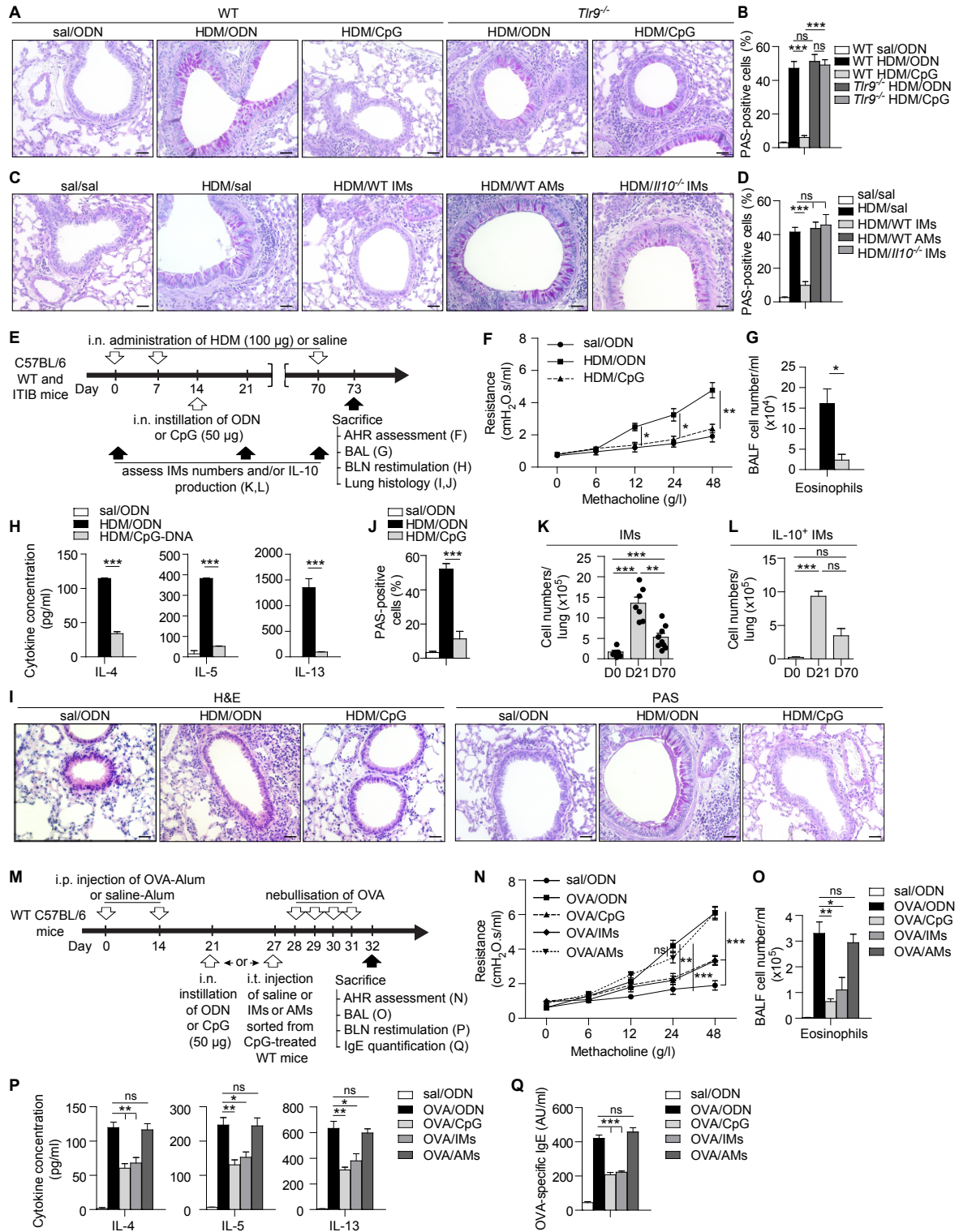


**Figure S2, related to Figure 2. Quantification of IM and AM numbers, and localization and surface phenotype of IMs upon exposure to TLR ligands.** (A) Heatmap showing relative expression of *Tlr* on lung monocytes sorted from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, and AMs and IMs sorted from WT mice. (B) Experimental outline for data shown in C. (C) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT mice 7 days following i.n. stimulation with the indicated doses of TLR ligands (i.e. 5 nmol) (D) Absolute numbers of CpG IMs before and 7 or 63 days after i.n. CpG instillation. (E) C57BL/6 WT mice were injected s.c. or i.p. with 50 µg CpG (in 100 µl and 200 µl, respectively). Seven days later (D7), numbers of IMs were determined in the lung and compared with mice analyzed at D0. (F-G) Quantification of IMs in the BALF of mice i.n. instilled with saline or CpG 7 days earlier. (F) Representative dot plot of BALF CD45<sup>+</sup> cells using the gating strategy shown in Figure 1A. Numbers indicate the % within the CD45<sup>+</sup> BALF cells. (G) Absolute BALF and lung IM numbers. (H) Experimental outline for data shown in I. Briefly, WT C57BL/6 mice were instilled i.n. with 50 µl saline, or 50 µl saline containing the indicated stimulants or pathogens (doses used are shown in brackets). (I) Absolute numbers of AMs in the lungs of C57BL/6 WT mice 7 days after i.n. stimulation with the indicated TLR ligands and i.n. infection with influenza A virus (PR8 strain) or *S. pneumoniae* (serotype 1). (J) Surface phenotype of lung IMs at steady-state (SS IMs) or 7 days after i.n. LPS (LPS IMs) or CpG-DNA (CpG IMs) instillations. (C,E,I) Data show mean + SEM and are pooled from 2-3 independent experiments (n=3-12/group). *P* values were calculated using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests. (D,G) Data show mean + SEM and are representative of 1 of 2 independent experiments (n=4/group). *P* values were calculated using (D) a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests and (G) a two-tailed unpaired Student's *t* test. (F,J) Data are representative of 1 of ≥6 mice coming from (F) 2 or (J) ≥3 independent experiments, each of them giving comparable results. D, day.

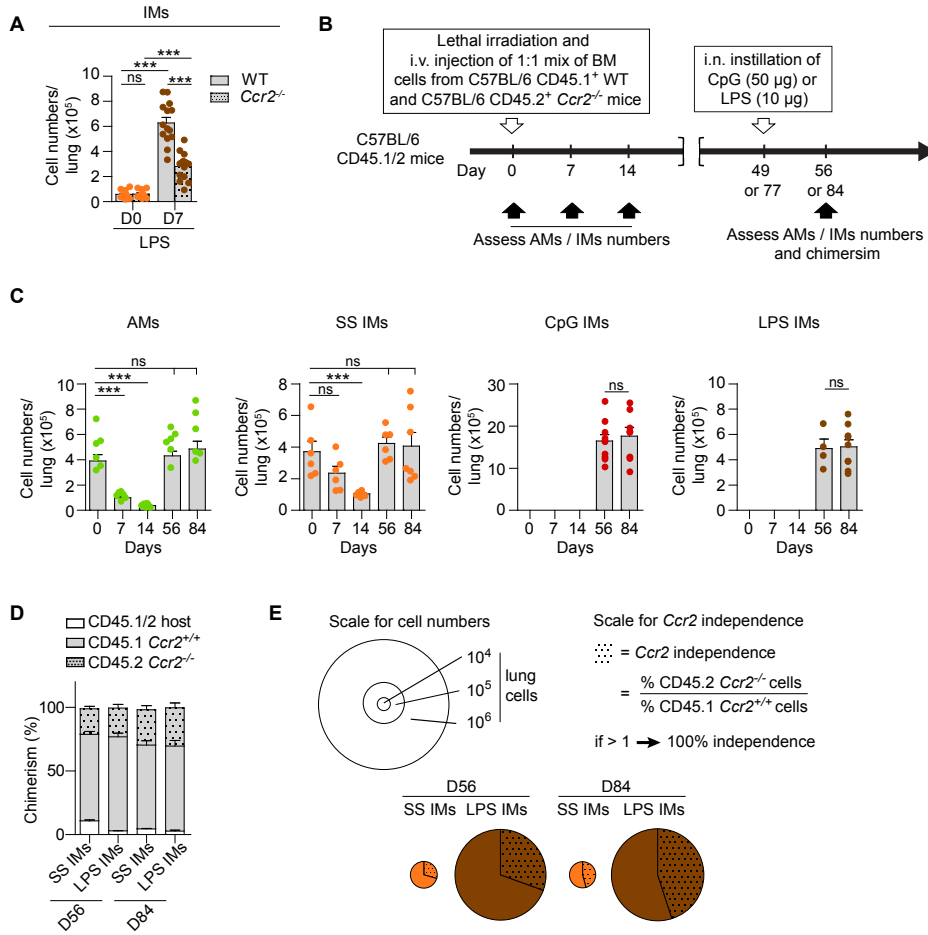


**Figure S3, related to Figure 3. Contribution of CpG IMs to the prevention of experimental asthma: mucus production.** (A-B) Experimental outline is shown in Figure 3A. Briefly, WT C57BL/6 and *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice were instilled i.n. with 50 µg ODN or 50 µg CpG, were sensitized 7 and 14 days later with 100 µg HDM or saline and were sacrificed 3 days later. (A) Representative Periodic Acid-Schiff (PAS) staining of lung sections of the indicated groups of mice. (B) Quantification of mucus production as the % positivity of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells. (C-D) Experimental outline is shown in Figure 3J. Briefly, WT C57BL/6 were transferred i.t. on day -1 and 6 with saline or 1.5.10<sup>6</sup> AMs or CpG IMs sorted from WT or *Il10*<sup>-/-</sup> mice, sensitized 1 day later with 100 µg HDM or saline and sacrificed 3 days after the second sensitization. (C) PAS staining of lung sections of the indicated groups of mice. (D) Quantification of mucus production as the % positivity of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells. (A and C) Data are representative of one of ≥6 mice analyzed, each of them giving comparable results. (B and D) Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-6 mice/group). *P* values were calculated using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests. Scale bar: 32 µm.

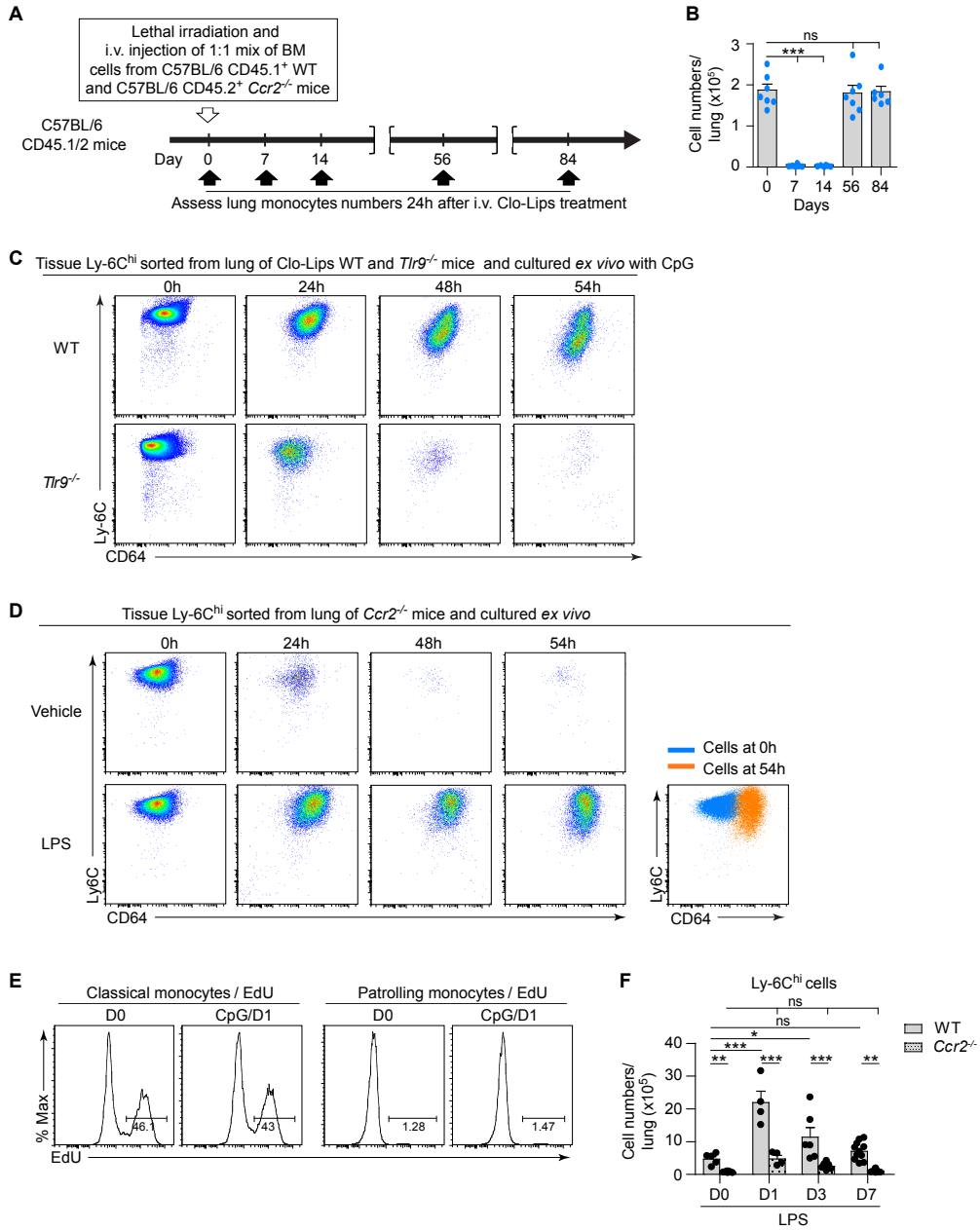




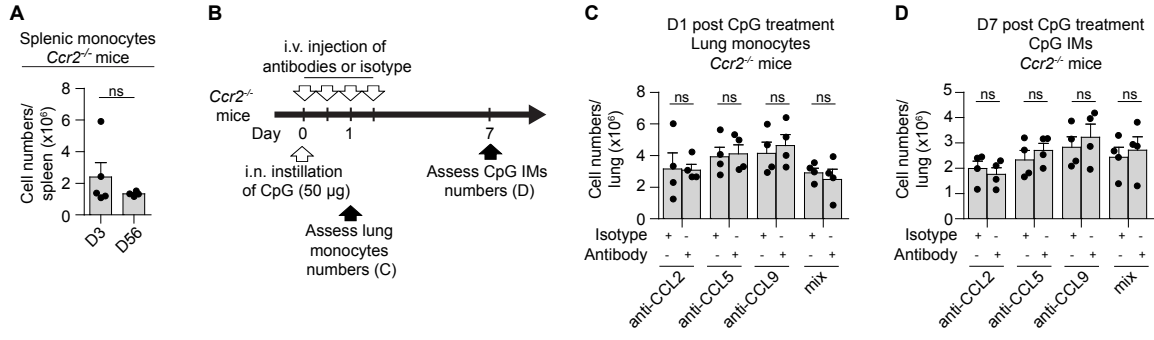
**Figure S4, related to Figure 4. Contribution of CpG IMs to the treatment of experimental asthma: mucus production, long-lasting effects of CpG on IM numbers and HDM-induced experimental asthma, and contribution of CpG and CpG IMs in the protection against OVA-induced experimental asthma.** (A-B) Experimental outline is shown in Figure 4A. Briefly, WT C57BL/6 and *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice were instilled i.n. with 100 µg HDM or saline at days 0 and 7, were exposed to CpG or ODN at day 14 and challenged with HDM at day 21. Mice were sacrificed 3 days after the HDM challenge. (A) Representative Periodic Acid-Schiff (PAS) staining of lung sections of the indicated groups of mice. (B) Quantification of mucus production as the % positivity of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells. (C-D) Experimental outline is shown in Figure 4J. Briefly, WT mice previously sensitized with 2 i.n. administrations of HDM were transferred i.t. with saline or 1.5.10<sup>6</sup> AMs or CpG IMs sorted from WT or *Il10*<sup>-/-</sup> mice, challenged 1 day later with 100 µg HDM and sacrificed 3 days later. (C) PAS staining of lung sections of the indicated groups of mice. (D) Quantification of mucus production as the % positivity of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells. (A and C) Data are representative of one of ≥6 mice analyzed, each of them giving comparable results. (B and D) Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-6 mice/group). *P* values were calculated using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests. Scale bar: 32 µm. (E) Experimental outline for data shown in F-L. Briefly, C57BL/6 WT or ITIB mice (panel J) mice were sensitized with 2 weekly i.n. administrations of HDM (100 µg) or saline and instilled 7 days later (D14) i.n. with CpG or ODN. On D56, mice were challenged with 100 µg HDM and were sacrificed on D73. IM numbers were assessed at the indicated time points. (F) Dynamic airway resistance upon methacholine inhalation. (G) BALF eosinophil counts. (H) Cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with HDM. (I) Hematoxylin and eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) stainings of lung sections. (J) Quantification of mucus production as the % positivity of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells. (K,L) Numbers of (K) CpG IMs and (L) IL-10<sup>+</sup> CpG IMs at D0, 21 and 70. (F) Data show mean + SEM and are representative of 1 of 3 independent experiments (n=4/group), each of them giving similar results. (G,H,K) Data show mean + SEM and are pooled from 3 independent experiments (n=6-12/group), each of them giving comparable results. (L) Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4/group). (I) Data are representative of one of ≥6 mice analyzed, each of them giving comparable results. (J) Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-6 mice/group). (F-H;K,L,J) *P* values were calculated using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests. Scale bars: 32 µm. (M) Experimental outline for data shown in N-Q. Briefly, C57BL/6 WT mice were sensitized i.p. with OVA admixed with alum at D0 and 14 and instilled 7 days later (D21) i.n. with CpG or ODN. Alternatively, mice were transferred on D27 with 1.5.10<sup>6</sup> AMs or CpG IMs sorted from WT mice. From D28 to D31, mice were challenged with inhalations of OVA 1% (1 hour/day). Mice were sacrificed on D32. (N) Dynamic airway resistance upon methacholine inhalation. (O) BALF eosinophil counts. (P) Cytokine concentrations in culture supernatants of BLN cells restimulated with OVA. (Q) Quantification of serum OVA-specific IgE. (N-Q) Data shown mean + SEM and are representative of 1 of 2 independent experiments (n=4-6/group), each of them giving similar results. *P* values were calculated using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests.



**Figure S5, related to Figure 5. Dependence of LPS IMs on CCR2, and numbers of AMs and IMs before irradiation and following BM reconstitution.** (A) Absolute numbers of IMs in the lungs of WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice before and 7 days after i.n. LPS treatment (10 µg). (B) Experimental outline for data shown in C-E. Briefly, CD45.1/2<sup>+</sup> mice were lethally irradiated and reconstituted with equal amounts of CD45.1<sup>+</sup> WT and CD45.2<sup>+</sup>*Ccr2*<sup>-/-</sup> BM cells. Some mice were instilled with CpG or LPS at day 49 or 77 and analyzed 7 days later. (C) Macrophage numbers were assessed over time, as indicated. Absolute numbers of the indicated populations before (D0, day 0) irradiation, and 7, 14, 56 and 84 days after BM reconstitution. (D) The chimerism of SS IMs and LPS IMs was assessed at day 56 or 84. % of BM chimerism and radio-resistance of the indicated populations. (E) Pie charts depicting the average absolute cell number (surface area) and the CCR2 independence (dotted area) in the indicated cell populations. (D and E) The % of chimerism and the % of CCR2 independence of blood B lymphocytes, neutrophils (i.e., 50% chimerism, 100% CCR2 independence) and monocytes (i.e. ≈10% chimerism, ≈20% CCR2 independence) were used as controls and are shown in Figure 5, D-F. (A,C,D) Data show mean ± SEM and are pooled from (A,D) 3 independent experiments (n=10-15/group), or (C) 2 independent experiments (n=6-7/group), each of them giving similar results. *P* values were calculated using (A) a two-way ANOVA or (C,D) a one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. D, day.



**Figure S6, related to Figure 6. Numbers of lung monocytes before irradiation and following BM reconstitution, differentiation of lung monocytes upon CpG or LPS stimulation *ex vivo*, monocyte EdU incorporation upon CpG treatment and numbers of lung monocytes in WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice before and 1, 3 and 7 days after i.n. LPS instillation.** (A) Experimental outline for data shown in B. Briefly, CD45.1/2<sup>+</sup> mice were lethally irradiated and reconstituted with equal amounts of CD45.1<sup>+</sup> WT and CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> BM cells. Numbers of lung monocytes were assessed over time, as indicated. (B) Absolute numbers of lung monocytes before (D0, day 0) irradiation, and 7, 14, 56 and 84 days after BM reconstitution. Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=6-7/group), each of them giving similar results. (C) Dot plots of living lung monocytes sorted from Clo-Lip-treated C57BL/6 WT and *Tlr9*<sup>-/-</sup> mice and cultured *ex vivo* before and 24, 48 or 54 hours after stimulation with vehicle or CpG. (D) Dot plots of living lung monocytes sorted from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and cultured *ex vivo* before and 24, 48 or 54 hours after stimulation with vehicle or LPS. On the right panel, superposition of dot plots of living lung monocytes cultured *ex vivo* before (0h) and 54 hours (54h) after stimulation with LPS. (C-D) Data are representative of one of ≥5 samples coming from 3 independent experiments. (E) Incorporation of EdU (injected i.p. 24 hours before) in classical Ly-6C<sup>hi</sup> and patrolling Ly-6C<sup>lo</sup> lung associated monocytes was assessed at day 0 and 1 day after i.n. CpG instillation in WT mice. WT BM cells were used as controls (shown in Figure 6L). Numbers indicate % of EdU<sup>+</sup> cells. Results are representative of one of ≥4 mice coming from 2 independent experiments. (F) Absolute numbers of lung monocytes in WT and *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice before and 1, 3 and 7 days after i.n. LPS instillation. Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-10/group). *P* values were calculated using (B) a one-way ANOVA or (F) a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests.



**Figure S7, related to Figure 7. Analyses of *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice: numbers of spleen monocytes, and numbers of monocytes and macrophages in the lung following chemokine neutralization and i.n. CpG treatment.** (A) Absolute numbers of spleen monocytes at different time points after birth in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice. (B) Experimental outline for *in vivo* chemokine neutralization experiments shown in C-D. Absolute numbers of (C) lung monocytes 1 day or (D) CpG IMs 7 days after i.n. CpG instillation in *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice which received i.p. injection of the indicated antibodies. Data show mean + SEM and are pooled from 2 independent experiments (n=4-5/group). *P* values were calculated using (A) a one-way or (C,D) a two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc tests.



## Supplemental Experimental Procedures

### Mice

WT CD45.2<sup>+</sup> C57BL/6 and WT CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 mice were from the Jackson Laboratory. CD45.1/2<sup>+</sup> WT C57BL/6 mice were obtained by crossing CD45.1<sup>+</sup> with CD45.2<sup>+</sup> mice. *Agtr1a*<sup>-/-</sup>, *Ccr2*<sup>-/-</sup>, *Cx3cr1*<sup>gfp/+</sup>, *Il-10*<sup>-/-</sup>, *Myd88*<sup>-/-</sup> and *Nr4a1*<sup>-/-</sup> mice on the C57BL/6 background were from the Jackson Laboratory. *Tlr9*<sup>-/-</sup> (Hemmi et al., 2000) and IL-10- $\beta$ -lactamase reporter (ITIB) (Bouabe et al., 2011) mice were described elsewhere. All mice, except parabiotic mice that were generated at the Singapore Immunology Network (SIgN, Singapore), were housed and bred in institutional specific pathogen-free facilities at the GIGA-Research center of the University of Liege (Belgium) and were used at 6-10 weeks of age, unless otherwise indicated. All experimental procedures and protocols were reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Ethics Committee of the University of Liege (Belgium), except for experiments involving parabiotic mice that were approved by the local ethical committee at the Singapore Immunology Network (SIgN, Singapore).

The "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals", prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press, as well as European and local legislations, were followed carefully.

### Reagents and Antibodies

2.4G2 Fc receptor blocking antibodies were produced in house. Fluorogenic coumarin-cephalosporin-fluorescein (4)-acetoxymethyl (CCF4-AM) was from Invitrogen. Pam3CSK4, Poly(I:C), FLA-BS and R848 were from InvivoGen. MALP-2 was from Enzo Life Sciences. LPS from *E. coli* O55:B5 was from Sigma. Mouse non-CpG DNA (ODN, 5'-gcttgatgactcagccggaa-3'; Ref. HC4034) and CpG-DNA (5'-tccatgacgttctctgatgct-3'; Ref. HC4033) were from Sanbio. Clodronate-containing liposomes or control liposomes were from Foundation Clodronate Liposomes. 5-ethynyl-2'-deoxy-uridine (EdU) was from Jena Bioscience. HDM extracts (HDM from *Dermatophagoides farinae*) were from Greer Laboratories. OVA grade III and grade V were purchased from Sigma Aldrich. Fluorescent HDM was produced by labelling with the Alexa fluor 647 Protein Labelling kit (Molecular Probes).

PE-conjugated anti-B220 (clone RA3-6B2), APC-, FITC-, PerCP-Cy5.5- and V500-conjugated anti-CD45.2 (clone 104), PE-conjugated anti-CD64 (clone X54-5:7.1), PE-Cy7-conjugated anti-CD11b (clone M1/70), APC- and APC-Cy7-conjugated anti-CD11c (clone HL3), PerCP-Cy5.5-, BV421-conjugated anti-CD49b (clone DX5), FITC-conjugated anti-Ly6C (clone AL-21), PE- and PE-Cy7-conjugated anti-Ly6g (clone 1A8), APC-conjugated anti-MHCII (clone AF6-120.1), PE-conjugated anti-NK1.1 (clone PK136), PE-conjugated anti-SiglecF (clone E50-2440) were purchased from BD Pharmingen. APC-conjugated anti-CD45.1 (clone A20), FITC-conjugated anti-CD11b (clone M1/70), efluor660-conjugated anti-CD169 (clone SER-4), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD19 (clone 1D3), PE-conjugated anti-CD115 (clone AFS98), efluor 450-conjugated anti-CD3 (clone 17A2), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD62L (clone MEL-14), biotin-conjugated anti-CD86 (clone GL-1), efluor 660-, PerCP-efluor710-conjugated anti-CD90.2 (clone 30H12), PE-conjugated anti-F4/80 (clone BM8) were from eBioscience. BV421-conjugated anti-CD64 (clone X54-5:7.1) and

PerCP-Cy5.5-conjugated anti-MHCII (clone M5/M4.15.2) were from Biologend. PE-conjugated anti-CCR2 (clone 475301), and APC-conjugated anti-merTK (clone 108928) were from R&D systems. Anti-CD11b MicroBeads were from Miltenyi Biotec. Appropriate isotype control antibodies were purchased from the same respective manufacturers.

Rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) and anti- $\beta$ -Actin (clone D6A8) antibodies were from Cell Signaling Technology. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody was from Kirkegaard & Perry Laboratories.

Goat anti-CCL2, rat anti-CCL5 (clone 53405) and rat anti-CCL9 (clone 62105) neutralizing antibodies were from R&D Systems. Appropriate isotype control antibodies were purchased from the same manufacturer.

### **Cell isolation, staining and flow cytometry**

To obtain single-lung-cell suspensions, lungs were perfused with 10 ml of PBS through the right ventricle, cut into small pieces, and digested for 1 h at 37°C in HBSS containing 1 mg ml<sup>-1</sup> collagenase A (Roche) and 0.05 mg ml<sup>-1</sup> DNase I (Roche). Single-cell suspensions were then enriched in mononuclear cells by harvesting cells from the 1.080:1.038 g ml<sup>-1</sup> interface using a density gradient (Easycoll from VWR). Blood was collected and mixed with EDTA (100 mM), and red blood cells were lysed with RBC lysis buffer (eBioscience). To obtain single-heart and liver-cell suspensions, these organs were cut into small pieces and digested for 1 h at 37°C in HBSS containing 1 mg ml<sup>-1</sup> collagenase A (Roche) and 0.05 mg ml<sup>-1</sup> DNase I (Roche).

Cell phenotyping and sorting were performed on a FACSCANTO II and a FACSARIA III (BD Biosciences), respectively. Staining reactions were performed at 4°C after incubation with 2.4G2 Fc receptor blocking antibodies to reduce non-specific binding.

Regarding cell phenotyping and sorting, FSC-W and FSC-A discrimination was used to exclude doublet cells, and ViaProbe (7-AAD) cell viability solution (BD Biosciences) was used to discriminate between dead and living cells. In experiments aimed at isolating lung Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> classical monocytes, Ly-6C<sup>lo</sup>CD64<sup>lo</sup> patrolling monocytes, AMs, SS IMs, CpG IMs, or splenic monocytes, lung mononuclear cells and splenic cells were first enriched in CD11b-expressing cells by MACS using CD11b microbeads. Results were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

### **Cytologic examination**

Cytologic examination of FACS-sorted populations was performed on cytospin preparations stained with Hemacolor® (Merck KgaA). Sections were examined with a FSX100 microscope (Olympus).

### **Vascular monocytes/macrophage depletion**

WT or *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were injected i.v. with 200  $\mu$ l of clodronate-containing liposomes (Clo-Lips) or empty liposomes (PBS-Lips), and lung cells were harvested 24 hours later.

### **Assessment of IL-10 expression in ITIB mice and IL-10 production *ex vivo***

To assess IL-10 expression using IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB mice (Bouabe et al., 2011), lung cells from IL-10- $\beta$ -lactamase reporter ITIB and control WT mice were resuspended in a

CCF4-AM-containing solution supplemented with probenecid (Invitrogen), prepared according to the manufacturer's instructions, and incubated 90 min at 29°C. Briefly, CCF4-AM is a lipophilic ester derivative that consists of a cephalosporin core bridging a 7-hydroxycoumarin to a fluorescein. Once inside the cell, the ester groups are readily hydrolysed by cytoplasmic esterases, releasing the negatively charged form, CCF4, which is thus trapped in the cytosol (using inhibitor for anion transporters, such as probenecid, further increase trapping substrate/product within the cells). Exciting intact CCF4 at 405 nm induces fluorescence resonance energy transfer (FRET) from the coumarin to the fluorescein that subsequently emits green light. After cleavage of the  $\beta$ -lactam ring of CCF4 by  $\beta$ -lactamase, which is expressed under the control of the *Il10* gene promoter, the two fluorophores are separated, resulting in the disruption of FRET. Excitation at 409 nm now results in blue fluorescence detectable at 450 nm. CCF4-loaded cells were then classically stained and analyzed by flow cytometry. CCF4-loaded WT cells were used as negative controls.

For IL-10 production *ex vivo*, classical monocytes, patrolling monocytes, AMs and IMs were FACS-sorted from naive WT mice and  $2 \times 10^5$  cells were cultured in 200  $\mu$ l of RPMI medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and additives (L-glutamine 8mM, MEAA 0.1 mM, Pyruvate Na 1mM, Penicillin/streptomycin 50 UI ml<sup>-1</sup>,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.5mM) in a 96 well plate during 16 h. In some experiments, IMs isolated from WT, *Tlr9*<sup>-/-</sup> or *Myd88*<sup>-/-</sup> mice were cultured and stimulated during 16h with LPS (10 ng ml<sup>-1</sup>) or CpG (7  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). Concentrations of IL-10 were measured by ELISA (eBioscience) in culture supernatants.

### Quantification of monocytes/macrophages numbers

Lung cell numbers were counted following whole lung digestion and mononuclear cell enrichment by the use of a hemocytometer. The numbers of monocytes/macrophages were determined according to the gating strategy shown in Figure 1A.

Total BALF cell numbers were counted by the use of a hemacytometer. The numbers of SS IMs and CpG IMs were determined according to the gating strategy shown in Figure 1A.

Total splenic, cardiac, liver and bone marrow cell numbers were counted following tissue dissociation by the use of a hemacytometer. The numbers of splenic, cardiac, liver and bone marrow monocytes or macrophages were determined according to the gating strategy described by Swirski and collaborators (Swirski et al., 2009) or shown in Figure 1A, respectively.

### Immunohistochemistry

Lungs were fixed in 4% formalin, paraffin-embedded and cut in 5  $\mu$ m thick sections. Deparaffinized tissues were dewaxed and endogenous peroxides were blocked with hydrogen peroxide 3% (Merck). Tissue sections were then immersed in protein block serum free (Dako) for 10 min at room temperature. Mouse lung sections were stained with a rat anti-mouse Ly-6C (dilution 1/50) for 2 h at room temperature (Abcam) followed by a HRP-coupled rabbit anti-rat staining (dilution 1/400) for 40 min at room temperature (Abcam). Peroxidase activity was revealed using the 3,3'-diaminobenzidine hydrochloride kit (Dako), and tissues were then counter-colored with Carazzi's hematoxylin. Slides were mounted on Eukitt medium (Fluka Analytical).

***In vivo* labeling of vascular leukocytes**

WT mice were injected i.v. with 0.5 µg of anti-CD45.2 antibodies. The antibody was allowed to circulate for 3 minutes prior to euthanasia in order to label all leukocytes in the vascular space. Lungs were then harvested without being perfused and the monocyte/macrophage populations were analyzed by flow cytometry.

**Airway exposure to TLR ligands and pathogens**

Lightly isoflurane anesthetized mice were instilled i.n. with 50 µl saline or 50 µl saline containing various TLR ligands (i.e. Pam3CSK4 25 µg; Poly(I:C) 50 µg; LPS 10 µg; FLA-BS 1 µg; MALP-2 1 µg; CpG-DNA 50 µg) or respiratory pathogens (i.e. influenza A 5 PFU; *S. pneumoniae* serotype 1, clinical isolate E1586, 10<sup>5</sup> CFU). The doses of TLR ligands used were chosen according to the ones found in the literature: Pam3CSK4 (Andrade et al., 2013; Chen et al., 2016); Poly(I:C) (Errea et al., 2015; LeMessurier et al., 2013); LPS (Chen et al., 2014; Hiroshima et al., 2014); FLA-BS (Errea et al., 2015; Munoz et al., 2010); MALP-2 (Reppe et al., 2015); R848 (Marino et al., 2011; Van et al., 2011); CpG (Hickey et al., 2013; Vogel and Brown, 2015). Influenza type A virus strain A/PR/8/34 (PR8) was provided by Dr François Trottein (Institut Pasteur de Lille, France). In experiments shown in Figure S2B and S2C, the concentration of the TLR ligands used was corresponding to 5 nmoles for each stimulant.

**House dust mite-induced model of asthma and CpG treatments.**

Lightly isoflurane anesthetized WT, ITIB or *Thr9*<sup>-/-</sup> mice were sensitized by two weekly i.n. instillations of vehicle (LPS-free saline) or HDM extracts (100 µg in 50 µl) on day 0 and on day 7. In experiments shown in Figure 3E and 3F, mice were sensitized by HDM on day 0 and AlexaFluor-labeled HDM on day 7.

For assessing the effects of CpG in preventing asthma development (Figure 3), mice were instilled i.n. with 50 µl saline containing 50 µg ODN or 50 µg CpG 7 days before the first HDM treatment. Mice were sacrificed 3 days after the second HDM treatment (day 10). In adoptive transfer experiments, WT mice were transferred i.t. with 1.5x10<sup>6</sup> AMs or CpG IMs sorted from CpG-treated WT or *Il-10*<sup>-/-</sup> mice (mortality rate varying between 40 and 60% in CpG-injected *Il-10*<sup>-/-</sup> mice, but not WT mice, unpublished observation), or vehicle (50 µl saline), 24 hours before each HDM treatment (days -1 and 6).

For assessing the curative effects of CpG on established asthma (Figure 4), mice were instilled i.n. with 50 µl saline containing 50 µg ODN or 50 µg CpG 7 days after the second HDM treatment (day 14). Seven days later (day 21), mice were challenged by an i.n. instillation of vehicle (LPS-free saline) or HDM (100 µg in 50 µl). In experiments shown in Figure 4E and 4F, mice were challenged by AlexaFluor-labeled HDM on day 21. Mice were sacrificed at day 24. In adoptive transfer experiments, WT mice were transferred i.t. with 1.5x10<sup>6</sup> AMs or CpG IMs sorted from CpG-treated WT or *Il-10*<sup>-/-</sup> mice (mortality rate varying between 40 and 60% in CpG-injected *Il-10*<sup>-/-</sup> mice, but not WT mice, unpublished observation), or vehicle (50 µl saline), 24 hours before the last HDM challenge (day 20). In

experiments assessing the long-lasting effects of CpG on established asthma, mice were challenged with HDM 8 weeks after a single CpG instillation and were sacrificed 3 days later.

### Assessment of the asthmatic response in HDM-exposed mice

AHR was estimated by assessing dynamic airway resistance in anesthetized animals subjected to increasing doses of methacholine using a FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ), as previously described (Gueders et al., 2009). Mice were sacrificed and BALF, lungs and lymph node cells were harvested and analyzed as described previously (Marichal et al., 2010). Briefly, BALF eosinophilia was evaluated by total and differential cell counts, lung inflammation and mucus production were evaluated on H&E- and PAS-stained lung sections, respectively. Mucus production was also quantified as the percentage of PAS-stained goblet cells per total epithelial cells in randomly selected bronchi. Seven randomly selected sections were analyzed per murine lung. Bronchial lymph node cells were cultured *in vitro* in supplemented Click's medium (10% FBS, L-glutamine 8mM, modified essential amino acids 0.1 mM, sodium pyruvate 1mM, Penicillin/Streptomycin 50 UI ml<sup>-1</sup> and β-mercaptoethanol 0.5mM) with or without HDM restimulation (30 μg ml<sup>-1</sup>). Culture supernatants were assayed for cytokine production (IL-4, IL-5, IL-13) by ELISA (eBioscience) after 3 days of culture.

To assess DC maturation and migration, mice were injected i.n. with 100 μg of HDM labeled with Alexa fluor-647 or saline at day 7 (Figure 3E and 3F) or at day 21 (Figure 4E and 4F). Mice were sacrificed 24 hours later. BLN were minced, and total cell numbers were counted by the use of a hemacytometer. The number of antigen-positive DCs (i.e. HDM<sup>+</sup>CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>hi</sup> cells) was determined in the BLN by flow cytometry. The extent of lung DC maturation was determined by quantifying surface expression of the maturation markers CD86 and MHC-II on lung total DCs (i.e. non-autofluorescent CD11c<sup>hi</sup>MHC-II<sup>int/hi</sup> cells) by flow cytometry.

### OVA/Alum-induced model of asthma and CpG treatments

WT mice were sensitized on days 0 and 14 by i.p. injection of 100 μl saline containing 10 μg OVA (grade V) admixed with 100 μl Imject Alum (Pierce). Sham-immunized mice received 100 μl saline mixed with 100 μl Imject Alum. On days 28–31, mice were challenged by exposure to an aerosol of 1% OVA (w/v; grade III) in saline for 1 hour. For assessing the curative effects of CpG on established asthma, mice were instilled i.n. with 50 μl saline containing 50 μg ODN or 50 μg CpG 7 days before the aerosol challenge (day 21). Mice were sacrificed 24 hours after the last challenge (day 32). In adoptive transfer experiments, WT mice were transferred i.t. with 1.5x10<sup>6</sup> of AMs or CpG IMs sorted from CpG-treated WT mice or vehicle (50 μl saline) 24 hours before the OVA challenge (day 27).

Read-outs used for assessment of the asthmatic response was performed similarly as for the HDM-induced asthma models, except that BLN were restimulated with OVA (50 μg ml<sup>-1</sup>, grade V) and that a quantification of OVA-specific IgE was also performed, as described (Marichal et al., 2011).

### Generation of bone marrow mixed chimeras and parabiotic mice

Twelve week-old CD45.1/2<sup>+</sup> WT C57BL/6 mice were lethally irradiated with two doses of 6 Gy 3 hours apart. Two hours after the second irradiation, these mice were injected i.v. with

$2 \times 10^6$  BM cells consisting of a 1:1 mix of BM cells obtained from CD45.1<sup>+</sup> C57BL/6 and CD45.2<sup>+</sup> *Ccr2*<sup>-/-</sup> C57BL/6 mice. Mice were treated with antibiotics (Baytril, Bayer, 0.05 mg.ml<sup>-1</sup> in drinking water) from the day before irradiation until the time of sacrifice. Cell numbers were evaluated 7, 14, 56 and 84 days later and chimerism was assessed 56 and 84 days later. In some experiments, such BM mixed chimeras were instilled with CpG or LPS 7 days before the analysis.

Parabiotic mice were generated by suturing age- and weight-matched WT CD45.1<sup>+</sup> and *Ccr2*<sup>-/-</sup> CD45.2<sup>+</sup> mice at the age of 6 weeks. Mice were analyzed at 6 months of age.

### Assessment of cell proliferation using EdU incorporation

One, two or three days after i.n. administration of CpG, C57BL/6 WT or *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were injected i.p. with EdU (1 mg in 400  $\mu$ l). Mice were sacrificed 24 hours later and incorporation of EdU was assessed by flow cytometry.

### Ex vivo stimulation of tissue monocytes with CpG and LPS

Lung and splenic monocytes were sorted by FACS according to the gating strategy described in Figure 1a and by Swirski and collaborators (Swirski et al., 2009), respectively. Two hundred thousands ( $2 \times 10^5$ ) cells were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS and additives (L-glutamine 8 mM, MEAA 0.1 mM, Pyruvate Na 1mM, Penicillin/streptomycin 50 UI ml<sup>-1</sup>,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.5 mM), with or without CpG (7  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) or LPS (10 ng ml<sup>-1</sup>) in a 24-well plate. Twenty-four, 36, 48 and 54 hours later, cells were harvested and phenotyped. ViaProbe (7-AAD) cell viability solution was used to discriminate between dead and living cells.

### Western blot

Five hundred thousands lung monocytes were sorted by FACS from naive *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FBS and additives (L-glutamine 8mM, MEAA 0.1 mM, Pyruvate Na 1mM, Penicillin/streptomycin 50UI ml<sup>-1</sup>,  $\beta$ -mercaptoethanol 0.5mM) in a 12-well plate. Cells were treated with or without ODN or CpG-DNA (7  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) for 30 minutes. Cells were then harvested, centrifuged and pellets were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer with 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF and complete protease inhibitor (Roche Diagnostics). Protein extracts were added to Laemmli buffer, boiled and run on a 10% polyacrylamide-SDS gel; after electrophoresis, gels were electro-transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) for western-blotting. Nonspecific binding was blocked in 20 mM Tris, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.2% Tween 20 (TBS-Tween), and 5% dry milk during 1 h. Membranes were then incubated with rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) or anti- $\beta$ -Actin antibodies (1:1,000; Cell Signaling Technology) overnight at 4°C, rinsed with TBS-Tween and further incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:5,000; Kirkegaard & Perry Laboratories) for 60 min at room temperature. Result was visualized using an enhanced chemiluminescence system (ECL kit; Amersham) followed by autoradiography with Fuji x-ray films.

### mRNA isolation, microarray and Gene Set Enrichment Analyses

Singlet living Ly-6C<sup>hi</sup>CD64<sup>lo</sup> cells from *Ccr2*<sup>-/-</sup> or WT mice, and AMs, SS IMs and CpG IMs

from WT mice were directly sorted in Trizol® (Life Technologies). The 4 cell populations were sorted in duplicate (CpG IMs) or triplicate (all the others), yielding a total of 11 samples. Total RNA was purified using Direct-zol® kit (Zymo Research) following manufacturer's recommendations. For each cell type, total RNAs were eluted in a total of 175 µl of water. Eluted RNAs were incubated with DNase for 10 min at room temperature in a total volume of 200 µl using the RNase-Free DNase Set from Qiagen (Venlo), followed by purification on RNeasy® Micro columns (Qiagen) and final elution in 50µl water. RNAs were quantitatively and qualitatively verified using Agilent RNA 6000 Pico Kit run on an Agilent 2100 Bioanalyzer. Concentrations were around 1ng/µl and RNA Integrity Numbers were above 8.

1.5ng RNA was used to generate fragmented and biotin-labeled ssDNA targets using GeneChip® WT Pico Reagent Kit (Affymetrix). The fragmented and labeled targets were hybridized to GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Arrays following standard Affymetrix protocol, which includes overnight hybridization at 45°C and 60 rpm in an Affymetrix GeneChip Hybridization Oven 645. The arrays were then washed and stained in an Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450.

Microarrays were analyzed using R (version 3.3.1) and Bioconductor (Huber et al., 2015). Raw data were background-corrected and quantile-normalized using “Robust Multichip Average algorithm” (RMA) from “oligo” package. Normalized data were then annotated using “mogene10sttranscriptcluster.db” annotation package.

Differential expression analysis between Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes from WT mice was performed using “Linear Models for Microarray Data” (Limma) package in Bioconductor, with thresholds as following: Benjamini Hochberg adjusted *P* value (adj *P* value) < 0.05 AND Fold Change (FC) > 2 or < 0.5, and after having filtered out non annotated probes. Differential expression analysis between SS IMs and CpG IMs was performed identically, excepted for adj *P* value threshold set to 0.05. Volcano plot of differences between Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice and Ly-6C<sup>hi</sup> monocytes from WT mice was obtained by plotting log<sub>2</sub> (FC) on the x axis and -log<sub>10</sub> (adj *P* value) on the y axis for all probes present in the Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array, including non annotated ones.

Heatmaps were generated by plotting normalized expression values of relevant samples and genes using “heatmap.2” function from “gplots” package.

Principal Component Analysis (PCA) was performed using “prcomp” function on normalized expression values of AMs, SS IMs and CpG IMs. Values of principal components 1, 2 and 3 were then tridimensionally plotted using “plot3d” function of “rgl” package. Percentages shown on each axis indicate the % of variability explained, with PC1 explaining the most variability.

In order to identify biological signatures of CpG IMs compared to SS IMs, we decided to employ the commonly used non-parametric, rank based tool, Gene Set Enrichment Analysis (GSEA version 2.2.2) (Subramanian et al., 2005). Microarray normalized expression data of SS IMs (3 samples) and CpG IMs (2 samples) were used by GSEA as dataset to rank genes between the two cell types. Since (i) CpG IM class contains 2 samples and (ii) RMA normalized data are in log scale, « Diff\_of\_Classes » method was chosen to rank genes in the dataset. Enrichment analysis was then performed using hallmark gene sets of MsigDB database.

### Real-time PCR analysis

Singlet living lung Ly-6C<sup>hi</sup> cells from *Ccr2*<sup>-/-</sup> mice, and lung IMs, AMs and splenic monocytes from WT mice were directly sorted in Trizol® (Life Technologies). Total RNA was isolated using Direct-zol® kit (Zymo Research) following manufacturer's recommendations. Complementary DNA was obtained using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative real-time PCR were performed in duplicates using Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX Mix (Thermo Fisher Scientific) and ABI 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: (1) initial denaturation at 95°C for 15 min followed by (2) 40 cycles of 95°C 15 s and 60°C 1 min. Primer sequences were as followed ∴ 5'-AGCTGAACATGAACGGCATCT-3' and 5'-GATCGGCCAGCCATCTGA-3' for *Tlr9*, 5'-AGCCCAGTGTTACCACCAAG-3' and 5'-ACCCAAGAACAAGCACAAGG-3' for the housekeeping gene *Ubc*, 5'-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3' and 5'-AATGTGAGGCGGGTGGAACTG-3' for the housekeeping gene *B2m*, 5'-AGCTACTGTAATGATCAGTCAACG-3' and 5'-AGAGGTCCTTTTCACCAGCA-3' for the housekeeping gene *Hprt*. Expression levels of TLR9 were normalized relative to three control genes (*Ubc*, *B2m* and *Hprt*) using qBase+ software (Biogazelle).

### s.c. and i.p. CpG treatments

WT mice were injected s.c. or i.p. with 100 µl saline or 200 µl (i.p.) or 100 µl (s.c.) saline containing 50 µg CpG. Mice were analyzed 7 days later.

### Splenectomy

*Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (75 mg kg<sup>-1</sup>), xylazine (10 mg kg<sup>-1</sup>) and buprenorphine (0.05 mg kg<sup>-1</sup>). A transversal incision was made on the left lower back of the mice to expose the spleen. Spleen was resected and vessels were cauterized. The incision was sutured. Sham-operated mice underwent the same procedure without removal of the spleen.

### Chemokine array

Lightly isoflurane anesthetized WT mice were instilled i.n. with 50 µl saline or 50 µl saline containing either CpG (50 µg) or LPS (10 µg). Eight hours later, mice were sacrificed and lungs were harvested without being perfused. Lungs were homogenized with an UltraTurrax homogenizer (IKA) in 2 ml saline containing complete protease inhibitor (Roche Diagnostics). Samples were then centrifuged for 10 minutes at 16,000 x g and supernatants were tested for the presence of chemokines using a chemokine antibody array (Abcam) according to manufacturer instructions. Membranes were developed and digitized for analysis using ImageJ. Each sample spot density was measured, averaged and normalized to membrane reference spots.

### Chemokine inhibition

*Ccr2*<sup>-/-</sup> mice were injected i.p. with neutralizing anti-CCL2 (200 µg), anti-CCL5 (50 µg), anti-CCL9 (50 µg) antibodies or a combination of these 3 antibodies, 30 minutes before an i.n. administration of CpG. Control mice received the appropriate isotype controls. The numbers



of lung monocytes and CpG IMs were analyzed 1 day and 7 days after CpG administration, respectively.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using R (version 3.2.4). Data from independent experiments were pooled for analysis in each data panel, unless otherwise indicated. Raw data was transformed when needed and was back-transformed for graphical presentation. Respect of the assumptions of normal distribution of residuals and homoscedasticity was verified using diagnostic plots. We considered a  $P$ -value lower than 0.05 as significant. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, not significant.

## Supplemental References

- Andrade, E.B., Alves, J., Madureira, P., Oliveira, L., Ribeiro, A., Cordeiro-da-Silva, A., Correia-Neves, M., Trieu-Cuot, P., and Ferreira, P. (2013). TLR2-induced IL-10 production impairs neutrophil recruitment to infected tissues during neonatal bacterial sepsis. *J. Immunol.* *191*, 4759-4768.
- Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bosl, M.R., and Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *J. Immunol.* *187*, 3165-3176.
- Chen, H., Wu, S., Lu, R., Zhang, Y.G., Zheng, Y., and Sun, J. (2014). Pulmonary permeability assessed by fluorescent-labeled dextran instilled intranasally into mice with LPS-induced acute lung injury. *PloS One* *9*, e101925.
- Chen, Y.G., Zhang, Y., Deng, L.Q., Chen, H., Zhang, Y.J., Zhou, N.J., Yuan, K., Yu, L.Z., Xiong, Z.H., Gui, X.M., et al. (2016). Control of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Pneumonia Utilizing TLR2 Agonist Pam3CSK4. *PloS One* *11*, e0149233.
- Errea, A., Gonzalez Maciel, D., Hiriart, Y., Hozbor, D., and Rumbo, M. (2015). Intranasal administration of TLR agonists induces a discriminated local innate response along murine respiratory tract. *Immunol. Lett.* *164*, 33-39.
- Gueders, M.M., Paulissen, G., Crahay, C., Quesada-Calvo, F., Hacha, J., Van Hove, C., Tournoy, K., Louis, R., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D.D. (2009). Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production. *Inflamm. Res.* *58*, 845-854.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Hickey, A.J., Lin, J.S., Kummer, L.W., Szaba, F.M., Duso, D.K., Tighe, M., Parent, M.A., and Smiley, S.T. (2013). Intranasal prophylaxis with CpG oligodeoxynucleotide can protect against Yersinia pestis infection. *Infect. Immun.* *81*, 2123-2132.
- Hiroshima, Y., Hsu, K., Tedla, N., Chung, Y.M., Chow, S., Herbert, C., and Geczy, C.L. (2014). S100A8 induces IL-10 and protects against acute lung injury. *J. Immunol.* *192*, 2800-2811.
- Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., et al. (2015). Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* *12*, 115-121.
- LeMessurier, K.S., Hacker, H., Chi, L., Tuomanen, E., and Redecke, V. (2013). Type I interferon protects against pneumococcal invasive disease by inhibiting bacterial transmigration across the lung. *PLoS Pathog.* *9*, e1003727.
- Marichal, T., Bedoret, D., Mesnil, C., Pichavant, M., Goriely, S., Trottein, F., Cataldo, D., Goldman, M., Lekeux, P., Bureau, F., and Desmet, C.J. (2010). Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *126*, 836-844.

- Marichal, T., Ohata, K., Bedoret, D., Mesnil, C., Sabatel, C., Kobiyama, K., Lekeux, P., Coban, C., Akira, S., Ishii, K.J., *et al.* (2011). DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat. Med.* *17*, 996-1002.
- Marino, R., Thuraisingam, T., Camateros, P., Kanagaratham, C., Xu, Y.Z., Henri, J., Yang, J., He, G., Ding, A., and Radzioch, D. (2011). Secretory leukocyte protease inhibitor plays an important role in the regulation of allergic asthma in mice. *J. Immunol.* *186*, 4433-4442.
- Munoz, N., Van Maele, L., Marques, J.M., Rial, A., Sirard, J.C., and Chabalgoity, J.A. (2010). Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect. Immun.* *78*, 4226-4233.
- Reppe, K., Radunzel, P., Dietert, K., Tschernig, T., Wolff, T., Hammerschmidt, S., Gruber, A.D., Suttrop, N., and Witzenrath, M. (2015). Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infect. Immun.* *83*, 4617-4629.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., and Mesirov, J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *P. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *102*, 15545-15550.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., *et al.* (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* *325*, 612-616.
- Van, L.P., Bardel, E., Gregoire, S., Vanoirbeek, J., Schneider, E., Dy, M., and Thieblemont, N. (2011). Treatment with the TLR7 agonist R848 induces regulatory T-cell-mediated suppression of established asthma symptoms. *Eur. J Immunol.* *41*, 1992-1999.
- Vogel, A.J., and Brown, D.M. (2015). Single-Dose CpG Immunization Protects Against a Heterosubtypic Challenge and Generates Antigen-Specific Memory T Cells. *Front. Immunol.* *6*, 327.

---

## Annexes - Articles publiés

### Etude 2 :

Resident CD11b+Ly6C- lung dendritic cells are responsible for allergic airway sensitization to house dust mite in mice

---

# Resident CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice

Claire Mesnil<sup>1,9</sup>, Catherine M. Sabatel<sup>1,9</sup>, Thomas Marichal<sup>1</sup>, Marie Toussaint<sup>1</sup>, Didier Cataldo<sup>2</sup>, Pierre-Vincent Drion<sup>3</sup>, Pierre Lekeux<sup>1</sup>, Fabrice Bureau<sup>1,\*,9</sup>, Christophe J. Desmet<sup>1,\*,9</sup>

**1** Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, GIGA-Research and Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium, **2** Laboratory of Tumours and Developmental Biology, GIGA-Research, University of Liège, Liège, Belgium, **3** Laboratory of Preclinical and Biomedical Sciences, University Hospital Center, University of Liège, Liège, Belgium

## Abstract

Conventional dendritic cells (DCs) are considered to be the prime initiators of airway allergy. Yet, it remains unclear whether specific DC subsets are preferentially involved in allergic airway sensitization. Here, we systematically assessed the respective pro-allergic potential of individually sorted lung DC subsets isolated from house dust mite antigen (HDM)-treated donor mice, following transfer to naïve recipients. Transfer of lung CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs, but not CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs, was sufficient to prime airway allergy. The CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DC subpopulation was composed of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> inflammatory monocyte-derived cells, whose numbers increase in the lungs following HDM exposure, and of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> DCs, which remain stable. Counterintuitively, only CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> DCs, and not CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> DCs, were able to convey antigen to the lymph nodes and induce adaptive T cell responses and subsequent airway allergy. Our results thus support that lung resident non-inflammatory CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> DCs are the essential inducers of allergic airway sensitization to the common aeroallergen HDM in mice.

**Citation:** Mesnil C, Sabatel CM, Marichal T, Toussaint M, Cataldo D, et al. (2012) Resident CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> Lung Dendritic Cells Are Responsible for Allergic Airway Sensitization to House Dust Mite in Mice. PLoS ONE 7(12): e53242. doi:10.1371/journal.pone.0053242

**Editor:** Bernhard Ryffel, French National Centre for Scientific Research, France

**Received:** June 29, 2012; **Accepted:** November 27, 2012; **Published:** December 31, 2012

**Copyright:** © 2012 Mesnil et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The Laboratory of Cellular and Molecular Immunology is supported by grants of the "Fonds National de la Recherche Scientifique" (FRS-FNRS; Belgium), the "Fonds de la Recherche Scientifique Médicale" (FRSM; Belgium), and the Belgian Programme on Interuniversity Attraction Poles (IUAP; FEDIMMUNE) initiated by the Belgian State (Belgian Science Policy). C.M., C.S. and T.M. are research fellows, and C.J.D. is a post-doctoral researcher of the FRS-FNRS. M.T. is a research fellow of the "Fonds de la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture" (FRIA; Belgium). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: fabrice.bureau@ulg.ac.be (FB); christophe.desmet@ulg.ac.be (CJD)

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

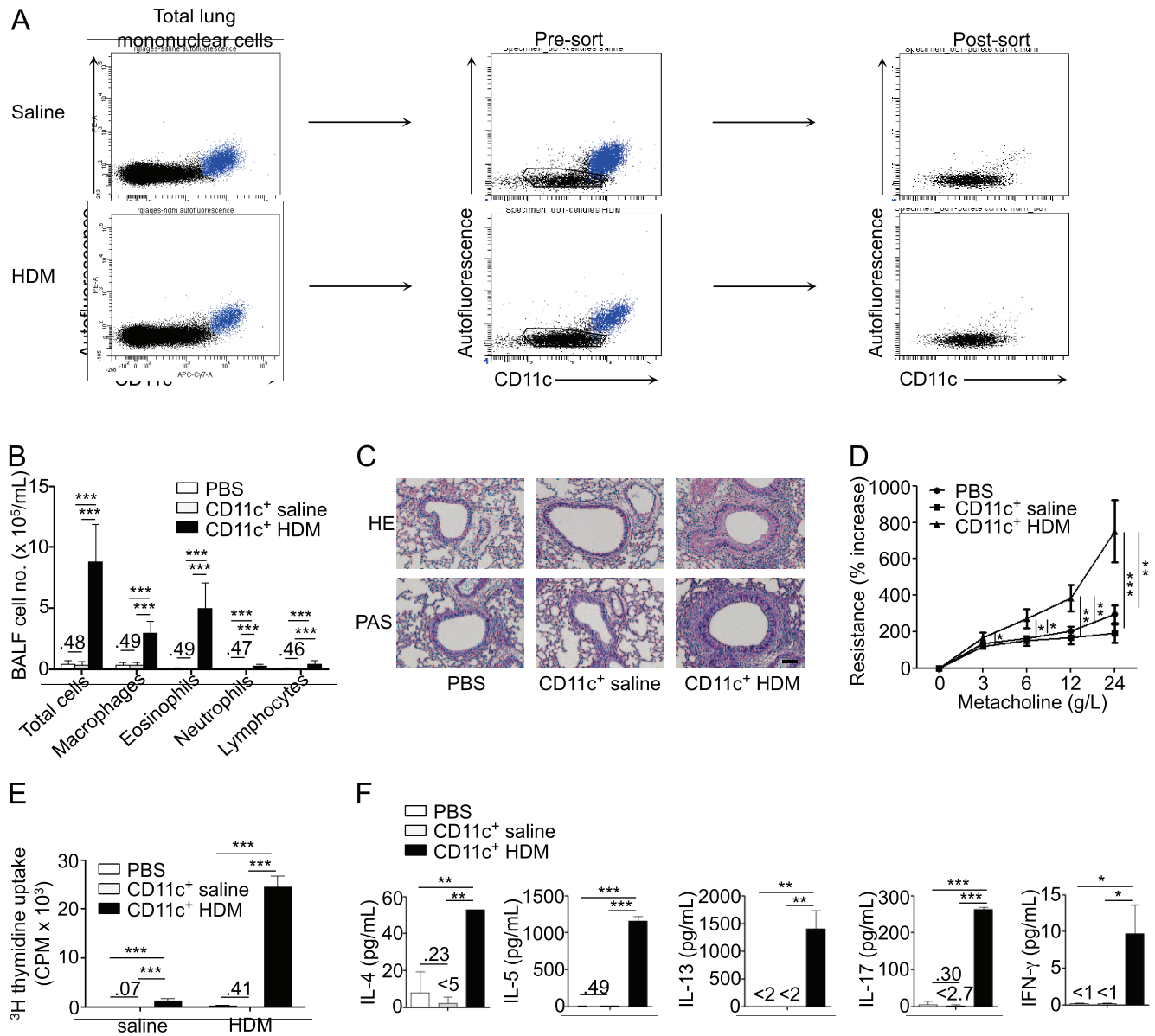
## Introduction

Because it is key to the understanding, prevention and treatment of airway allergy, the question of how inhaled allergens lead to the activation of T<sub>H</sub>2 responses, the major orchestrators of allergy [1], is a subject of intense investigation. Over the last decade, a strong case has been built for a model in which lung conventional dendritic cells (DCs), the most "professional" lung antigen presenting cells, act as antigen-sampling sentinels responsible for the initial activation of T<sub>H</sub>2 cells [2,3]. Indeed, DCs are present throughout the respiratory system as a network of immune cells that rapidly take up inhaled antigens and convey them to the lung draining lymph nodes where they may activate antigen-specific T cell responses [4]. The notion that DCs play a seminal role in allergic airway sensitization received support from ablation studies using transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor (DTR) under the dependence of the *Cd11c* promoter (CD11c-DTR mice), in which administration of diphtheria toxin allows for the depletion of DCs in the lung and lung draining lymph nodes. Diphtheria toxin-treated CD11c-DTR mice indeed are impaired in their ability to mount T<sub>H</sub>2 responses and airway allergy in models of allergic airway sensitization to house dust mite antigens (HDM),

the major respiratory allergens in humans [5]. Adoptive transfer experiments have also been extensively used as an alternative to ablation approaches to support a role for DCs in allergic airway sensitization. Classically, in these experiments, DCs isolated from the spleen of naïve mice [6] or derived *in vitro* from bone marrow progenitor cells [7] are loaded with antigen through *in vitro* culture, and transferred to naïve recipient mice, in which they induce antigen-specific T<sub>H</sub>2 responses.

Lung DCs are now known to represent a heterogeneous cell population [3]. In the steady-state, lung DCs comprise CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs [8,9] and upon allergen exposure, the pool of CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs expands due to the recruitment of inflammatory DCs, which are thought to derive mainly from blood Ly6C<sup>+</sup> monocytes [5,10]. Recent evidence supports that these lung DC subsets may have specialized functions, for instance in the induction of adaptive antiviral responses [2,3].

Whether a specific subset of lung DCs is involved in allergic airway sensitization however remains unclear, as recent studies yielded contradictory conclusions. In a first report, Hammad et al. [5] principally ruled out a major role of basophils as antigen-



**Figure 1. Allergic airway sensitization by adoptive transfer of lung DCs.** Naive mice were transferred i.t. with FACS-sorted lung CD11c<sup>+</sup> DCs from saline- or HDM-treated donors, challenged 10 and 11 d later with HDM and sacrificed 3 d later (n=6 recipient mice per group). A, Gating strategy and post-sort phenotype of lung DCs from saline- and HDM-treated donor mice. Alveolar macrophages (in blue) were excluded based on their autofluorescence and CD11c<sup>hi</sup> phenotype. B, Total and differential cell counts in BAL fluid. C, Hematoxylin and eosin (HE, upper panels) and periodic acid-Schiff (PAS, lower panels) staining of lung sections (scale bar: 100  $\mu$ m). D, Measurement of dynamic airway resistance. E, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. F, ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN- $\gamma$  in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g001

presenting cells in the development of allergen-specific T<sub>H</sub>2 cells, but also proposed that inflammatory DCs instead are able to induce airway allergy to HDM. The authors aimed at demonstrating this latter conclusion *in vivo* by combining two approaches. First, they showed that intraperitoneal (i.p.) adoptive transfer of total DCs or Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup>DX5<sup>-</sup> cells (containing approximately 75% of CD11c<sup>+</sup> DCs) isolated from the lung draining lymph nodes of HDM-treated donor mice is sufficient to induce allergic sensitization in naïve recipient mice. As a second line of evidence, they observed that allergic airway sensitization may be transferred by bone marrow precursors differentiated into bone marrow-derived DCs (BMDCs) by GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) treatment, which supposedly resemble in-

flammatory DCs, but not by BMDCs derived from precursors cultured with Flt3-ligand (Fms like tyrosine kinase 3 ligand), which supposedly more closely resemble steady-state DCs [11]. As a cautionary note yet, a very recent study suggests that this concept should be revisited as it showed that inflammatory DCs in the lung develop independently of GM-CSF, whereas this cytokine is involved in the development and homeostasis of non-inflammatory resident CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup> DCs [12]. In contrast with a scenario involving inflammatory DCs, a second recent study proposed that CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs instead are involved in allergic airway sensitization, whereas CD11b<sup>+</sup> DCs in general would only be able to prime allergen-specific T<sub>H</sub>1 responses [13]. To support this conclusion, Nakano et al. observed that naïve T

cells cultured with CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs derived from the lung or draining lymph node of allergen-exposed mice preferentially produce T<sub>H</sub>2 cytokines following activation with phorbol myristate acetate and ionomycin or with anti-CD3 and -CD28 agonistic antibodies. T cells cocultured in the same conditions with CD11b<sup>+</sup> DCs in contrast produced mainly T<sub>H</sub>1 cytokines [13]. To support that CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs indeed may prime airway allergy *in vivo*, the same authors reported that BXH2 mice, which lack CD103<sup>+</sup> DCs due to a point mutation in the interferon (IFN) regulatory factor (*Irf*) $\delta$  gene [14], are protected from airway allergy induced by endotoxin-adjuvanted ovalbumin (OVA) and house dust extracts [13]. However, BXH2 mice also lack CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> lymph node DCs [14], and present additional immunological alterations [15,16].

Clearly, notwithstanding the advances they allowed or suggested, current ablation and genetic deficiency models have significant limitations when it comes to the identification of lung DC subsets involved in allergic airway sensitization. Indeed, ablation studies in DTR transgenic mice only allow the depletion of DCs at once in the lung and the lung draining lymph nodes and affect multiple DC subsets [17,18]. They may furthermore lead to DC-unrelated effects [19,20]. Similar limitations apply to models of genetic deficiency in given transcription factors [14].

Although adoptive transfer studies may offer a valid alternative to ablation studies, most past attempts used spleen and bone marrow-derived DCs, which are only handy surrogates for lung DCs and may have a very different biology. Here, using a model of adoptive transfer of lung DCs isolated from HDM-exposed mice, we studied the pro-allergic activity of the different subsets of lung cells classically identified as lung DCs in a systematic dichotomic approach.

## Materials and Methods

### Mice

Wild-type CD45.1 and CD45.2 C57Bl/6 mice were from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). All mice were housed and bred in our specific pathogen free facility. Females were used at 8–10 weeks of age. All experiments were conducted with approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Liège. We also followed the "Guide for the Care

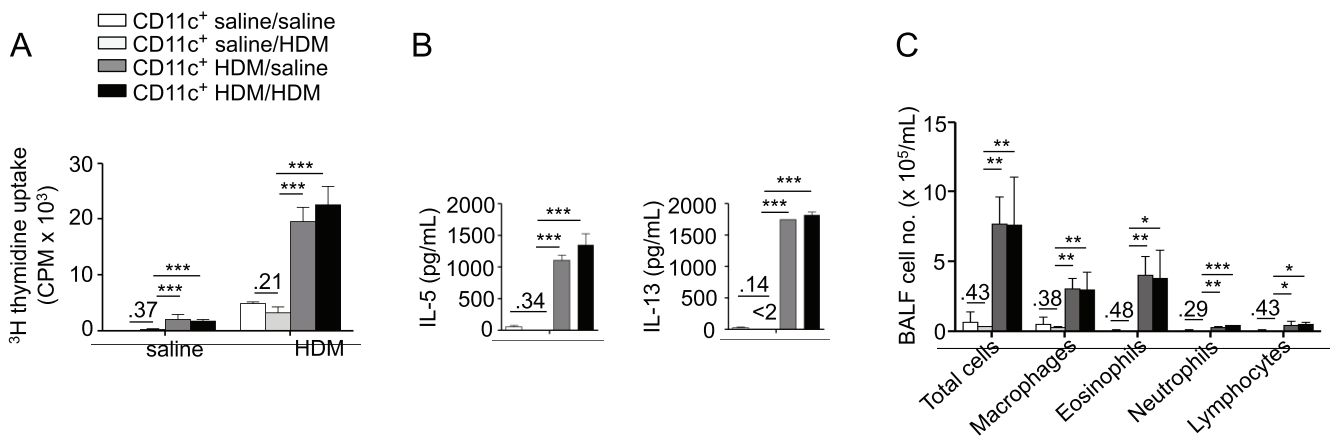
and Use of Laboratory Animals" prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, and published by the National Academy Press (revised 1996).

### Reagents and Abs

Lyophilized HDM (*Dermatophagoides pteronyssinus*) extracts were from Greer Laboratories (Lenoir, NC). OVA-fluorescein isothiocyanate (FITC) was from Invitrogen (Life Technologies Ltd., Paisley, Scotland). Methacholine was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Allophycocyanin (APC)-eFluor780-conjugated anti-CD11c (N418), biotinylated anti-CD40 (1C10), biotinylated anti-CD86 (GL1), biotinylated anti-CD80 (16-10A1), biotinylated anti-Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$  (MAR-1), biotinylated anti-F4/80 (BM8), biotinylated anti-CCR7 (4B12), biotinylated anti-Jagged-2 (HMJ2-1), biotinylated anti-CD8 $\alpha$  (53-6.7), Phycoerythrin(PE)-conjugated anti-ICOS-L (HK5.3), PE-conjugated anti-Jagged-1 (HMJ1-29) and PE-conjugated anti-TIM-4 (RMT4-54) were from eBioscience (San Diego, CA). 7-aminoactinomycin (7-AAD), FITC-conjugated anti-CD103 (M290), V450-conjugated anti-CD11b (M1/70), FITC-conjugated anti-Ly6C (AL-21), biotinylated anti-MHC class II (I-A<sup>b</sup>) (AF6-120.1), APC-conjugated anti-SIRP $\alpha$  (P84), APC-conjugated anti-Ly6C (AL-21), APC-conjugated anti-CD117 (c-kit; 2B8), biotinylated anti-OX40L (RM134L) and APC-streptavidin were from BD Biosciences (Mississauga, Ontario, Canada). Isotype controls and antibodies were from the same manufacturer. 2.4G2 Fc receptor antibodies were produced in house.

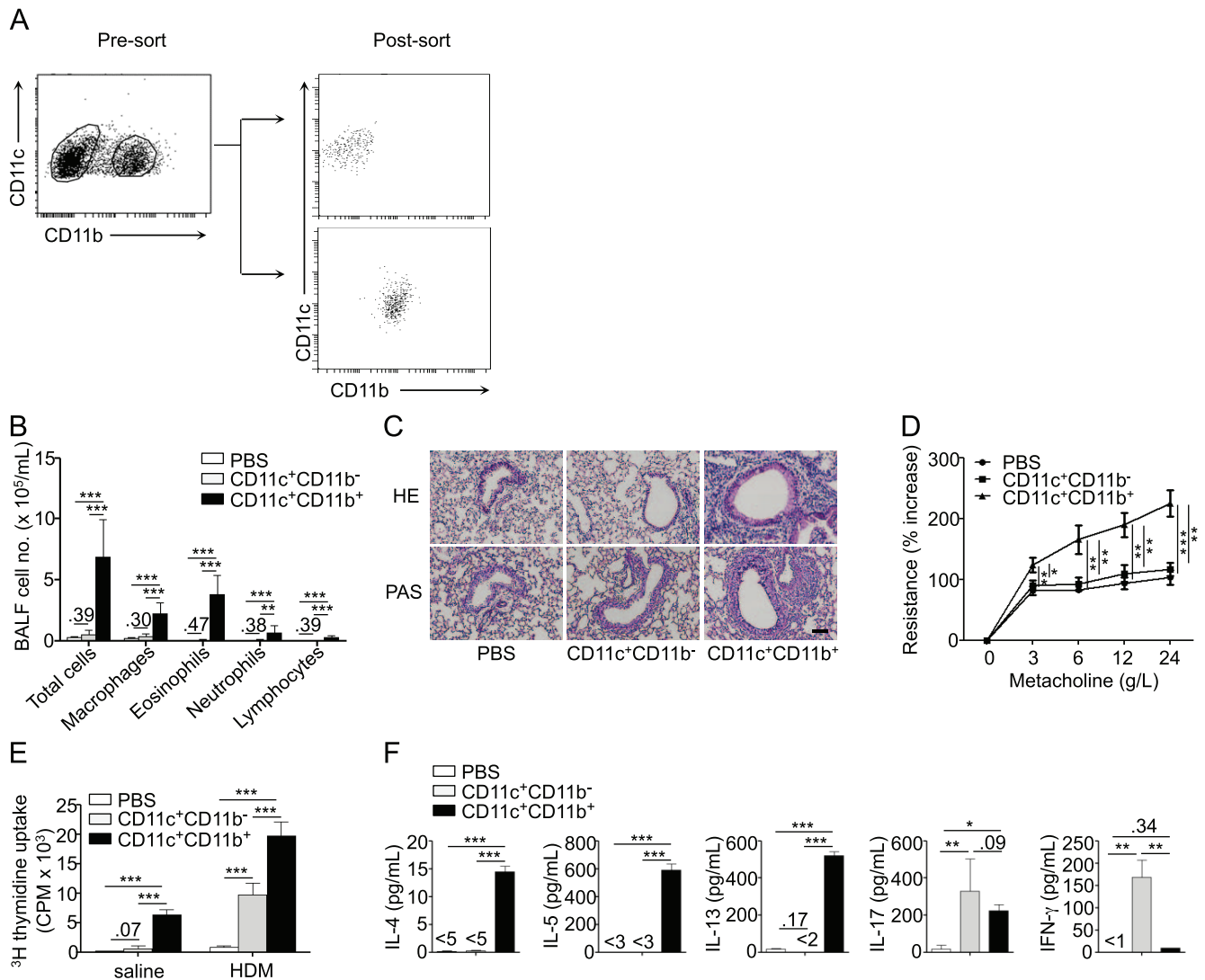
### Phenotypic Characterization and Isolation of Lung DC Subsets

Lightly isoflurane-anesthetized mice received an intranasal (i.n.) instillation of vehicle (endotoxin-free saline) or HDM extract (100  $\mu$ g in 50  $\mu$ l). Single cell suspensions from lungs and bronchial lymph nodes (BLNs) were obtained 12, 24 or 48 hours (h) later as described before [21], incubated at 4°C with 2.4G2 Fc receptor antibodies to reduce non-specific binding and then with conjugated antibodies. Flow cytometry was performed on a FACScanto II (Becton Dickinson, Mountain View, CA). In experiments aimed at isolating DC subsets, cell suspensions were first enriched in DCs by MACS using CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and then sorted on a FACSaria II (Becton Dickinson). Alveolar macrophages were excluded based on their



**Figure 2. In vivo exposure to HDM is required for obtaining lung DCs with proallergic activity.** Lung DCs from saline- or HDM-treated mice (saline/or HDM) were isolated and cultured in the presence or absence of HDM (/saline or/HDM). Cultured cells were then transferred to recipient mice that were challenged with HDM and sacrificed as in Figure 1 (n=6 recipient mice per group). A, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. B, ELISA measurement of IL-5 and IL-13 in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. C, Total and differential cell counts in BAL fluid.

doi:10.1371/journal.pone.0053242.g002



**Figure 3. CD11b<sup>+</sup>, but not CD11b<sup>-</sup>, lung DCs promote allergic responses following i.t. transfer.** CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup> lung DCs from HDM-treated mice were isolated and transferred to naïve recipients. Recipients were HDM-challenged and sacrificed as in Figure 1 (n=6 recipient mice per group). A, Gating strategy and post-sort phenotype of lung CD11b<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup> DCs from HDM-treated donor mice. B, Total and differential cell counts in BAL fluid. C, Hematoxylin and eosin (HE, upper panels) and periodic acid-Schiff (PAS, lower panels) staining of lung sections (scale bar: 100  $\mu$ m). D, Measurement of dynamic airway resistance. E, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. F, ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN- $\gamma$  in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g003

autofluorescence and CD11c<sup>hi</sup> phenotype. Cell viability was always assessed using 7-AAD. The purity of sorted DC populations always was >95%.

### Mouse Model of Allergic Airway Sensitization by Adoptive Transfer of Lung DCs

Unless specified otherwise,  $1 \times 10^6$  FACS-sorted lung DCs from C57BL/6 mice that were injected i.n. 24 h earlier with either 100  $\mu$ g HDM or saline were transferred into the trachea of anesthetized naïve recipients. Ten and 11 days (d) later, recipient mice were challenged with 5  $\mu$ g HDM i.n. Airway hyperresponsiveness (AHR) and airway allergy were evaluated 3 d later. Alternatively, i) CD45.1 rather than CD45.2 recipients were used, and ii)  $3 \times 10^4$  FACS-sorted BLN DCs from C57BL/6 donor mice were injected i.p. to naïve recipients.

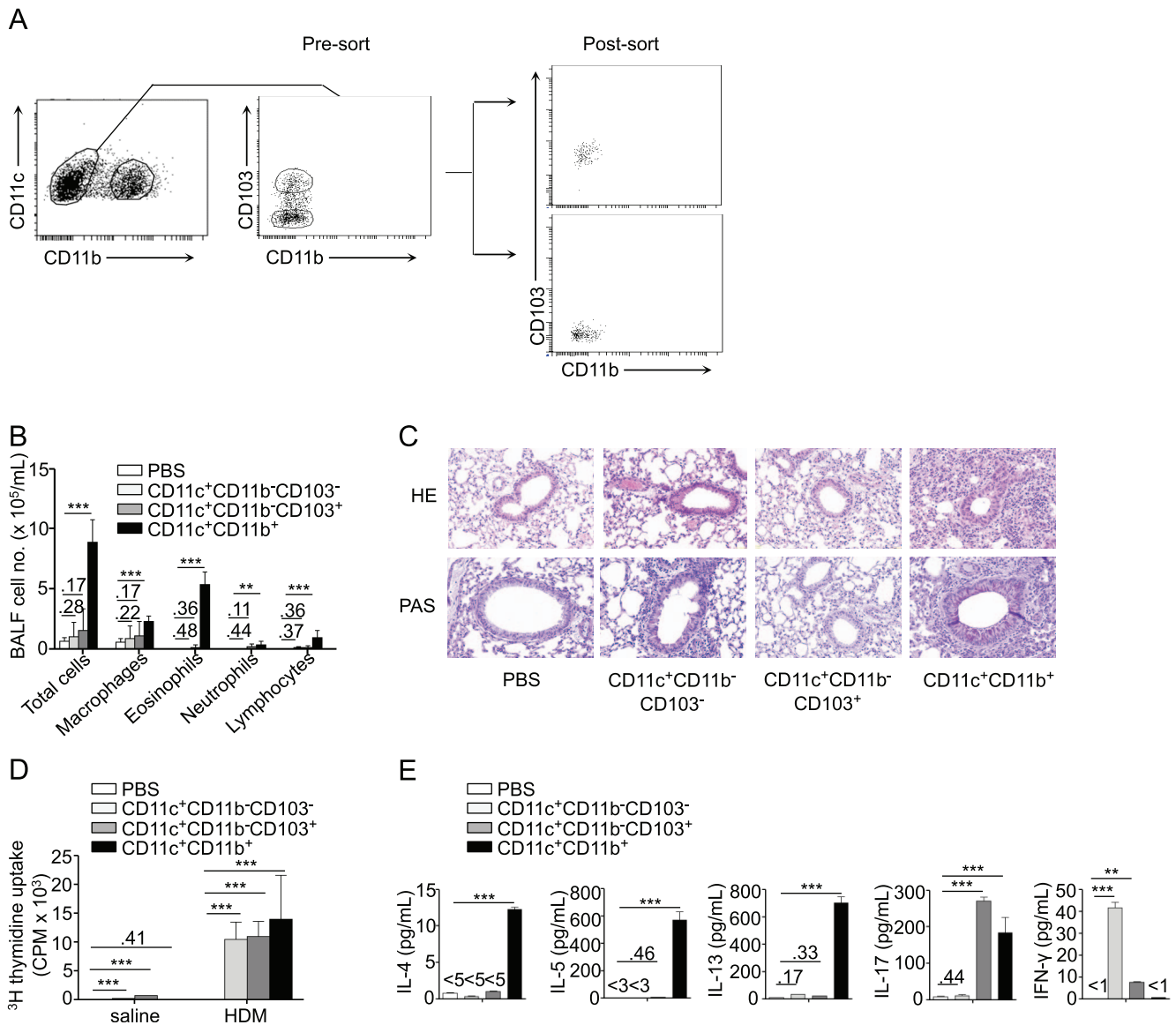
In experiments aimed at determining the requirement for *in vivo* HDM exposure, lung CD11c<sup>+</sup> DCs were sorted from mice treated

24 h earlier with HDM or saline, and cultured in the presence or absence of HDM (30  $\mu$ g/ml) for 18 h in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, and 50 IU/ml penicillin (all from Gibco-Invitrogen).  $5 \times 10^5$  live cultured lung DCs were then transferred to naïve recipients that were challenged and analyzed as described above.

### Assessment of Airway Allergy

Bronchoalveolar lavage (BAL), BAL cytology and lung histology were performed as described previously [21]. AHR was estimated by assessing dynamic airway resistance in anesthetized animals using a FlexiVent small animal ventilator (SCIREQ), as previously described [21]. Changes were expressed as percentage change from the baseline measurement (performed after PBS exposure). BLN cells were collected and restimulated as previously reported





**Figure 4. CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> lung DCs induce an antigen-specific IL-17 response.** Lung CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> cells from HDM-treated mice were isolated and transferred to naïve recipients. Recipients were HDM-challenged and sacrificed as in Figure 1. HDM-challenged mice that received lung CD11b<sup>+</sup> DCs were used as positive controls (n=6 recipient mice per group). A, Gating strategy and post-sort phenotype of lung CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> cells from HDM-treated donor mice. B, Total and differential cell counts in BAL fluid. C, Hematoxylin and eosin (HE, upper panels) and periodic acid-Schiff (PAS, lower panels) staining of lung sections (scale bar: 100 μm). D, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. E, ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN-γ in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g004

[22]. Supernatants of BLN cells were assayed for interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13, IL-17 and interferon-γ (IFN-γ) by ELISA (eBioscience [IL-4 and IFN-γ]; Invitrogen [IL-5 and IL-13]; Biologend [IL-17]). ELISA sensitivities were as follows: IL-4<5 pg/ml; IL-5<3 pg/ml; IL-13<2 pg/ml; IL-17<2.7 pg/ml; IFNγ <1pg/ml.

#### DC Migration

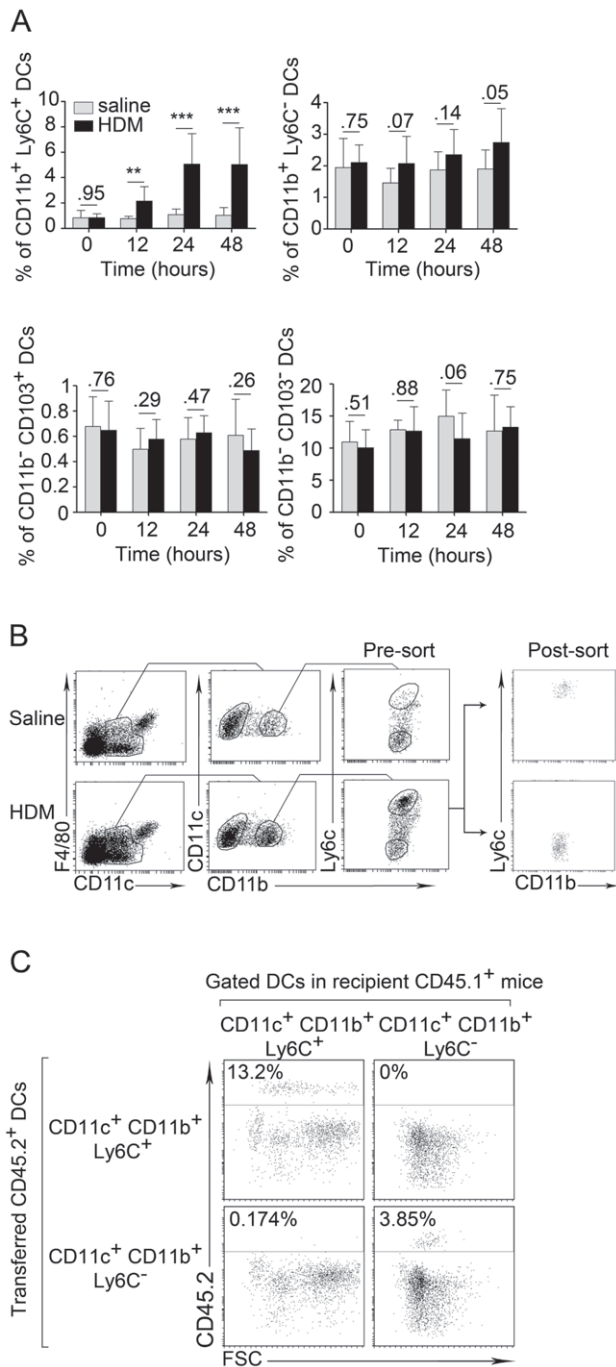
To assess lung DC migration, mice were injected intratracheally (i.t.) with either 50 μg HDM admixed to 100 μg OVA-FITC or saline. Twelve and 24 h later, lungs and BLNs were analyzed by flow cytometry for the presence of antigen-loaded DCs (FITC<sup>+</sup> DCs).

#### Measurement of Immunoregulatory Cytokines

CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs were isolated from HDM-treated mice and cultured overnight in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non-essential amino acids, 50 μM β-mercaptoethanol, 50 μg/ml streptomycin, and 50 IU/ml penicillin (all from Gibco-Invitrogen). Supernatants of these cell cultures were assayed for IL-6 (eBioscience), IL-12p40 subunit (R&D systems) by ELISA.

#### Statistical Analysis

Data are presented as means ± SD. The differences between mean values were estimated using an ANOVA test followed by pairwise Student's t tests. A P value of less than 0.05 was



**Figure 5. Study of the dynamics of lung DC subsets.** A, Percentage of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> DCs among total mononuclear lung cells at different time points following i.n. injection of either saline or HDM to naïve mice (n=4 mice per group). B, Gating strategy and post-sort phenotype of CD11b<sup>+</sup> lung DCs based on their expression of Ly6c after i.n. injection of saline or HDM. C, Analysis of the percentage of CD45.2<sup>+</sup> DCs among CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs in CD45.1 mice transferred 24 h earlier with either CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs from CD45.2 mice. All these analyses were performed using flow cytometry. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g005

considered significant (\*P<.05, \*\*P<.01, and \*\*\*P<.001). All experiments were repeated at least 3 times.

## Results

### Adoptive Transfer of *in vivo* Instructed Lung DCs is Sufficient to Induce Allergic Sensitization

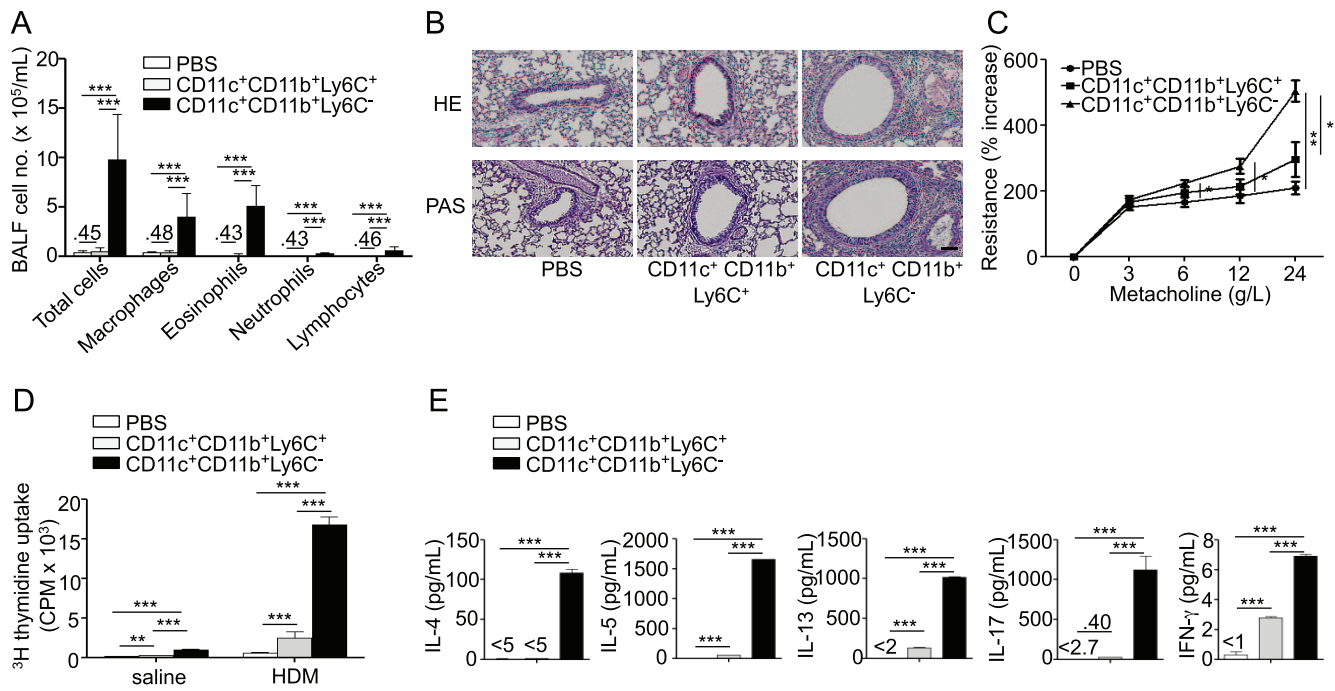
We first aimed at developing the most physiological possible model of allergic airway sensitization based on the adoptive transfer of lung DCs. Mice repeatedly exposed to i.n. HDM develop an airway disease that resembles human airway allergy [22,23]. We reasoned that lung DCs of HDM-treated mice should be able to take up and process HDM antigens *in vivo* and, upon i.t. transfer to naïve recipient mice, to induce HDM-specific T<sub>H</sub>2 cell differentiation and airway allergy. We thus treated donor C57Bl/6 mice with a single i.n. injection of HDM. One day later, we purified CD11c<sup>+</sup> lung DCs, defined classically as CD11c<sup>+</sup> non-autofluorescent cells (Figure 1a), and transferred them directly by i.t. instillation to naïve recipient syngeneic mice. Upon subsequent exposure to a low dose of HDM, mice that received lung DCs from HDM-treated mice, but not mice that received lung DCs from saline-treated mice, developed signs of airway allergy. These included increased inflammatory cell infiltration (Figure 1b-c) and mucus production in the airways (Figure 1c), as well as AHR (Figure 1d).

When assessing the profile of the adaptive response induced by the transfer of lung DCs from HDM-treated mice, we observed that restimulation of BLN cells of recipient mice with HDM led to significant cell proliferation (Figure 1e) and production of the T<sub>H</sub>2 cytokines IL-4, IL-5 and IL-13 (Figure 1f). We also detected a significant production of IL-17, and a low but significant production of IFN-γ (Figure 1f), additional features of HDM-induced airway allergy in mice [22,24].

Accumulating evidence indicates that allergen-induced activation of structural cells is essential for the promotion of a pro-T<sub>H</sub>2 phenotype in DCs [25,26], although activation of innate immune signaling within lung DCs also is required [22]. Furthermore, the lung DC pool is modified following allergen exposure, and *de novo* recruited inflammatory DCs were proposed to play a preferential role in the activation of T<sub>H</sub>2 cells [5,10]. We thus next aimed at testing whether lung DCs require *in vivo* exposure of the lung to HDM or whether direct HDM stimulation of steady-state lung DCs *ex vivo* may suffice for them to acquire pro-T<sub>H</sub>2 activity. We observed that DCs isolated from the lungs of HDM-treated mice, but not DCs exposed to HDM only *in vitro*, were able to induce HDM-specific adaptive type 2 responses (Figure 2a-b) and eosinophilic airway inflammation (Figure 2c) following transfer in naïve recipient mice. Thus, lung DCs may induce allergic airway sensitization upon adoptive transfer to naïve recipients only if they originate from allergen-exposed donors.

### Lung CD11b<sup>+</sup> DCs, but not CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs, Induce Allergic Airway Sensitization

Using the model established above, we next aimed at systematically determining the respective contribution of the different known lung DC subsets to the development of airway allergy in response to HDM. Lung DCs may be first grossly divided in 2 populations based on their differential expression of CD11b [8,9]. Lung CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> and CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs were sorted from the lungs of HDM-treated mice (Figure 3a), and directly transferred to naïve recipient mice, which were later challenged with i.n. HDM. We observed that mice transferred with lung CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs did not develop significant signs of airway allergy when compared with control mice that received PBS only (Figure 3b-c). In contrast, mice that received lung CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs from HDM-treated donors developed



**Figure 6. Only resident CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs are capable of inducing airway allergy.** CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs sorted as in Figure 5B were transferred from HDM-treated mice into naïve recipients. Recipients were HDM-challenged and sacrificed as in Figure 1 (n=6 recipient mice per group). A, Total and differential cell counts in BAL fluid. B, Hematoxylin and eosin (HE, upper panels) and periodic acid-Schiff (PAS, lower panels) staining of lung sections. C, Measurement of dynamic airway resistance. D, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. E, ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN-γ in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g006

significant airway eosinophilia (Figure 3b–c), goblet cell hyperplasia (Figure 3c) and AHR (Figure 3d).

*In vitro* HDM restimulation of BLN cells from mice transferred with lung CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs indicated that these cells efficiently primed HDM-specific type 2 responses (Figure 3e–f). Significant production of IL-17 and minimal secretion of IFN-γ were also observed in the BLN cell supernatant (Figure 3f). Intriguingly, although CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DC transfer did not lead to airway inflammation upon HDM challenge of recipient mice, BLN cells from these mice proliferated significantly upon HDM stimulation *in vitro*, and secreted significant amounts of IL-17 and IFN-γ, but not of type 2 cytokines (Figure 3f).

Because the CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> population contained CD103<sup>+</sup> and CD103<sup>-</sup> cells (Figure 4a), we also studied the consequences of a separate transfer of these two populations on the response of naïve recipient mice to allergen restimulation. Again, none of these two populations induced parameters of airway allergy (Figure 4b–c). Yet, upon *in vitro* antigenic restimulation, lymph node cells from mice transferred with both populations exhibited significant proliferative responses (Figure 4d). Interestingly, lymph node cells from mice that received CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> cells secreted high levels of IL-17 and comparatively less IFN-γ, whereas BLN cells from mice transferred with CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> cells secreted IFN-γ only (Figure 4e).

#### CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs, but not CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs Induce Allergic Airway Sensitization

The pool of lung CD11b<sup>+</sup> DCs expands following allergenic challenge of the airways [10,27], which correlates with the recruitment of blood Ly6c<sup>+</sup> monocytes [25]. In different contexts, including acute lung inflammation, Ly6c<sup>+</sup> monocytes were shown to differentiate into inflammatory DCs [5,12,28–30], which may

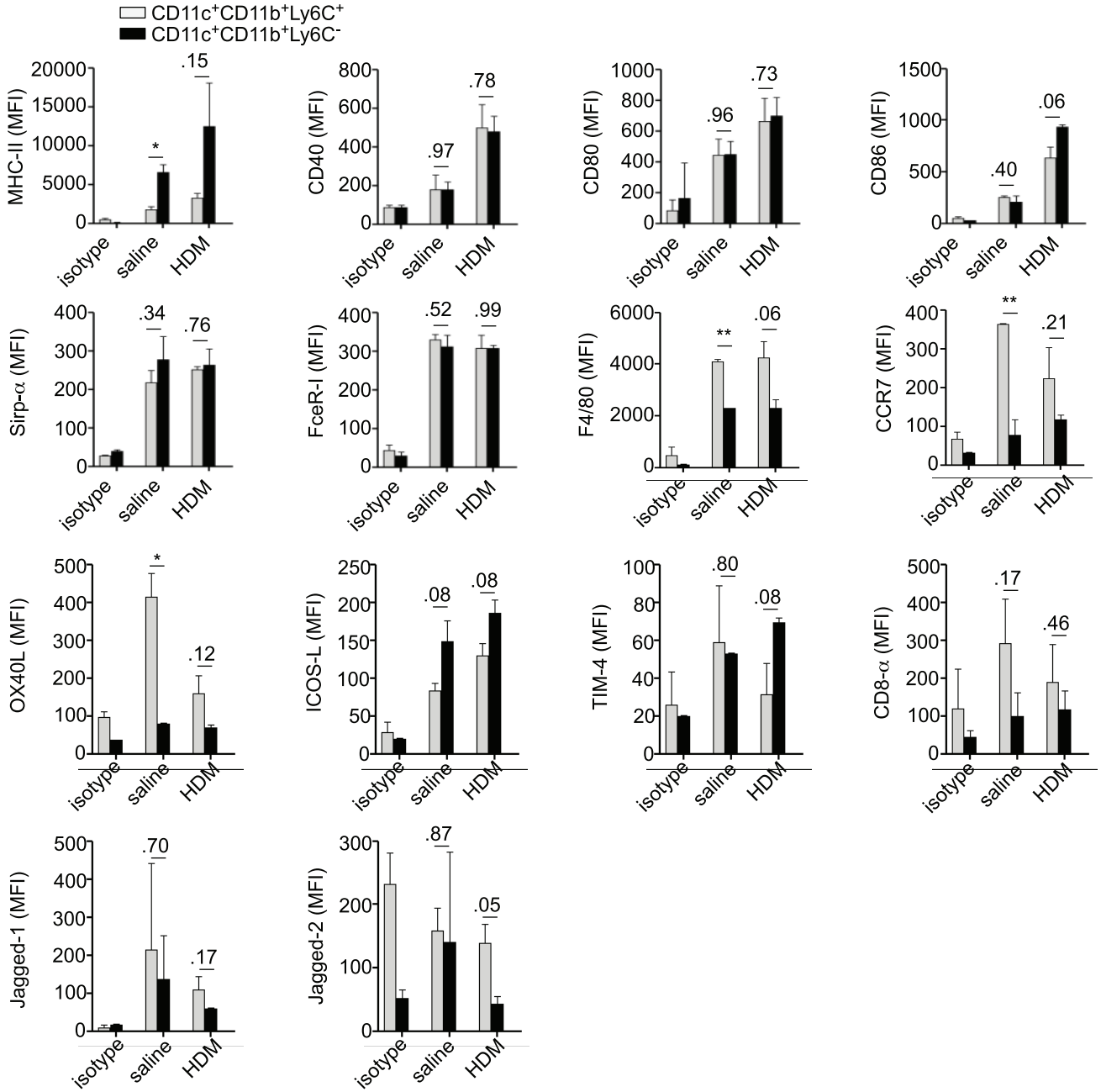
retain expression of the Ly6c marker as a remnant of their origin [12,30]. Fitting with the possibility that Ly6c<sup>+</sup> monocytes may differentiate into inflammatory DCs also in allergen-exposed lung, lung FCεRI<sup>+</sup> DCs with proposed pro-allergic activity express Ly6c [5]. We thus hypothesized that Ly6c could be used as a marker to discriminate inflammatory CD11b<sup>+</sup> DCs, whose numbers increase following HDM exposure, from resident CD11b<sup>+</sup> DCs, whose numbers remain stable (Figure 5a–b). Numbers of DCs of the CD11b<sup>-</sup> subsets did not vary significantly in the lung following HDM challenge (Figure 5a).

Because Ly6c has been proposed to be a dynamic marker in other tissues, we first aimed at determining whether lung CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs may differentiate into CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs, or vice-versa, upon HDM exposure. We thus transferred CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs isolated from the lung of HDM-treated CD45.2<sup>+</sup> C57Bl6 mice *i.t.* into HDM-treated CD45.1<sup>+</sup> C57Bl6 recipients and assessed for their expression of Ly6c the next day. This experiment revealed that the expression of Ly6c is stable on CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs (Figure 5c). Ly6c expression was also stable following *in vitro* culture of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs in the presence or absence of HDM (data not shown). They thus likely represent distinct DC subsets in the lung.

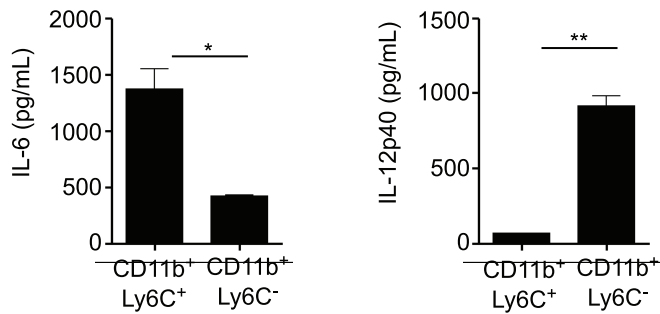
We observed that, counter-intuitively, only resident CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs were able to transfer airway allergy to naïve recipient mice (Figure 6a–c) and to promote type 2 cytokine, IL-17 and, to a lesser extent, IFN-γ production from BLN cells (Figure 6d–e). Transfer of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs in contrast only induced negligible BLN cell proliferation and production of IL-5, IL-13 and IFN-γ (Figure 6d–e).

Of note, of all 4 DC subsets, only CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> cells remained able to induce allergic airway sensitization to HDM in

**A**



**B**



**Figure 7. Phenotypic characterization of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> lung DCs.** A, Flow cytometric assessment of the expression levels of MHC-II, CD40, CD80, CD86, Sirp- $\alpha$ , Fc $\epsilon$ R-1, F4/80, CCR7, OX40L, ICOS-L, TIM-4, CD8 $\alpha$ , Jagged-1 and Jagged-2 on the surface of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs from saline- and HDM-treated mice (n = 4 mice per group) (MFI, mean fluorescence intensity). B, ELISA measurement of the production of IL-6 and IL-12p40 by CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs from HDM-treated mice.  
doi:10.1371/journal.pone.0053242.g007

naïve recipient mice if individual DC subsets were isolated from the lung of mice 12 h after HDM treatment, instead of 24 h post-treatment as in all figures presented above (data not shown). In addition, similar results were also obtained if, instead of  $1 \times 10^6$  cells of each DC subset, naïve recipient mice received numbers of cells of each subset similar to those observed in the mouse lung (i.e.  $6 \times 10^5$  CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup>,  $3 \times 10^4$  CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>,  $1 \times 10^5$  CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> or  $2.5 \times 10^5$  CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs) (data not shown).

### CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> Lung DCs Present Aeorantigens to Lymph Node T cells

We finally aimed at understanding the differences in the biology of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs that could explain why only the first were able to initiate airway allergy. To prime naïve T cells in the lung draining lymph nodes, lung DCs should be able to mature, and to transport antigens to the lymph nodes. We thus first compared the surface expression of markers whose expression levels indicate DC maturation and activation, along with other phenotypic surface markers, on CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs in the lung of saline or HDM-treated mice. We observed that both subsets expressed similar levels of all markers tested (Figure 7a). Of note, they expressed similar levels of Fc $\epsilon$ RI and Sirp- $\alpha$  (Figure 7a), but were negative for c-Kit (data not shown), which were all recently proposed to be markers of pro-T<sub>H</sub>2 DCs in airway allergy [5,10,31]. Both subsets also expressed CCR7 (Figure 7a). Second, we assessed the production of immunomodulatory cytokines by CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs and observed a preferential production of IL-6 by the CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> subset and of the IL12 p40 subunit by CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs (Figure 7b). Finally, we studied the dynamics of the distinct DC subsets in the BLNs of HDM-treated mice as well as their respective antigen uptake and delivery to the BLNs by means of i.t. administration of HDM combined with OVA-FITC, as described previously [5,28–30]. We observed that the numbers of all the DC subsets in the BLNs increased following HDM treatment (Figure 8a) and that all were able to take up antigen in the lung with various efficiencies (Figure 8b). Although both CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> and CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs were able to take up antigens in the lung, with CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs being most efficient, CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs were clearly superior at transporting them efficiently to the BLNs following HDM exposure (Figure 8b).

Finally, further supporting that CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs indeed are responsible for the activation of naïve T cells in the lymph nodes, we observed that CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs isolated from the BLNs of HDM-treated donor mice were able to induce T<sub>H</sub>2 cell differentiation (Figure 9a–b) and subsequent airway allergy (Figure 9c) when transferred i.p. to naïve recipient mice. In contrast, CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs isolated in the same conditions failed to do so (Figure 9a–c).

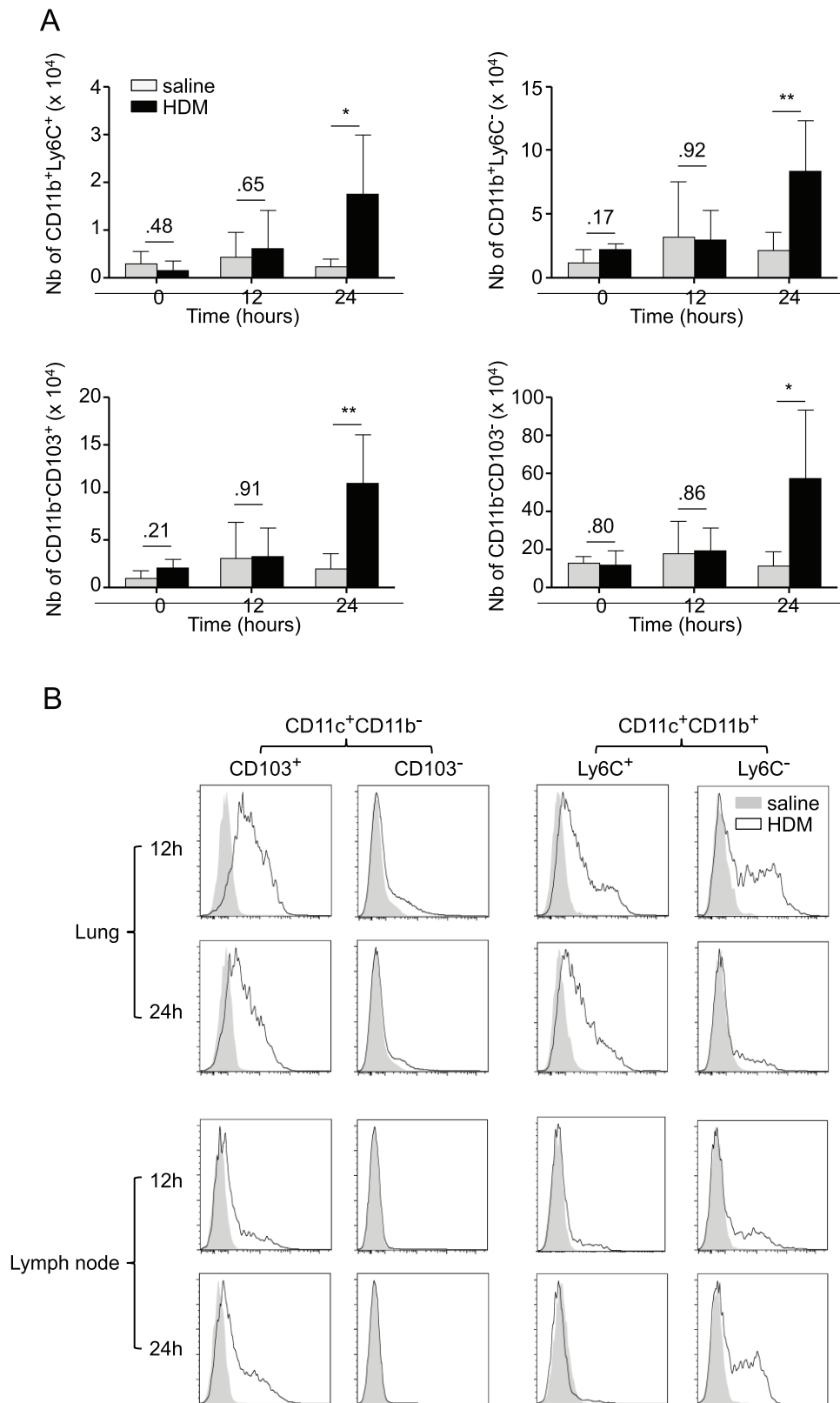
## Discussion

In this study, we established a model of airway allergy based on the adoptive transfer of lung DCs isolated from donor mice exposed to the clinically relevant allergen HDM. Because this model relies on the *in vivo* instruction and antigen uptake of donor

lung DCs, it avoids potential alterations due to *in vitro* culture or allergen loading inherent to most previous adoptive transfer studies. Further supporting the physiological relevance of such an approach, we observed that only DCs isolated from HDM-treated lung, but not lung DCs exposed *ex vivo* to HDM, could transfer allergic airway sensitization to naïve recipient mice. This observation is in line with the idea that lung DCs require instruction from the local allergen-induced inflammatory environment to acquire a pro-T<sub>H</sub>2 phenotype [26,32]. The fact that *de novo* recruited inflammatory CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs are devoid of autonomous pro-allergic activity in our model suggests that resident lung DCs are the essential targets of this instruction. Another as yet untested possibility might also be that CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs recruited *de novo* following allergen exposure of the lung are involved in allergic airway sensitization.

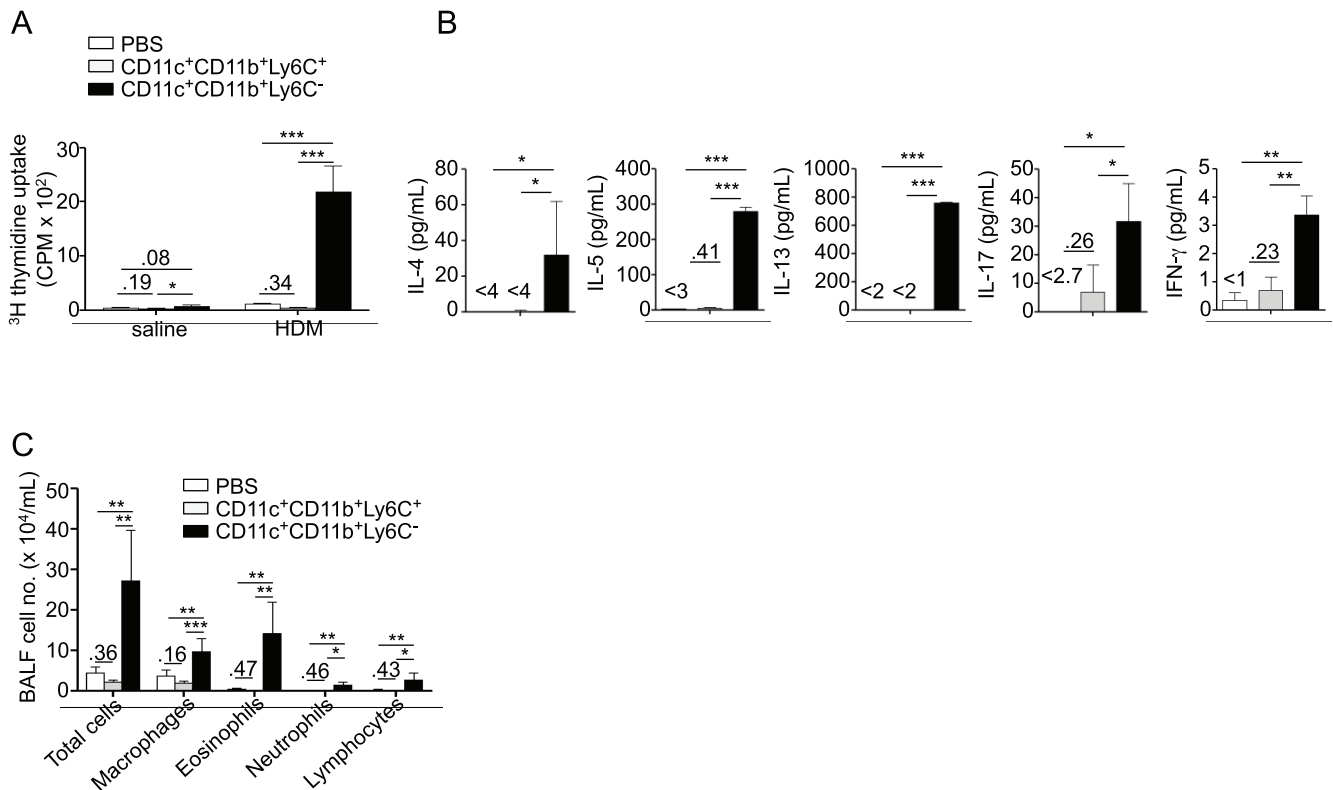
The recognition of their heterogeneity led to the interesting possibility that, like lymph node DCs [33], distinct lung DC subsets are endowed with specific activities as antigen presenting cells [34,35]. This notion is however so far only supported by few direct examples. For instance, in models of influenza infection, CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs participate in the induction of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell responses, whereas CD11b<sup>+</sup> DCs seem unable to activate naïve T cells, and could rather participate in the recruitment of effector cells [18]. The recent studies that addressed the question of whether such a distribution of roles also applies to the induction of T<sub>H</sub>2 responses to inhaled allergens *in vivo* reached contradictory conclusions [5,13]. We foresee that a possible explanation for these discrepancies lies in the fact that none of these studies examined the activity of each lung DC subset in one unique experimental setting *in vivo*. This indeed obviously complicates the assessment of the relative contribution of each subset to allergic airway sensitization. In this study, we compared the pro-allergic activity of each DC subset systematically in a unique model.

We observed that only resident CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs are able to induce T<sub>H</sub>2 cell differentiation and subsequent airway allergy to HDM. This raises the question of what the role of the other lung DC subsets in this context might be. Unexpectedly indeed, in spite of their significant recruitment and antigen uptake following HDM exposure, we did not observe any significant autonomous capacity of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> inflammatory DCs to prime adaptive immune responses in our model. Instead, allergen-loaded CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs appear to mostly remain in the lung following HDM exposure, unlike CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs, which display efficient antigen transport activity to the BLNs. The reason for this differential behavior remains unclear, since both subsets express CCR7. We hypothesize that CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs may be implicated more in the establishment of an inflammatory environment upon allergenic exposure, or in the recruitment and activation of effector cells. In models of airway allergy focusing on the effector phase of the disease indeed, CD11b<sup>+</sup> cells were shown to be preferential sources of chemoattractants toward T<sub>H</sub>2 cells and eosinophils [36,37]. Another study also reported that CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> lung DCs may retain inhaled antigens for long periods in the lung and locally reactivate antigen-specific T cells [38], in line with our observation that these cells efficiently take up antigens inhaled in an allergenic context. Very recently, intravital imaging revealed that a fraction of CD11b<sup>+</sup> DCs is



**Figure 8. CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup>, but not CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> lung DCs efficiently transport antigen to the BLNs.** A, Kinetics of the number of CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> DCs in the bronchial lymph node following i.n. injection of either saline or HDM to naïve mice (n=4 mice per group). B, Representative flow cytometric analysis of the presence of antigen-loaded (OVA-FITC<sup>+</sup>) CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> and CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>-</sup> DCs in the lungs and BLNs of naïve mice injected i.t. 12 or 24 h earlier with either saline or HDM combined with OVA-FITC.

doi:10.1371/journal.pone.0053242.g008



**Figure 9. CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> lung DCs migrating to the lymph nodes have pro-T<sub>H</sub>2 properties.** CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> or CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs isolated from the BLNs of HDM-treated mice were transferred i.p. into naive recipients (n=6 recipient mice per group). Recipients were challenged and sacrificed as in Figure 1. A, Proliferation of BLN cells after *in vitro* HDM stimulation. B, ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 and IFN-γ in the supernatant of HDM-stimulated BLN cells. C, Total and differential cell counts in BAL fluid. doi:10.1371/journal.pone.0053242.g009

retained in close proximity of the conducting airways upon allergen reexposure in sensitized mice, and that they may locally interact with and activate memory T cells [39]. Whether these cells correspond to CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>+</sup> DCs is a likely possibility that would require further testing.

We also observed that transfer of CD11b<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs, although devoid of pro-T<sub>H</sub>2 activity, induced HDM-specific responses characterized mostly by the production of IL-17 and, to a lesser extent, of IFN-γ upon transfer *in vivo*. The physiological relevance of this observation is currently unclear, but suggests that this subset may be involved in the induction of previously described non-T<sub>H</sub>2 components of the response to HDM [22,24]. Interestingly, these cells were also recently shown to be able to reactivate allergen-specific T<sub>H</sub>2 cells in response to LPS stimulation [40]. Thus, unlike in the sensitization phase, where CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs appear as the essential triggers of T<sub>H</sub>2 cell activation, it is likely that different lung DC subsets may participate in T<sub>H</sub>2 cell reactivation in sensitized individuals [38,40].

## References

- Locksley RM (2010) Asthma and Allergic Inflammation. *Cell* 140: 777–783.
- Lambrecht BN, Hammad H (2009) Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. *Immunity* 31: 412–424.
- Lambrecht BN, Hammad H (2012) Lung dendritic cells in respiratory viral infection and asthma: from protection to immunopathology. *Annu Rev Immunol* 30: 243–270.
- Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA (2001) Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193: 51–60.
- Hammad H, Plantinga M, Deswarte K, Pouliot P, Willart MA, et al. (2010) Inflammatory dendritic cells—not basophils—are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. *J Exp Med* 207: 2097–2111.
- Sung S, Rose CE, Fu SM (2001) Intratracheal priming with ovalbumin- and ovalbumin 323–339 peptide-pulsed dendritic cells induces airway hyperresponsiveness, lung eosinophilia, goblet cell hyperplasia, and inflammation. *J Immunol* 166: 1261–1271.

In conclusion, this study supports that, among lung DCs, resident CD11b<sup>+</sup>Ly6c<sup>-</sup> DCs are the essential triggers of T<sub>H</sub>2 cell activation and allergic airway sensitization to HDM.

## Acknowledgments

The authors thank L. Duwez and F. Olivier from the GIGA Animal Facility for animal management, Dr S. Ormenese and R. Stephan from the Cell Imaging and Flow Cytometry GIGA Technological Platform for FACS analyses, Drs M. Guéders, F. Quesada Calvo, G. Paulissen and F. Perin for hyperreactivity measurements, L. Sacré and Dr C. Humblet for help with histological procedures, and Dr F. Farnir for statistical analyses. We also thank V. Conrath, R. Fares, C. François, J. Parisi, and I. Sbai for technical and secretarial assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FB CJD. Performed the experiments: CM CMS TM MT. Analyzed the data: CM CMS FB CJD. Contributed reagents/materials/analysis tools: DC PVD PL. Wrote the paper: CJD.

7. Lambrecht BN, De Veerman M, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Thielemans K, et al. (2000) Myeloid dendritic cells induce Th2 responses to inhaled antigen, leading to eosinophilic airway inflammation. *J Clin Invest* 106: 551–559.
8. del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Forster R (2007) 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* 178: 6861–6866.
9. Sung SS, Fu SM, Rose CE, Jr., Gaskin F, Ju ST, et al. (2006) A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol* 176: 2161–2172.
10. Raymond M, Rubio M, Fortin G, Shalaby KH, Hammad H, et al. (2009) Selective control of SIRP- $\alpha$ -positive airway dendritic cell trafficking through CD47 is critical for the development of TH2-mediated allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 124: 1333–1342.
11. Xu Y, Zhan Y, Lew AM, Naik SH, Kershaw MH (2007) Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking. *J Immunol* 179: 7577–7584.
12. Greter M, Helft J, Chow A, Hashimoto D, Mortha A, et al. (2012) GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* 36: 1031–1046.
13. Nakano H, Free ME, Whitehead GS, Maruoka S, Wilson RH, et al. (2011) Pulmonary CD103(+) dendritic cells prime Th2 responses to inhaled allergens. *Mucosal Immunol* 5: 53–65.
14. Tailor P, Tamura T, Morse HC, 3rd, Ozato K (2008) The BXH2 mutation in IRF8 differentially impairs dendritic cell subset development in the mouse. *Blood* 111: 1942–1945.
15. Turcotte K, Gauthier S, Tuite A, Mullick A, Malo D, et al. (2005) A mutation in the *Icsbp1* gene causes susceptibility to infection and a chronic myeloid leukemia-like syndrome in BXH-2 mice. *J Exp Med* 201: 881–890.
16. Turcotte K, Gauthier S, Malo D, Tam M, Stevenson MM, et al. (2007) *Icsbp1*/IRF-8 is required for innate and adaptive immune responses against intracellular pathogens. *J Immunol* 179: 2467–2476.
17. van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, et al. (2005) In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201: 981–991.
18. GeurtsvanKessel CH, Willart MA, van Rijt LS, Muskens F, Kool M, et al. (2008) Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin+CD11b- but not plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 205: 1621–1634.
19. Hebel K, Griewank K, Inamine A, Chang H-D, Müller-Hilke B, et al. (2006) Plasma cell differentiation in T-independent type 2 immune responses is independent of CD11c-high dendritic cells. *Eur J Immunol* 36: 2912–2919.
20. Tittel AP, Heuser C, Ohliger C, Llanto C, Yona S, et al. (2012) Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice. *Nat Methods* 9: 385–390.
21. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, et al. (2009) Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119: 3723–3738.
22. Marichal T, Bedoret D, Mesnil C, Pichavant M, Goriely S, et al. (2010) Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J Allergy Clin Immunol* 126: 836–844.
23. Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, et al. (2004) Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol* 173: 6384–6392.
24. Phipps S, Lam CE, Kaiko GE, Foo SY, Collison A, et al. (2009) Toll/IL-1 signaling is critical for house dust mite-specific helper T cell type 2 and type 17 responses. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 883–893.
25. Hammad H, Chieppa M, Perros F, Willart MA, Germain RN, et al. (2009) House dust mite allergen induces asthma via Toll-like receptor 4 triggering of airway structural cells. *Nat Med* 15: 410–416.
26. Tan AM, Chen HC, Pochard P, Eisenbarth SC, Herrick CA, et al. (2010) TLR4 signaling in stromal cells is critical for the initiation of allergic Th2 responses to inhaled antigen. *J Immunol* 184: 3535–3544.
27. Robays IJ, Maes T, Lebecque S, Lira SA, Kuziel WA, et al. (2007) Chemokine receptor CCR2 but not CCR5 or CCR6 mediates the increase in pulmonary dendritic cells during allergic airway inflammation. *J Immunol* 178: 5305–5311.
28. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, et al. (2006) Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7: 663–671.
29. Kool M, Soullie T, van Nimwegen M, Willart MA, Muskens F, et al. (2008) Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205: 869–882.
30. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, et al. (2011) DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 17: 996–1002.
31. Krishnamoorthy N, Oriss TB, Paglia M, Fei M, Yarlagadda M, et al. (2008) Activation of c-Kit in dendritic cells regulates T helper cell differentiation and allergic asthma. *Nat Med* 14: 565–573.
32. Lambrecht BN, Hammad H (2010) The role of dendritic and epithelial cells as master regulators of allergic airway inflammation. *Lancet* 376: 835–843.
33. Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, et al. (2007) Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315: 107–111.
34. GeurtsvanKessel CH, Lambrecht BN (2008) Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol* 1: 442–450.
35. Plantinga M, Hammad H, Lambrecht BN (2010) Origin and functional specializations of DC subsets in the lung. *Eur J Immunol* 40: 2112–2118.
36. Beaty SR, Rose CE, Jr., Sung SS (2007) Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhigh dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol* 178: 1882–1895.
37. Medoff BD, Seung E, Hong S, Thomas SY, Sandall BP, et al. (2009) CD11b+ myeloid cells are the key mediators of Th2 cell homing into the airway in allergic inflammation. *J Immunol* 182: 623–635.
38. Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O'Garra A, et al. (2002) A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16: 271–283.
39. Thornton EE, Looney MR, Bose O, Sen D, Sheppard D, et al. (2012) Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *J Exp Med* 209: 1183–1199.
40. Ortiz-Stern A, Kanda A, Mionnet C, Cazareth J, Lazzari A, et al. (2011) Langerin+ dendritic cells are responsible for LPS-induced reactivation of allergen-specific Th2 responses in postasthmatic mice. *Mucosal Immunol* 4: 343–353.



---

## Annexes - Articles publiés

Etude 3 :

DNA released from dying host cells mediates aluminium  
adjuvant activity

---

# DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity

Thomas Marichal<sup>1,2</sup>, Keiichi Ohata<sup>3</sup>, Denis Bedoret<sup>1,2</sup>, Claire Mesnil<sup>1,2</sup>, Catherine Sabatel<sup>1,2</sup>, Kouji Kobiyama<sup>3,4</sup>, Pierre Lekeux<sup>1,2</sup>, Cevayir Coban<sup>3</sup>, Shizuo Akira<sup>3</sup>, Ken J Ishii<sup>3-5</sup>, Fabrice Bureau<sup>1,2,5</sup> & Christophe J Desmet<sup>1,2,5</sup>

Aluminum-based adjuvants (aluminum salts or alum) are widely used in human vaccination, although their mechanisms of action are poorly understood. Here we report that, in mice, alum causes cell death and the subsequent release of host cell DNA, which acts as a potent endogenous immunostimulatory signal mediating alum adjuvant activity. Furthermore, we propose that host DNA signaling differentially regulates IgE and IgG1 production after alum-adjuvanted immunization. We suggest that, on the one hand, host DNA induces primary B cell responses, including IgG1 production, through interferon response factor 3 (Irf3)-independent mechanisms. On the other hand, we suggest that host DNA also stimulates 'canonical' T helper type 2 (T<sub>H</sub>2) responses, associated with IgE isotype switching and peripheral effector responses, through Irf3-dependent mechanisms. The finding that host DNA released from dying cells acts as a damage-associated molecular pattern that mediates alum adjuvant activity may increase our understanding of the mechanisms of action of current vaccines and help in the design of new adjuvants.

Since the first report of its adjuvant activity in 1926 (ref. 1), it has been widely believed that alum creates an immunologically inert 'depot' that prolongs antigen exposure or facilitates antigen uptake by antigen-presenting cells (APCs). However, in line with the decades-old observation that alum triggers interleukin (IL)-1 $\beta$  production<sup>2</sup>, recent reports indicated that alum may activate caspase 1 (encoded by *Casp1*)<sup>3</sup> through inflammasomes containing the cytosolic receptor Nlrp3 (NLR family, pyrin domain containing 3)<sup>4-8</sup>. Whether the Nlrp3 inflammasome consistently contributes to the adjuvant effect of alum on humoral responses *in vivo*, however, remains unclear<sup>5-10</sup>. Nevertheless, these studies suggested that signaling through specific receptors of innate immunity, commonly referred to as pattern recognition receptors (PRRs), might have a role in the adjuvant activity of alum. Notably, it has also been proposed that alum induces the local accumulation of uric acid, which would act as an endogenous adjuvant molecule boosting T cell responses<sup>11</sup>.

It has actually long been known that alum exerts some level of cytotoxicity<sup>12</sup>. Moreover, dying cells release numerous molecules that act as endogenous danger signals, or damage-associated molecular patterns (DAMPs), and which can alert the innate immune system through the activation of various PRR signaling pathways<sup>13,14</sup>. We thus hypothesized that DAMPs released at immunization sites and the subsequent activation of PRR signaling could contribute to the adjuvant effects of alum. Here we report that alum-induced cytotoxicity results in the release of host DNA, which acts as a DAMP mediating the adjuvant activity of alum.

## RESULTS

### Host DNA boosts adaptive responses after alum immunization

We observed that endotoxin-free ovalbumin (OVA) adsorbed on Imject Alum (alum), administered intramuscularly (i.m.) or intraperitoneally (i.p.), induced the local accumulation of extracellular double-stranded DNA (dsDNA) in mice (Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a), part of which was entrapped in macroscopic alum depots (Fig. 1b and Supplementary Fig. 1b). This dsDNA release correlated with the death of local cells (Fig. 1c and Supplementary Fig. 1c). Both alum and aluminum hydroxide gel (Alhydrogel) induced similar DNA release and cell death (Supplementary Fig. 1d,e).

Because released host cell DNA may trigger immune responses<sup>13,15-17</sup>, we hypothesized that extracellular host DNA could act as an endogenous adjuvant in alum vaccination. Remarkably, i.p. or i.m. injections of OVA mixed with purified mouse genomic DNA (OVA and DNA), in quantities similar to those released by alum, boosted OVA-specific IgM, IgG1 and IgE responses as efficiently as OVA and alum (Fig. 2a-c and Supplementary Fig. 2a-c). IgG2c production was not significantly induced in these conditions (data not shown). Thus, like alum, host DNA may act as an adjuvant that preferentially boosts T<sub>H</sub>2-dependent humoral responses. Digestion of extracellular DNA *in vivo* by treatment with DNase I decreased antigen-specific humoral responses in OVA and alum-treated mice (Fig. 2d-f). Furthermore, the transfer of OVA, together with acellular peritoneal lavage fluid from mice immunized i.p. with OVA and alum, triggered OVA-specific IgG1 and IgE production in naive recipient mice, a response

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, Groupe Interdisciplinaire de Génomprotéomique Appliquée, University of Liège, Liège, Belgium. <sup>2</sup>Laboratory of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium. <sup>3</sup>World Premier International Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan. <sup>4</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan. <sup>5</sup>These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to C.J.D. (christophe.desmet@ulg.ac.be) or K.J.I. (kenishii@biken.osaka-u.ac.jp).

Received 11 February; accepted 19 May; published online 17 July 2011; doi:10.1038/nm.2403

**Figure 1** Alum induces cell death and release of host DNA at sites of injection. **(a)** Quantity of free dsDNA in the acellular fraction of the peritoneal lavage fluid of mice treated i.p. with increasing doses of alum, measured over time using quantitative fluorescent dsDNA stain. **(b)** Confocal microscopic imaging of extracellular DNA deposition in alum macroscopic i.p. depots stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Scale bars, 25  $\mu\text{m}$ . **(c)** Cell death rate in the peritoneal lavage fluid of mice treated i.p. with increasing doses of alum, assessed by staining with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) and flow cytometry.  $n = 5$  (**a,c**). Data are representative of one of three independent experiments. Error bars show means  $\pm$  s.d. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

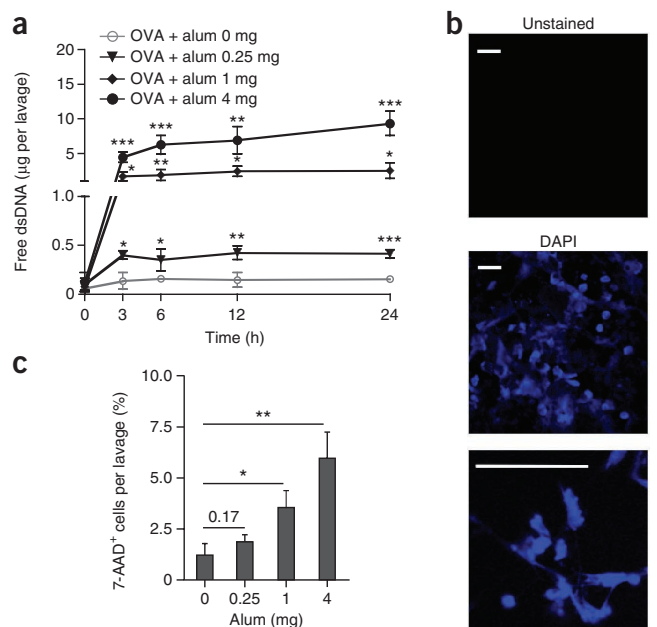
that was abrogated by DNase I treatment of the lavage fluid prior to transfer (**Supplementary Fig. 3a,b**).

We also observed that the proliferation of both adoptively transferred carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)-labeled (**Fig. 2g**) and endogenous (**Supplementary Fig. 4**) OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells was comparable in OVA and DNA- and OVA and alum-treated mice and reduced after treatment of the mice with DNase I (**Fig. 2g** and **Supplementary Fig. 4**). These results thus support the idea that host DNA is a potent endogenous adjuvant molecule that has a role in the induction of humoral and T cell responses by alum.

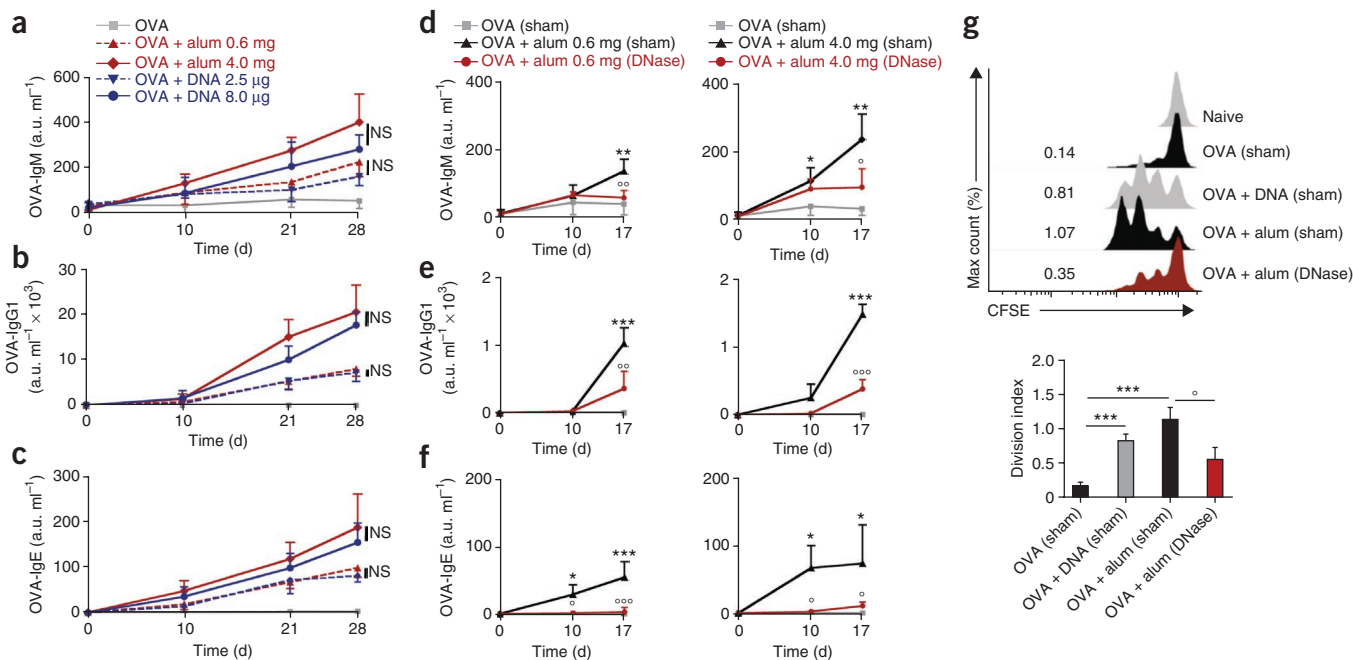
### Alum signals through Tbk1 and Irf3 to boost IgE responses

*In vivo*, only toll-like receptor 9 (Tlr9) has been implicated in host DNA recognition, under specific pathologic conditions<sup>18,19</sup>. However, we observed that mice deficient in Tlr9 developed humoral responses similar to those of their wild-type (WT) counterparts in response to alum immunization (data not shown).

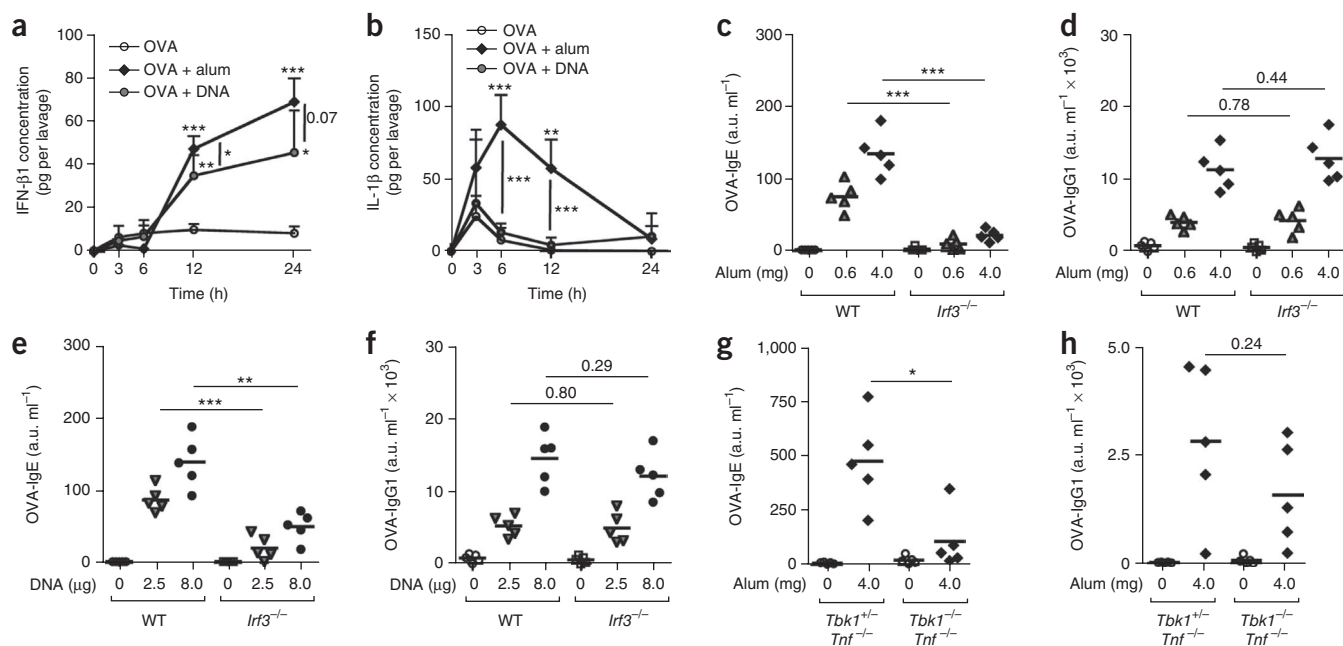
In addition to Tlr9, other molecules have been identified as putative host DNA receptors *in vitro*<sup>20–27</sup>. These receptors activate



either the inflammasome pathway, leading to mature IL-1 $\beta$  protein expression<sup>21,23,24</sup>, or the Irf3 pathway, leading to interferon (IFN)- $\beta$ 1 expression<sup>20,22,25–28</sup>. Whereas OVA and DNA upregulated IFN- $\beta$ 1 secretion similarly to OVA and alum (**Fig. 3a**), OVA and DNA did not induce more IL-1 $\beta$  production than OVA alone, unlike OVA and alum (**Fig. 3b**). This suggested that, after alum immunization, extracellular DNA activated Irf3, but not the inflammasome pathway. By further investigating the general importance of inflammasomes



**Figure 2** Host DNA released by alum cytotoxicity mediates alum adjuvant activity on humoral and T<sub>H</sub>2 cell responses. **(a–f)** Serum titers of OVA-specific IgM (OVA-IgM; **a,d**), IgG1 (OVA-IgG1; **b,e**) and IgE (OVA-IgE; **c,f**). Titers were measured on the indicated days in **(a–c)** mice immunized i.p. with OVA alone, OVA and alum, or OVA and DNA on days 0 and 14, and boosted with OVA on d 21; or in **(d–f)** mice immunized i.p. with OVA or OVA and alum, treated i.p. with DNase I both 3 and 18 h later, and then boosted with OVA 10 d later. **(g)** Proliferation profile (top) and division index (bottom) of adoptively transferred CFSE-labeled OVA-specific CD4<sup>+</sup> OT-II cells in the bronchial lymph nodes of mice treated i.p. with OVA, OVA and alum, OVA and alum, or OVA and alum followed by DNase I treatment. Inserted numbers indicate division index values.  $n = 5$ ; data are representative of one of two (**a–c**) or three (**d–g**) independent experiments. Error bars show means  $\pm$  s.d. \*, ° $P < 0.05$ , \*\*, °° $P < 0.01$ , \*\*\*, °°° $P < 0.001$ . a.u., arbitrary unit. NS, not significant.



**Figure 3** Alum and host genomic DNA trigger type I IFN secretion and IgE responses through activation of the Tbk1-Irf3 axis. (a,b) Quantities of (a) IFN-β1 and (b) IL-1β in the peritoneal lavage fluid over time by ELISA in WT mice treated i.p. with OVA, OVA and DNA, or OVA and alum. (c–f) Serum titers of OVA-specific IgE (c,e) and IgG1 (d,f) measured on day 28 in WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice immunized i.p. with OVA, OVA and alum (c,d), or OVA and DNA (e,f) on days 0 and 14, and then boosted with OVA on day 21. (g,h) Serum titers of OVA-specific IgE (g) and IgG1 (h) measured on day 28 in *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Tnf*<sup>-/-</sup> and *Tbk1*<sup>-/-</sup>/*Tnf*<sup>-/-</sup> mice immunized i.p. with OVA and alum on days 0 and 14, and then boosted with OVA on day 21. *n* = 5; data are representative of one of three independent experiments. Error bars show means ± s.d. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. a.u., arbitrary unit.

in the adjuvant activity of alum, we observed that *Nlrp3*-deficient (*Nlrp3*<sup>-/-</sup>) and Caspase 1-deficient (*Casp1*<sup>-/-</sup>) mice developed humoral responses comparable to those of WT mice after alum immunization (Supplementary Fig. 5a,b).

We next examined whether *Irf3* is required for the adjuvant activity of alum. We found that, compared with their WT counterparts, in *Irf3*-deficient (*Irf3*<sup>-/-</sup>) mice, i.p. immunization with OVA and alum triggered reduced antigen-specific IgE responses (Fig. 3c). Notably, however, the antigen-specific IgG1 serum titers of *Irf3*<sup>-/-</sup> mice were similar to those of WT mice (Fig. 3d). Furthermore, we also saw the dependency of antigen-specific IgE production on *Irf3* when we used human serum albumin (HSA) in place of OVA and Alhydrogel in place of alum (Supplementary Fig. 6a). We obtained similar results when we administered OVA and alum i.m. rather than i.p. (Supplementary Fig. 7a). IgG1 production remained unaffected in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice under these different conditions (Supplementary Fig. 6b and Supplementary Fig. 7b). We also observed a reduction in the production of antigen-specific IgE, but not of IgG1, when we immunized *Irf3*<sup>-/-</sup> mice i.p. or i.m. with OVA and DNA in place of OVA and alum (Fig. 3e,f and Supplementary Fig. 7c,d), supporting the notion that both alum and host DNA induce IgE responses through the same pathway.

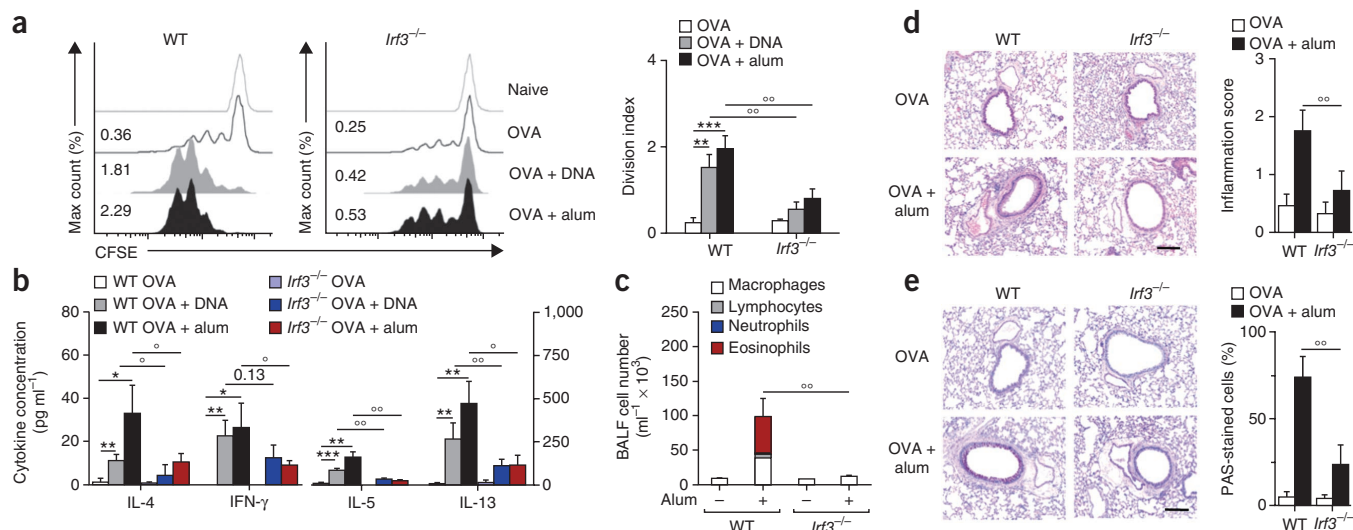
Most of the host DNA-activated pathways that lead to *Irf3* activation signal through TANK-binding kinase 1 (*Tbk1*)<sup>20,22,25,28</sup>. *Tbk1*-deficient mice (*Tbk1*<sup>-/-</sup>) die *in utero* from massive liver apoptosis, but a combined deficiency for tumor necrosis factor (encoded by *Tnf*) avoids these lethal effects<sup>28,29</sup>. We found that immunized *Tbk1*/*Tnf* double-knockout mice developed reduced OVA-specific IgE responses (Fig. 3g) but similar OVA-specific IgG1 serum titers (Fig. 3h) when compared to immunized control *Tbk1*<sup>+/+</sup>/*Tnf*<sup>-/-</sup> mice, thereby suggesting a role for the Tbk1-Irf3 axis in the adjuvant activity of alum on IgE responses.

The only currently known mammalian DNA-sensitive pathways able to activate the Tbk1-Irf3 axis involve the sensing of genomic DNA by Sting (a stimulator of IFN genes)<sup>25</sup>, and the activation of Ddx58 (DEAD box polypeptide 58) by RNA transcribed from DNA by polymerase III (ref. 22). Both Sting and Ddx58 act upstream of mitochondrial antiviral signaling protein (encoded by *Mavs*) to activate Tbk1 and *Irf3* (refs. 22,25). We observed that OVA and alum-immunized *Mavs*<sup>-/-</sup> mice developed OVA-specific IgE and IgG1 serum titers similar to those of WT mice (data not shown). *Zbp1* (Z-DNA binding protein 1, also called *Dai*) has also been proposed as a cytoplasmic DNA sensor *in vitro*<sup>20</sup>, although its role remains unclear *in vivo*<sup>30</sup>. *Zbp1*<sup>-/-</sup> mice did not show reduced antigen-specific IgE or IgG1 production in response to OVA and alum immunization in comparison with WT mice (data not shown).

Together, these results indicate that alum-induced host DNA release promotes IgG1 and IgE responses through distinct signaling pathways that do not depend on currently identified DNA receptors. They also identify *Irf3* as an essential mediator of IgE production after alum immunization.

### ***Irf3* is essential for alum-boosted canonical T<sub>H</sub>2 responses**

Given that IgE isotype switching by B cells is best induced by T cells expressing a T<sub>H</sub>2 cytokinic profile, we suspected that *Irf3* deficiency would have an effect on T<sub>H</sub>2 cell responses after alum immunization. Indeed, the proliferation of transferred CFSE-labeled OVA-specific CD4<sup>+</sup> cells (Fig. 4a), the differentiation of endogenous antigen-specific T<sub>H</sub>2 cells (Supplementary Fig. 8a,b) and the secretion of T<sub>H</sub>2 cytokines in response to OVA re-stimulation (Fig. 4b) were reduced in the bronchial lymph nodes (BLNs) of *Irf3*<sup>-/-</sup> mice injected i.p. with OVA and DNA or with OVA and alum. Furthermore, in a classical asthma model based on OVA and alum sensitization followed by



**Figure 4** *Irf3* is essential for the boosting of canonical  $T_H2$  cells by alum and genomic DNA. (a) Proliferation profile (left) and division index (right) of adoptively transferred OVA-specific  $CD4^+$  OT-II cells in the BLNs of WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated i.p. with OVA, OVA and DNA, or OVA and alum. Inserted numbers indicate division index values. (b) Cytokine concentrations in the supernatant of OVA-stimulated BLN cells isolated from WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated with OVA, OVA and DNA, or OVA and alum. (c–e) Assessment of allergic airway inflammation in OVA- or OVA and alum-sensitized WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice challenged with aerosolized OVA. (c) Total and differential immune cell counts in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF). (d) Representative section and inflammatory scores of hematoxylin-eosin staining of lung sections. Scale bar, 50  $\mu$ m. (e) Representative staining and percentage of periodic acid Schiff (PAS)-stained goblet cells per total epithelial cells in randomly selected bronchi. Scale bar, 50  $\mu$ m.  $n = 5$ ; data are representative of one of two (a) or three (b–e) independent experiments. Error bars show means  $\pm$  s.d. \*, OVA versus OVA and adjuvant; °, WT OVA and adjuvant versus *Irf3*<sup>-/-</sup> OVA and adjuvant; \*, ° $P < 0.05$ , \*\*, °° $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

airway challenge with OVA, we observed that *Irf3*<sup>-/-</sup> mice were protected from allergic airway inflammation (Fig. 4c–e), and that their BLN cells showed impaired proliferation and  $T_H2$  cytokine secretion in response to OVA re-stimulation (Supplementary Fig. 9a,b). It is noteworthy that *Irf3*<sup>-/-</sup> mice, when compared with WT mice, had decreased serum OVA-specific IgE levels but similar OVA-specific IgG1 titers in this model (Supplementary Fig. 9c,d).

Previous studies in our laboratory indicated that *Irf3*<sup>-/-</sup> mice show normal boosting of  $T_H2$  responses by *Irf3*-independent adjuvants<sup>31</sup>. Moreover, *Irf3*<sup>-/-</sup> T cells proliferate and secrete  $T_H2$  cytokines normally in response to CD3 and CD28 stimulation (Supplementary Fig. 10a,b). *Irf3*<sup>-/-</sup> mice also develop humoral responses similar to those of WT mice when immunized with Freund's adjuvant (Supplementary Fig. 11a–c).

Taken together, these results indicate that *Irf3*<sup>-/-</sup> mice are impaired in their ability to boost  $T_H2$  cell responses to alum immunization and to genomic DNA. They further suggest that *Irf3*-dependent  $T_H2$  cell responses to alum may sustain tissue inflammation but do not affect IgG1 production. The  $T_H$  cells implicated in these *Irf3*-dependent responses would thus functionally correspond to canonical  $T_H2$  cells<sup>32</sup>. In addition, T cell responses, although reduced, were not completely abrogated in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4a,b and Supplementary Fig. 8a,b). This suggests that *Irf3*-independent pathways also contribute to the adjuvant activity of alum on T cell responses, and that these *Irf3*-independent T cell responses primarily sustain B cell responses, including IgG1 production.

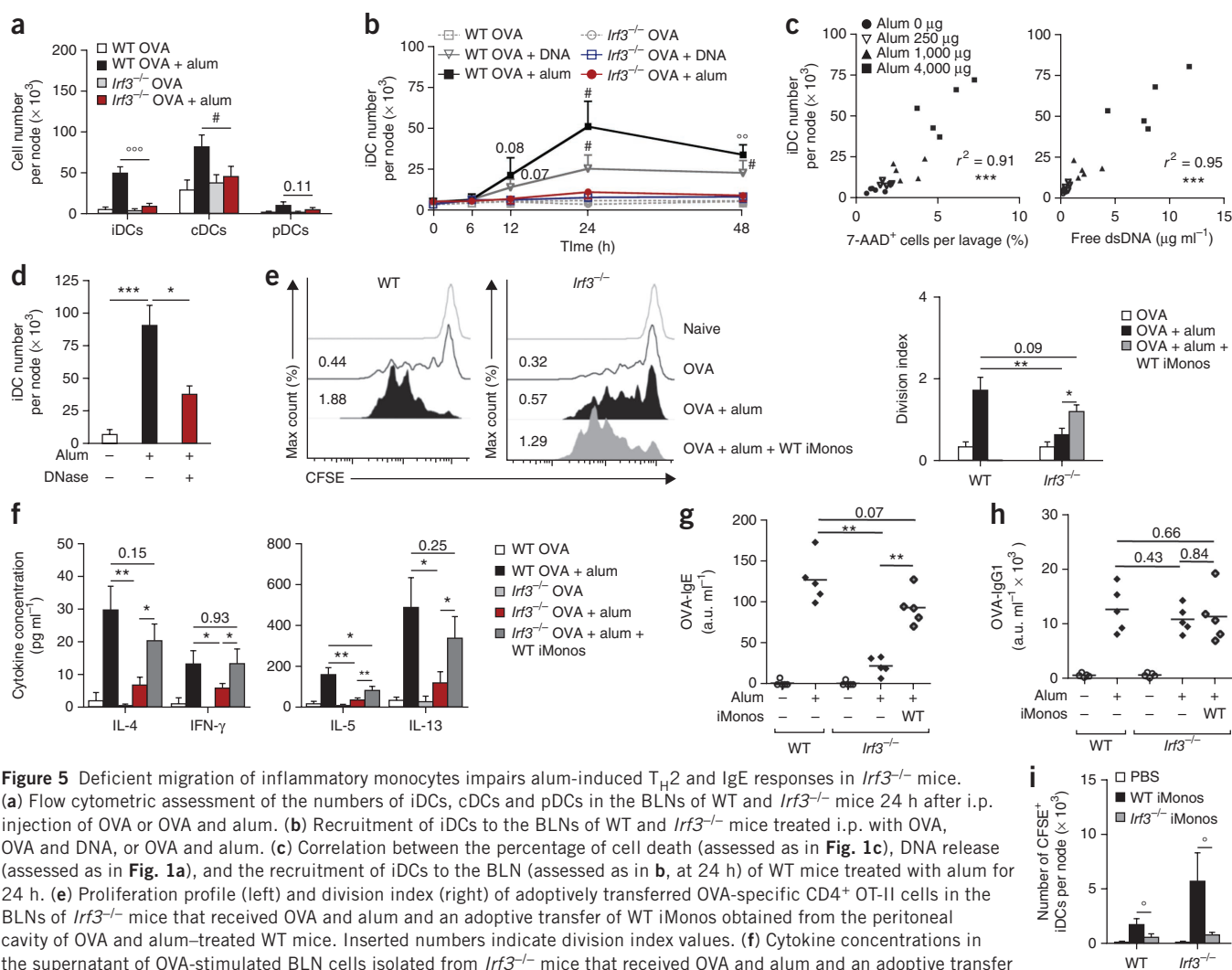
#### Alum-activated iDCs boost canonical $T_H2$ responses

The inability of *Irf3*<sup>-/-</sup> mice to produce normal  $T_H2$  cell responses suggested the possibility of deficient antigen presentation to T cells. We thus studied the recruitment of dendritic cells and other innate immune cells to alum injection sites and their draining lymph nodes. Although the recruitment of immune cell populations at sites of alum injection did not differ significantly between WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice

(Supplementary Fig. 12a,b), there was a reduction in the numbers of inflammatory monocyte (iMono)-derived inflammatory DCs (iDCs) and, to a lesser extent, of conventional DCs (cDCs) in the draining lymph nodes of i.p. or i.m. OVA and alum-treated *Irf3*<sup>-/-</sup> mice, whereas numbers of plasmacytoid DCs (pDCs) were not reduced (Fig. 5a and Supplementary Fig. 13a). Similarly, i.p. or i.m. OVA and DNA treatment induced an *Irf3*-dependent recruitment of iDCs to the BLNs (Fig. 5b and Supplementary Fig. 13b). Adding further support to the idea that host DNA acts as a trigger of iDC recruitment upon alum immunization, we observed that the recruitment of iDCs to the BLNs of alum-treated mice strongly correlated with the percentage of cell death and DNA release (Fig. 5c), and that it was reduced after DNase I treatment (Fig. 5d).

Our observations suggested that *Irf3* may be required for  $T_H2$  cell and IgE responses through its role in the normal recruitment of iMonos, the precursors of iDCs<sup>11,33,34</sup>, to the lymph nodes that drain alum injection sites. Supporting this hypothesis, we found that the transfer of iMonos isolated from OVA and alum-immunized WT mice to *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated with OVA and alum increased the proliferation of transferred CFSE-labeled OVA-specific  $CD4^+$  cells (Fig. 5e) and the differentiation of endogenous OVA-specific  $CD4^+$   $T_H2$  cells (Supplementary Fig. 14a,b). In addition, we found that transferring WT iMonos to OVA and alum-treated *Irf3*<sup>-/-</sup> mice increased  $T_H2$ -type cytokine production (Fig. 5f) and OVA-specific IgE titers (Fig. 5g), almost to the levels of OVA and alum-treated WT mice. In contrast, iMono transfer did not affect OVA-specific IgG1 titers (Fig. 5h). Notably, we observed that, although the transfer of iMonos from OVA and alum-treated mice was sufficient to induce robust  $T_H2$  cell responses in the draining lymph nodes of naive recipient mice (Supplementary Fig. 15a–d), it did not induce any detectable IgG1 or IgE responses (data not shown).

These results therefore indicate that *Irf3* is essential for the triggering of iDC recruitment by alum. They also suggest that these iDCs subsequently induce a canonical  $T_H2$  response that is unable to



**Figure 5** Deficient migration of inflammatory monocytes impairs alum-induced  $T_H2$  and IgE responses in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice. (a) Flow cytometric assessment of the numbers of iDCs, cDCs and pDCs in the BLNs of WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice 24 h after i.p. injection of OVA or OVA and alum. (b) Recruitment of iDCs to the BLNs of WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated i.p. with OVA, OVA and DNA, or OVA and alum. (c) Correlation between the percentage of cell death (assessed as in Fig. 1c), DNA release (assessed as in Fig. 1a), and the recruitment of iDCs to the BLN (assessed as in b, at 24 h) of WT mice treated with alum for 24 h. (e) Proliferation profile (left) and division index (right) of adoptively transferred OVA-specific CD4<sup>+</sup> OT-II cells in the BLNs of *Irf3*<sup>-/-</sup> mice that received OVA and alum and an adoptive transfer of WT iMonos obtained from the peritoneal cavity of OVA and alum-treated WT mice. Inserted numbers indicate division index values. (f) Cytokine concentrations in the supernatant of OVA-stimulated BLN cells isolated from *Irf3*<sup>-/-</sup> mice that received OVA and alum and an adoptive transfer of WT iMonos obtained as in e. (g,h) Serum titers of OVA-specific IgE (g) and IgG1 (h) in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated with OVA and alum, transferred with WT iMonos as in e on days 0 and 14, and then boosted with OVA on day 21. As controls, we used WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice that received PBS with OVA alone or OVA and alum. (i) Numbers of CFSE<sup>+</sup> iDCs in the BLNs of OVA and alum-treated WT mice that received CFSE-labeled WT or *Irf3*<sup>-/-</sup> iMonos 18 h earlier. Control mice received PBS alone.  $n = 5$ ; data are representative of one of four (a,c), one of three (f-i) or one of two (b,d,e) independent experiments. Error bars show means  $\pm$  s.d. #, WT OVA and adjuvant versus *Irf3*<sup>-/-</sup> OVA and adjuvant (a,b); \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ . a.u., arbitrary unit.

autonomously support humoral responses, but that has the ability to promote IgE responses from independently activated B cell responses.

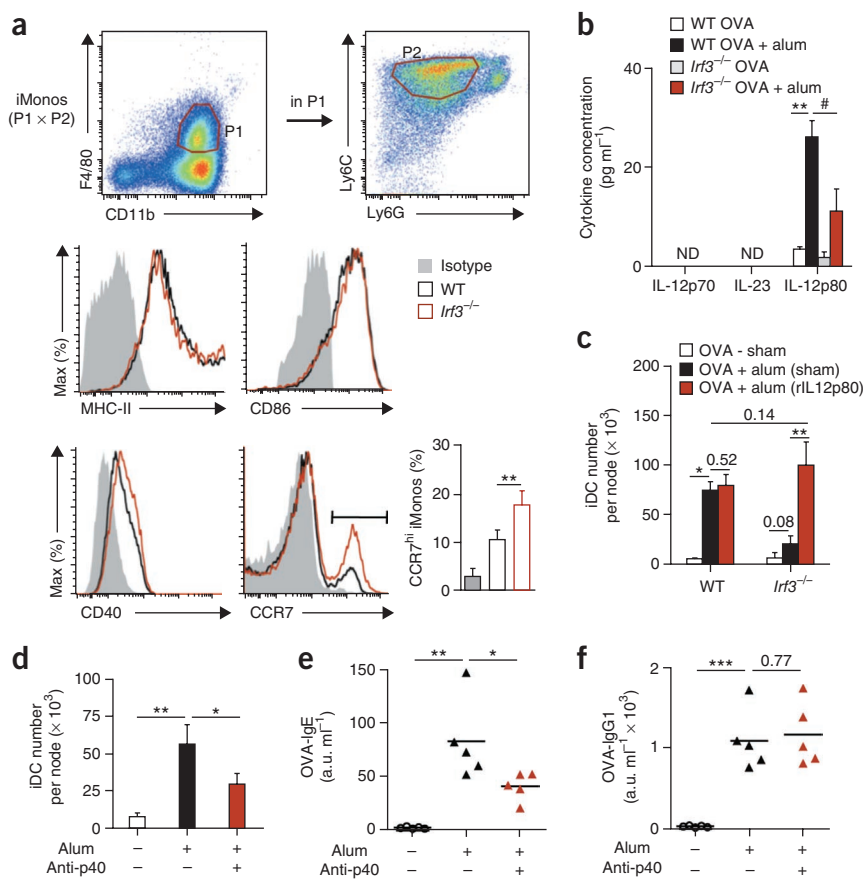
### Alum-induced IL-12p80 promotes iMono migration

Cross-transfer experiments suggested that *Irf3*<sup>-/-</sup> iMonos had a cell-intrinsic defect that rendered them unable to migrate to the lymph nodes after alum treatment (Fig. 5i). In cells isolated from sites of OVA and alum injection, the production of IFN- $\beta$ 1, a hallmark of *Irf3* activation, was most prominent in iMonos, as compared with other peritoneal cells (Supplementary Fig. 16). We found that IFN- $\beta$ 1 production was abrogated in iMonos from *Irf3*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that *Irf3* indeed is activated in iMonos (Supplementary Fig. 16). As demonstrated by the use of *Irf9*<sup>-/-</sup> mice and mice lacking the gene encoding interferon  $\alpha$ - and  $\beta$ - receptor 2 (*Ifnar2*<sup>-/-</sup> mice), type I and type III IFNs did not affect alum-induced iDC recruitment or humoral responses (data not shown).

Although *Irf3* deficiency did not seem to affect the overall maturation state of iMonos (a process usually associated with the acquisition

of migratory activity), we noticed that a higher proportion of *Irf3*<sup>-/-</sup> iMonos highly expressed CCR7, a chemokine receptor crucial for DC migration to the lymph nodes, compared with their WT counterparts (Fig. 6a). This suggested that *Irf3*<sup>-/-</sup> iMonos might be unable to respond to CCR7-activating signals, which would lead to their accumulation. Recent evidence indicates that iMono-derived DCs depend on signaling by homodimers of IL-12p40 (IL-12p80) for their ability to respond to CCR7-activating chemokines<sup>35,36</sup>. We found that alum induced the local production of IL-12p80 in WT mice, and that this production was reduced in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 6b). We showed the importance of IL-12p80 expression in regulating iMono migration by treating *Irf3*<sup>-/-</sup> mice with recombinant IL-12p80, which restored migration of iDCs to the BLNs of alum-injected *Irf3*<sup>-/-</sup> mice, almost to the levels seen in WT mice (Fig. 6c). Moreover, neutralization of IL-12p80 by p40-specific neutralizing antibodies partially attenuated IgE responses and the recruitment of iDCs to the BLNs in OVA and alum-treated WT mice, whereas it did not affect IgG1 responses (Fig. 6d-f). Thus, these results suggest that alum-induced iDC activation relies on signaling by IL-12p80.

**Figure 6** Alum-induced iMono migration depends on IL-12p40 homodimer signaling. (a) Gating strategy for iMonos and flow cytometric analysis of their surface expression of CCR7 and co-stimulatory molecules in OVA and alum-treated WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice. Bottom right, percentage of CCR7<sup>hi</sup> iMonos in OVA and alum-treated WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice is indicated. (b) ELISA measurement of IL-12p70, IL-23 and IL-12p80 in the acellular phase of the peritoneal lavage fluid of WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated overnight with OVA or with OVA and alum. #, WT OVA and alum versus *Irf3*<sup>-/-</sup> OVA and alum. (c,d) Recruitment of iDCs to the BLNs of WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice treated with OVA and alum and recombinant IL-12p80 (rIL12p80) (c) or p40-specific neutralizing antibody (d). Control OVA- and OVA and alum-treated mice received PBS only. (e,f) Serum titers of OVA-specific IgE (e) and IgG1 (f) measured on day 17 in WT mice treated i.p. with OVA and alum and p40-specific neutralizing antibody, and then boosted with OVA i.p. 10 d later. *n* = 5; data are representative of one of three (a) or two (b-f) independent experiments. Error bars show means ± s.d. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001. a.u., arbitrary unit.



## DISCUSSION

Extracellular host DNA has been recently recognized as a DAMP, and it seems to be involved in an increasing number of immune processes and diseases<sup>16,19,37–39</sup>. In this study, we show that host DNA released at sites of injection by dying cells can mediate the adjuvant effect of alum on adaptive responses. Our data thus support the idea that DAMPs have a key role in the adjuvant activity of alum and that, like any other efficient adjuvant<sup>40,41</sup>, alum acts mainly by triggering innate immunity. In this regard, it should also be noted that uric acid, a major metabolite of nucleic acids and a potential DAMP when crystallized, has been suggested to have a role in iDC recruitment and T cell activation after alum immunization<sup>11</sup>.

It has recently been proposed that alum immunization may induce functionally distinct T<sub>H</sub> cell subsets comprising T follicular helper (T<sub>FH</sub>) cells, which would be responsible for B cell help, and lymphoid and emigrant T<sub>H</sub> cells, which would be responsible for other effector functions<sup>42</sup>. Another report suggested that IL-4-producing T<sub>FH</sub> cells may be distinguished functionally from canonical T<sub>H</sub>2 cells<sup>32</sup>. These IL-4-producing T<sub>FH</sub> cells, also referred to as T<sub>FH</sub>2 cells<sup>43</sup>, would be endowed with high B cell helper activity and would promote IgG1 responses, but they would be poor inducers of classical T<sub>H</sub>2 cell effector functions in peripheral tissues<sup>32</sup>. Canonical T<sub>H</sub>2 cells, on the contrary, would be specialized in mediating T<sub>H</sub>2 cell effector functions in peripheral tissues<sup>32</sup>.

In line with these studies, our data allow us to propose a model in which the contribution of host DNA to the adjuvant activity of alum would comprise both an *Irf3*-independent and an *Irf3*-dependent component (Supplementary Fig. 17). In the *Irf3*-independent component of the response, host DNA induces IgG1 production through the promotion of T<sub>H</sub> responses endowed with high B cell helper activity. These T<sub>H</sub> cells would thus functionally relate to T<sub>FH</sub>2 cells. In the *Irf3*-dependent component, iDCs activated by host DNA trigger T<sub>H</sub>2 cell responses that mediate effector T<sub>H</sub>2 cell functions in peripheral tissues but lack the ability to stimulate antibody production on their own. These T<sub>H</sub> cells

would thus functionally relate to canonical T<sub>H</sub>2 cells. They would also promote IgE production from independently induced B cell responses. Future detailed phenotypic and functional characterization of these T<sub>H</sub> cell subtypes should offer new perspectives on the mechanisms driving the production of specific antibody responses.

Our data suggest that alum-activated iDCs preferentially induce canonical T<sub>H</sub>2 cell responses. In other settings, iMono-derived iDCs preferentially induce other types of T<sub>H</sub> responses, such as T<sub>H</sub>1 responses<sup>44</sup>. The functional specialization of iDCs upon alum immunization most probably originates from the T<sub>H</sub>2 microenvironment that develops at alum injection sites<sup>10</sup>. In contrast with a previous report<sup>11</sup>, we observed that impairment of iDC function does not affect IgG1 production. This disagreement probably comes from the fact that the general depletion of CD11c<sup>+</sup> cells used to target iDCs in the previous study also depleted other CD11c<sup>+</sup> APCs. Given the diversity of lymph node APCs<sup>45</sup> and the current lack of molecular tools for manipulating them specifically *in vivo*, the identification of the APC(s) responsible for initiating IgG1 responses will be a stimulating challenge for future research.

It is traditionally thought that IgG1 and IgE responses are sequentially boosted by a common IL-4-producing T<sub>H</sub> cell response. Our data, however, support the idea that IgE and IgG1 responses are uncoupled and that they are regulated by functionally distinct T<sub>H</sub> cell mechanisms. Understanding how alum-induced DNA release stimulates T<sub>FH</sub>2-related T cell help for IgG1 production could thus have a promising influence on the design of new vaccine formulations devoid of canonical T<sub>H</sub>2 cell and IgE bias. We foresee that this breakthrough might come from the identification of the DNA sensors triggered by alum.

In conclusion, we suggest that the DNA released by dying host cells is an important DAMP mediating the adjuvant activity of alum.

This knowledge may help in improving or developing current and experimental adjuvant formulations, which will be key to the success of future vaccination strategies.

## METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank T. Taniguchi (University of Tokyo) and RIKEN BioResource Center for providing *Irf3<sup>-/-</sup>* and *Irf9<sup>-/-</sup>* mice, and V. Dixit (Genentech) for providing *Nlrp3<sup>-/-</sup>* and *Casp1<sup>-/-</sup>* mice. We also thank S. Ormenese and R. Stephaan of the Cell Imaging and Flow Cytometry Technological Platform of the Groupe Interdisciplinaire de Génomique Appliquée for help with fluorescent-activated cell sorting (FACS) analyses; M. Lebrun for help with confocal microscopy; P. Drion and G. Gaudray for animal management; F. Andris, S. Goriely and O. Leo for helpful discussions; and V. Conrath, L. Duwez, R. Fares, C. François, F. Olivier, J. Parisi, F. Perin and I. Sbai for excellent technical and secretarial assistance.

T.M., D.B., C.M. and C.S. are research fellows, and C.J.D. is a postdoctoral fellow of the Fonds National de la Recherche Scientifique (FRS-FNRS; Belgium). This work was supported by grants of the FRS-FNRS, the Belgian Fonds de la Recherche Scientifique Médicale and the Belgian Programme on Interuniversity Attraction Poles (IUAP; FEDIMMUNE, Belgian Science Policy). This work was also partly supported by the Knowledge Cluster Initiative (K.J.I.); a Grant-in-Aid for Scientific Research (K.J.I. and C.C.) of the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT); and by the Core Research Evolutionary Science and Technology (CREST) program at the Japan Science and Technology Agency (K.J.I.).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.M., K.J.I., F.B. and C.J.D. designed the experiments; C.C., K.J.I., F.B. and C.J.D. supervised the project; T.M. and D.B. made the initial observation; T.M. did most of the experiments and compiled the data; T.M., K.O. and K.K. did the experiments involving *Tbk1/Tnf* double-knockout mice, *Zbp1<sup>-/-</sup>*, *Ifnar2<sup>-/-</sup>* and *Mavs<sup>-/-</sup>* mice; C.M. and C.S. did the FACS analyses; S.A. provided the *Tbk1/Tnf* double-knockout mice and *Zbp1<sup>-/-</sup>* mice; P.L., S.A., K.J.I. and F.B. secured funding; K.J.I. and F.B. provided feedback on the manuscript; and C.J.D. wrote the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine/>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Glenny, A.T., Pope, C.G., Waddington, H. & Wallace, U. Immunological Notes: XVII–XXIV. *J. Pathol. Bacteriol.* **29**, 31–40 (1926).
- Mannhalter, J.W., Neychev, H.O., Zlabinger, G.J., Ahmad, R. & Eibl, M.M. Modulation of the human immune response by the non-toxic and non-pyrogenic adjuvant aluminium hydroxide: effect on antigen uptake and antigen presentation. *Clin. Exp. Immunol.* **61**, 143–151 (1985).
- Li, H., Nookala, S. & Re, F. Aluminium hydroxide adjuvants activate Caspase-1 and induce IL-1 $\beta$  and IL-18 release. *J. Immunol.* **178**, 5271–5276 (2007).
- Hornung, V. *et al.* Silica crystals and aluminium salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856 (2008).
- Eisenbarth, S.C., Colegio, O.R., O'Connor, W., Sutterwala, F.S. & Flavell, R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* **453**, 1122–1126 (2008).
- Franchi, L. & Nunez, G. The Nlrp3 inflammasome is critical for aluminium hydroxide-mediated IL-1 $\beta$  secretion but dispensable for adjuvant activity. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2085–2089 (2008).
- Kool, M. *et al.* Cutting Edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. *J. Immunol.* **181**, 3755–3759 (2008).
- Li, H., Willingham, S.B., Ting, J.P.Y. & Re, F. Cutting Edge: Inflammasome activation by alum and alum's adjuvant effect are mediated by NLRP3. *J. Immunol.* **181**, 17–21 (2008).
- Spreafico, R., Ricciardi-Castagnoli, P. & Mortellaro, A. The controversial relationship between NLRP3, alum, danger signals and the next-generation adjuvants. *Eur. J. Immunol.* **40**, 638–642 (2010).
- McKee, A.S. *et al.* Alum induces innate immune responses through macrophage and mast cell sensors, but these sensors are not required for alum to act as an adjuvant for specific immunity. *J. Immunol.* **183**, 4403–4414 (2009).
- Kool, M. *et al.* Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **205**, 869–882 (2008).
- Goto, N. *et al.* Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine* **15**, 1364–1371 (1997).
- Kono, H. & Rock, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 279–289 (2008).
- Chen, G.Y. & Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
- Ishii, K.J. *et al.* Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J. Immunol.* **167**, 2602–2607 (2001).
- Takeshita, F. & Ishii, K.J. Intracellular DNA sensors in immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 383–388 (2008).
- Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
- Lande, R. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* **449**, 564–569 (2007).
- Imaeda, A.B. *et al.* Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome. *J. Clin. Invest.* **119**, 305–314 (2009).
- Takaoka, A. *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**, 501–505 (2007).
- Muruve, D.A. *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* **452**, 103–107 (2008).
- Chiu, Y.-H., MacMillan, J.B. & Chen, Z.J. RNA Polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I Interferons through the RIG-I pathway. *Cell* **138**, 576–591 (2009).
- Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.-W., Datta, P., Wu, J. & Alnemri, E.S. AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature* **458**, 509–513 (2009).
- Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
- Ishikawa, H., Ma, Z. & Barber, G.N. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature* **461**, 788–792 (2009).
- Yanai, H. *et al.* HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* **462**, 99–103 (2009).
- Yang, P. *et al.* The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a  $\beta$ -catenin-dependent pathway. *Nat. Immunol.* **11**, 487–494 (2010).
- Ishii, K.J. *et al.* A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40–48 (2006).
- Bonnard, M. *et al.* Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF- $\kappa$ B-dependent gene transcription. *EMBO J.* **19**, 4976–4985 (2000).
- Ishii, K.J. *et al.* TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**, 725–729 (2008).
- Marichal, T. *et al.* Interferon response factor 3 is essential for house dust mite-induced airway allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 836–844 (2010).
- Reinhardt, R.L., Liang, H.-E. & Locksley, R.M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat. Immunol.* **10**, 385–393 (2009).
- Naik, S.H. *et al.* Intraspinal steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat. Immunol.* **7**, 663–671 (2006).
- Shortman, K. & Naik, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19–30 (2007).
- Khader, S.A. *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Exp. Med.* **203**, 1805–1815 (2006).
- Robinson, R.T. *et al.* *Yersinia pestis* evades TLR4-dependent induction of IL-12(p40)2 by dendritic cells and subsequent cell migration. *J. Immunol.* **181**, 5560–5567 (2008).
- Yasutomo, K. *et al.* Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* **28**, 313–314 (2001).
- Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H. & Nagata, S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* **6**, 49–56 (2005).
- Kawane, K. *et al.* Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**, 998–1002 (2006).
- Pulendran, B. & Ahmed, R. Translating Innate Immunity into Immunological Memory: Implications for Vaccine Development. *Cell* **124**, 849–863 (2006).
- Coffman, R.L., Sher, A. & Seder, R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
- Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L.J., Rosen, H. & McHeyzer-Williams, M.G. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nat. Immunol.* **10**, 375–384 (2009).
- Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J. & McHeyzer-Williams, M.G. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* **30**, 324–335 (2009).
- Nakano, H. *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nat. Immunol.* **10**, 394–402 (2009).
- Mohr, E. *et al.* Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature. *J. Immunol.* **182**, 2113–2123 (2009).



## ONLINE METHODS

**Mice.** *Tbk1/Tnf* DKO, *Tlr9*<sup>-/-</sup> and *Zbp1*<sup>-/-</sup> mice have been described elsewhere<sup>28,46,47</sup>. We purchased *Irf3*<sup>-/-</sup> (ref. 48) and *Irf9*<sup>-/-</sup> mice<sup>49</sup> from RIKEN BioResource Center. *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1*<sup>-/-</sup> mice<sup>50,51</sup> were a kind gift of V. Dixit (Genentech). *Ifnar2*<sup>-/-</sup> and *Mavs*<sup>-/-</sup> mice were obtained as described previously<sup>30</sup>. OVA-specific, MHC II-restricted, T cell receptor-transgenic OT-II (H-2b; C57BL/6 background) mice were obtained from The Jackson Laboratory. All transgenic mice except *Tbk1/Tnf* double-knockout and *Zbp1*<sup>-/-</sup> mice were backcrossed, in total, for 10 to 16 generations onto a C57BL/6 background. *Tbk1/Tnf* double-knockout and *Zbp1*<sup>-/-</sup> mice were on a 129/Ola X C57BL/6 background. *Tbk1*<sup>+/-</sup>/*Tnf*<sup>-/-</sup> littermates were used as control for *Tbk1/Tnf* DKO mice. All mice were bred and housed in institution-specific pathogen-free facilities. Age-paired groups of females were used at 8–12 weeks of age. All experimental procedures and protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of the University of Liège and of the Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan.

**Immunizations.** Endotoxin-free (endotoxin <1 EU mg<sup>-1</sup>) OVA was from Hyglos. Unless otherwise indicated, we immunized mice i.p. or i.m. with 10 µg of OVA alone or adsorbed on 4 mg of Imject Alum (OVA and alum; Pierce Biochemicals). For immunizations with genomic DNA, we purified genomic DNA from mouse tissue using High Pure PCR Template Preparation kits (Roche), and, unless otherwise indicated, we immunized mice with 10 µg of OVA mixed with 8 µg of DNA (OVA and DNA). The endotoxin content of the DNA preparations, as measured by Hyglos using the Limulus Amoebocyte Lysate assay, was always <1 EU mg<sup>-1</sup>. Unless otherwise indicated, we immunized mice i.p. or i.m. on days 0 and 14 with 10 µg of OVA alone, of OVA and DNA or of OVA and alum, and then boosted them i.p. on day 21 with 20 µg of OVA. Alternatively, we replaced OVA with HSA (Sigma), and alum by Alhydrogel (Sigma).

**In vivo DNase I treatment.** We injected mice i.p. with 2,000 IU of DNase I (Roche) in 100 µl of HBSS (Lonza) 3 and 18 h after immunization.

**Measurement of antigen-specific antibody titers.** For OVA- and HSA-specific IgG1 and OVA-specific IgM and IgG2c detection, we incubated diluted sera from immunized mice on ELISA plates coated with antigen at 100 µg ml<sup>-1</sup>. We detected bound IgG1, IgM and IgG2c using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse IgG1-, IgM- and IgG2c-specific antibodies (Southern Biotechnology) followed by incubation with tetramethyl benzidine and measurement by spectrophotometry. For OVA- and HSA-specific IgE detection, we incubated diluted sera on ELISA plates coated with mouse IgE-specific antibodies (BD Biosciences) at 2 µg ml<sup>-1</sup>. We detected bound IgE using biotinylated antigen followed by streptavidin peroxidase (Zymed) incubation. We calculated antibody titers by plotting the serum dilution that gave half-maximal signal. When no signal was detected, we assigned a titer of 2.

**Antibodies.** A detailed description of the antibodies used in this study is available in the **Supplementary Methods**.

**Assessment of OVA-specific T cell activation.** We assessed the proliferation of transferred CFSE-labeled OT-II cells, as described previously<sup>52</sup>, 3 d after immunization. We assessed proliferation and IL-4 expression of endogenous OVA-specific CD4<sup>+</sup> cells as described previously<sup>31</sup>, except that we cultured cells for 5 d with or without OVA (OVA grade V, Sigma; 50 µg ml<sup>-1</sup>).

**Flow cytometry and cell sorting.** We incubated single cell suspensions with 2.4G2 Fc-receptor antibodies to reduce nonspecific binding before staining. We carried out staining reactions at 4 °C. We did flow cytometry on a FACScanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed results using FlowJo software (Tree Star). We used a FACSAria instrument (BD Biosciences) for sorting F4/80<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> iMonos.

**IL-12p40 homodimer ELISA, complementation and neutralization experiments.** We measured IL-12p40 homodimer concentrations by ELISA as previously described<sup>53</sup>. Briefly, we used mouse recombinant IL-12p80 (Biolegend) as a standard. We used the standards for mouse IL-12p40, IL-12p70 and IL-23 (R&D Systems) to test the specificity of the ELISA. For complementation and neutralization experiments, we immunized mice with OVA and alum and, 6 and 18 h later, treated them with rIL-12p80 (1 µg in 100 µl of PBS) or low endotoxin azide-free-purified IL-12p40-specific antibodies (Biolegend) (500 µg in 100 µl of PBS), respectively.

**Statistical analysis.** Data are presented as means ± s.d. We estimated the differences between mean values by using two-tailed pairwise Student's *t* tests after Anderson-Darling tests for assessment of normality of the data distributions. We calculated correlation coefficients using Pearson's two-tailed tests after assessment of data distribution normality. In all figures, we use asterisk (\*) and degree (°) symbols to indicate significant differences observed when comparing indicated groups (\*, ° *P* < 0.05; \*\*, °° *P* < 0.01; and \*\*\*, °°° *P* < 0.001).

**Additional methods.** Detailed methodology is described in the **Supplementary Methods**.

46. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740–745 (2000).
47. Hemmi, H. *et al.* The roles of two IκB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J. Exp. Med.* **199**, 1641–1650 (2004).
48. Sato, M. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-α/β gene induction. *Immunity* **13**, 539–548 (2000).
49. Kimura, T. *et al.* Essential and non-redundant roles of p48 (ISGF3 gamma) and IRF-1 in both type I and type II interferon responses, as revealed by gene targeting studies. *Genes Cells* **1**, 115–124 (1996).
50. Mariathasan, S. *et al.* Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213–218 (2004).
51. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228–232 (2006).
52. Bedoret, D. *et al.* Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3723–3738 (2009).
53. Nigg, A.P. *et al.* Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. *J. Immunol.* **178**, 7251–7258 (2007).

## DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity

Thomas Marichal<sup>1</sup>, Keiichi Ohata<sup>2</sup>, Denis Bedoret<sup>1</sup>, Claire Mesnil<sup>1</sup>, Catherine Sabatel<sup>1</sup>, Kouji Kobiyama<sup>2,3</sup>, Pierre Lekeux<sup>1</sup>, Cevayir Coban<sup>2</sup>, Shizuo Akira<sup>2</sup>, Ken J. Ishii<sup>2,3,4</sup>, Fabrice Bureau<sup>1,4</sup>, Christophe J. Desmet<sup>1,4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, GIGA-Research and Faculty of Veterinary Medicine, B34, University of Liege, 1 Avenue de l'Hopital, B4000 Liège, Belgium

<sup>2</sup>WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University, 3-1 Yamadaoka, Suita, 565-0871 Osaka, Japan

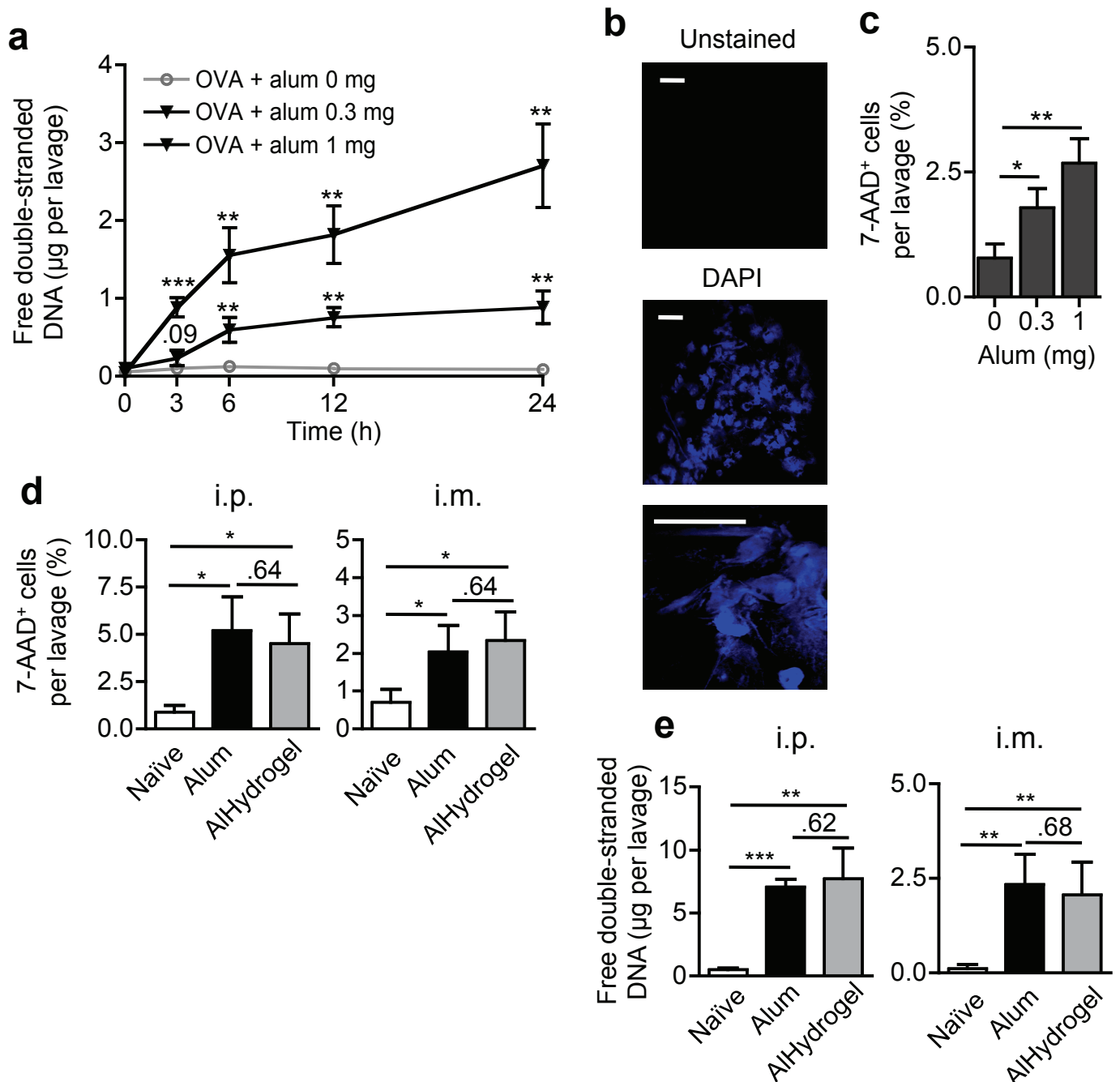
<sup>3</sup>Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito Ibaraki-City Osaka, Japan

<sup>4</sup>These authors contributed equally to this work.

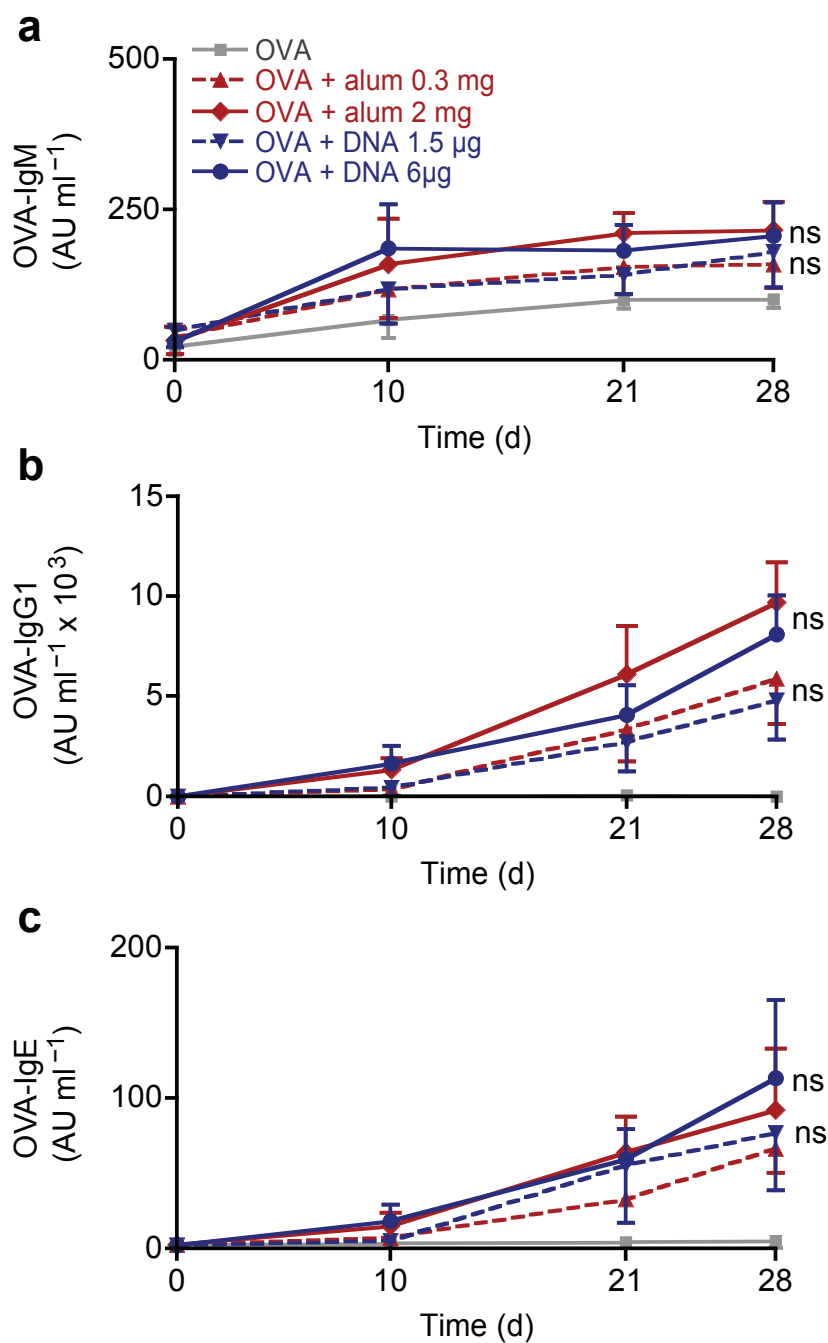
Correspondence should be addressed to C.J.D. ([christophe.desmet@ulg.ac.be](mailto:christophe.desmet@ulg.ac.be)), F.B. ([fabrice.bureau@ulg.ac.be](mailto:fabrice.bureau@ulg.ac.be)) or K.J.I. ([kenishii@biken.osaka-u.ac.jp](mailto:kenishii@biken.osaka-u.ac.jp)).

## Supplementary figures and legends 1-17

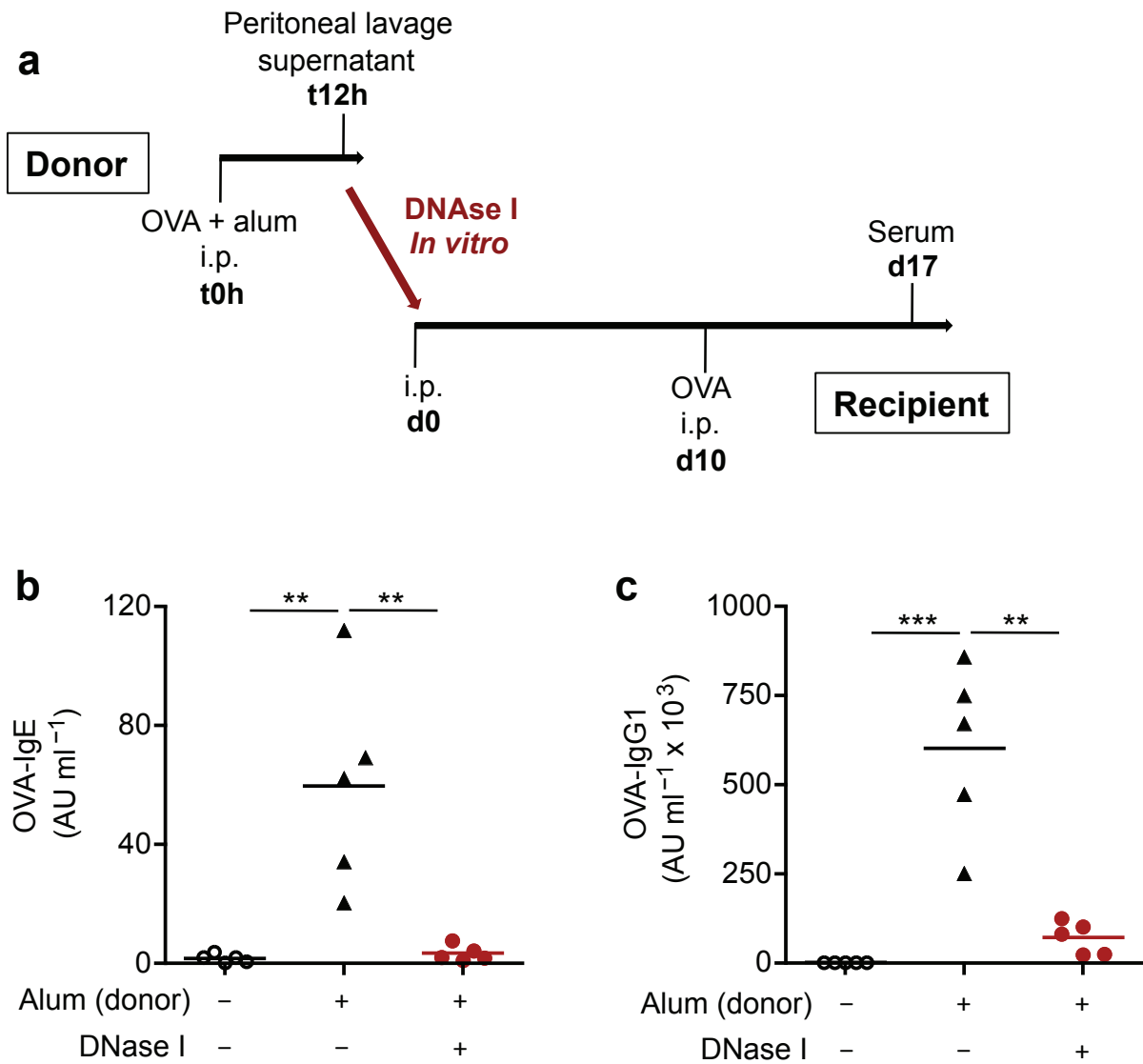
## Supplementary methods



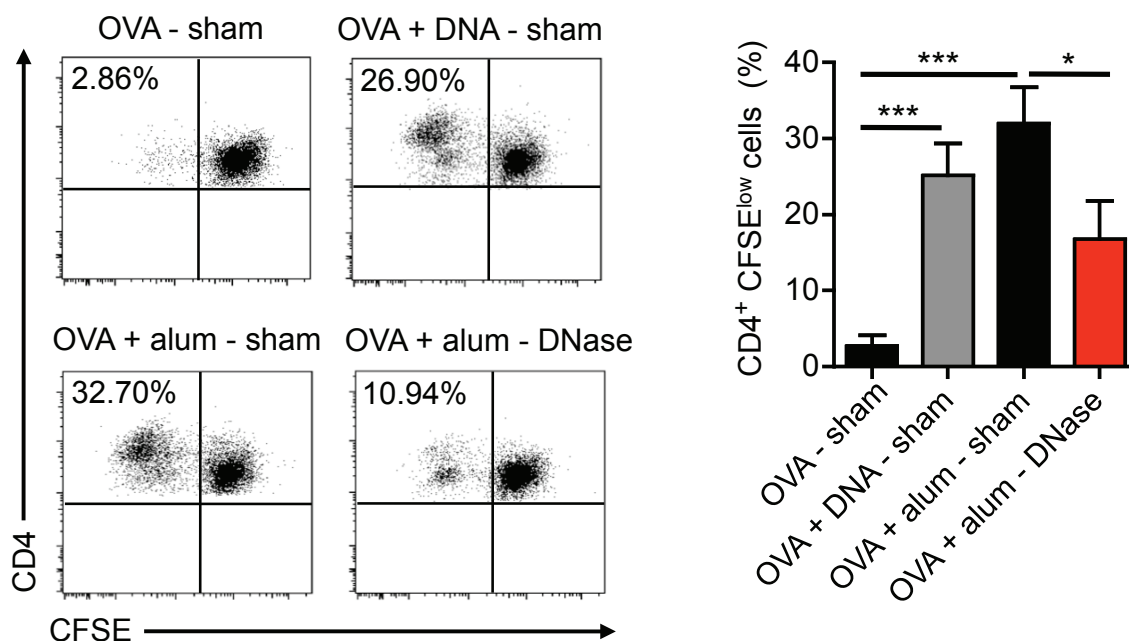
**Supplementary Figure 1** Alum and AlHydrogel induce cell death and release of host DNA at sites of injection. **(a)** Concentration of free double-stranded (ds)DNA in the acellular fraction of the muscle lavage fluid of mice treated i.m. with increasing doses of alum, measured through time using quantitative fluorescent double-stranded DNA stain. **(b)** Extracellular DNA deposition in alum macroscopic i.m. depots stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (scale bar: 25 µm). **(c)** Cell death rate in the peritoneal lavage fluid of mice treated i.m. with increasing doses of alum, assessed by staining with 7-aminoactinomycin D (7-AAD) and flow cytometry. **(d,e)** Comparison of cell death rate **(d)** and dsDNA release **(e)** at i.p. and i.m. injection sites between alum- and AlHydrogel-treated mice.  $n=5$  **(a,c-e)**. Data are representative of one of three independent experiments.



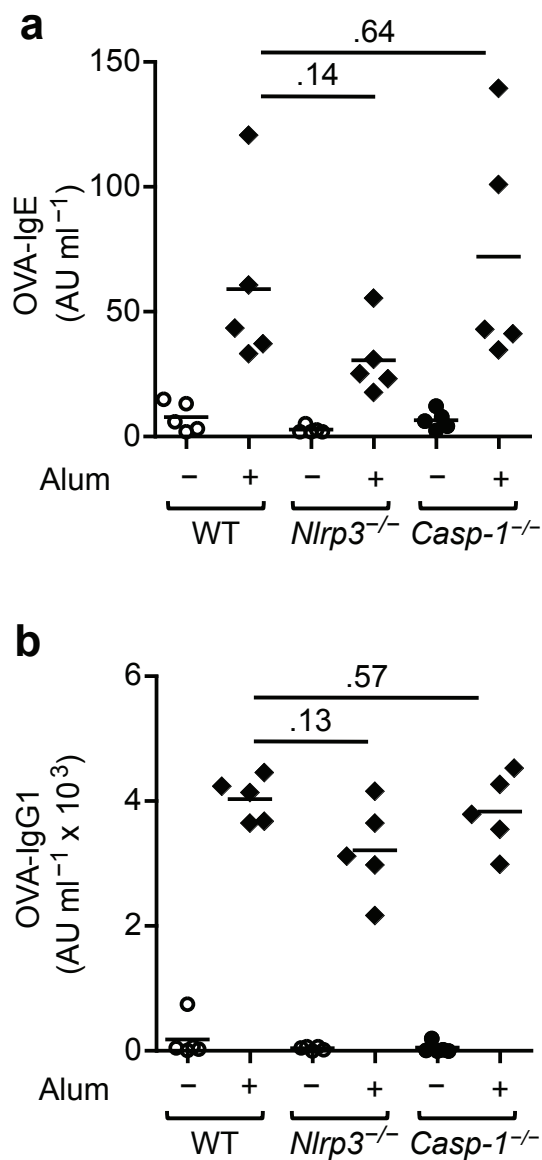
**Supplementary Figure 2** Alum and host DNA injected i.m. potentiates type 2 humoral responses. (a) Serum titers of OVA-specific IgM, (b) IgG1 and (c) IgE measured on indicated days in mice immunized i.m. with OVA alone, OVA and alum, or OVA and DNA on days 0 and 14, and boosted with OVA on day 21.  $n=5$ . Data are representative of one of two experiments. (AU, arbitrary unit).



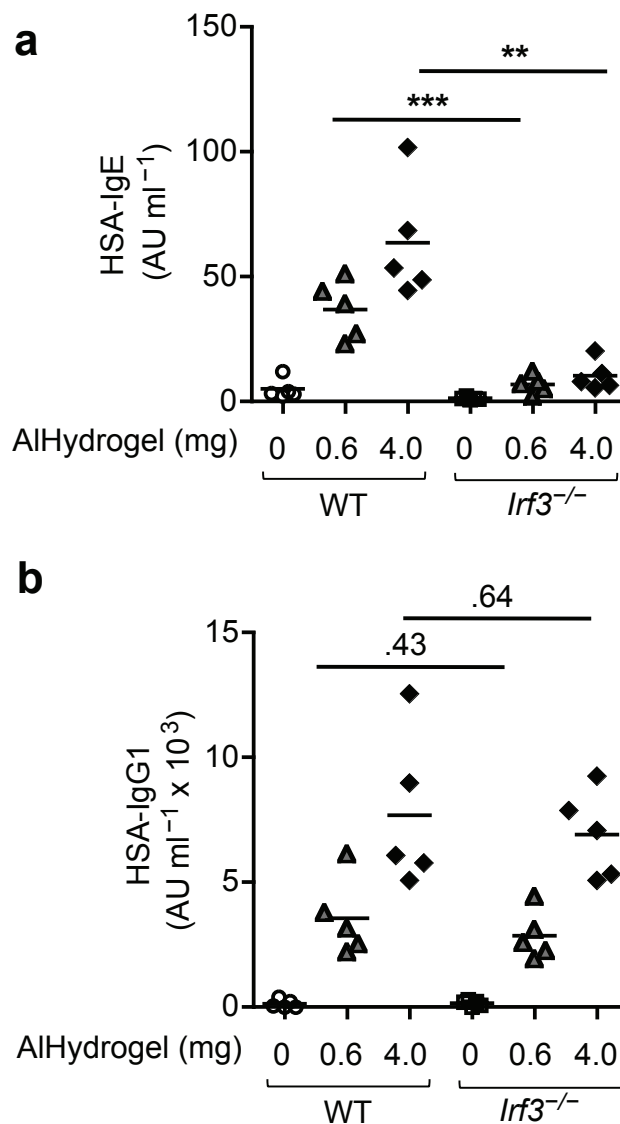
**Supplementary Figure 3** DNA released upon alum treatment is necessary and sufficient to boost humoral responses. (a) Experimental outline. *In vitro*, we mock-treated or submitted to DNase I treatment the acellular fraction of peritoneal lavage fluid from OVA- or OVA and alum-treated mice, before transferring it to naïve recipient mice with 10µg OVA. We boosted recipient mice i.p. with 10µg OVA 10 d later. (a,b) ELISA measurement of OVA-specific IgE (b) and IgG1 (c) serum titers 7 d later.  $n=5$ . Data are representative of one of four independent experiments. (AU, arbitrary unit).



**Supplementary Figure 4** Host DNA released by alum cytotoxicity mediates alum adjuvant activity on endogenous T cell responses. We treated mice i.p. with OVA, OVA and DNA, OVA and alum or OVA and alum followed by DNase I treatment. Five days later, we isolated bronchial lymph node (BLN) cells, labeled them with CFSE and restimulated them *in vitro* with OVA for 5 days. Cell viability remained high following carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling (data not shown). We estimated the proliferation of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells by measuring the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry (inserts indicate the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells).  $n=5$ . Data are representative of one of two independent experiments.

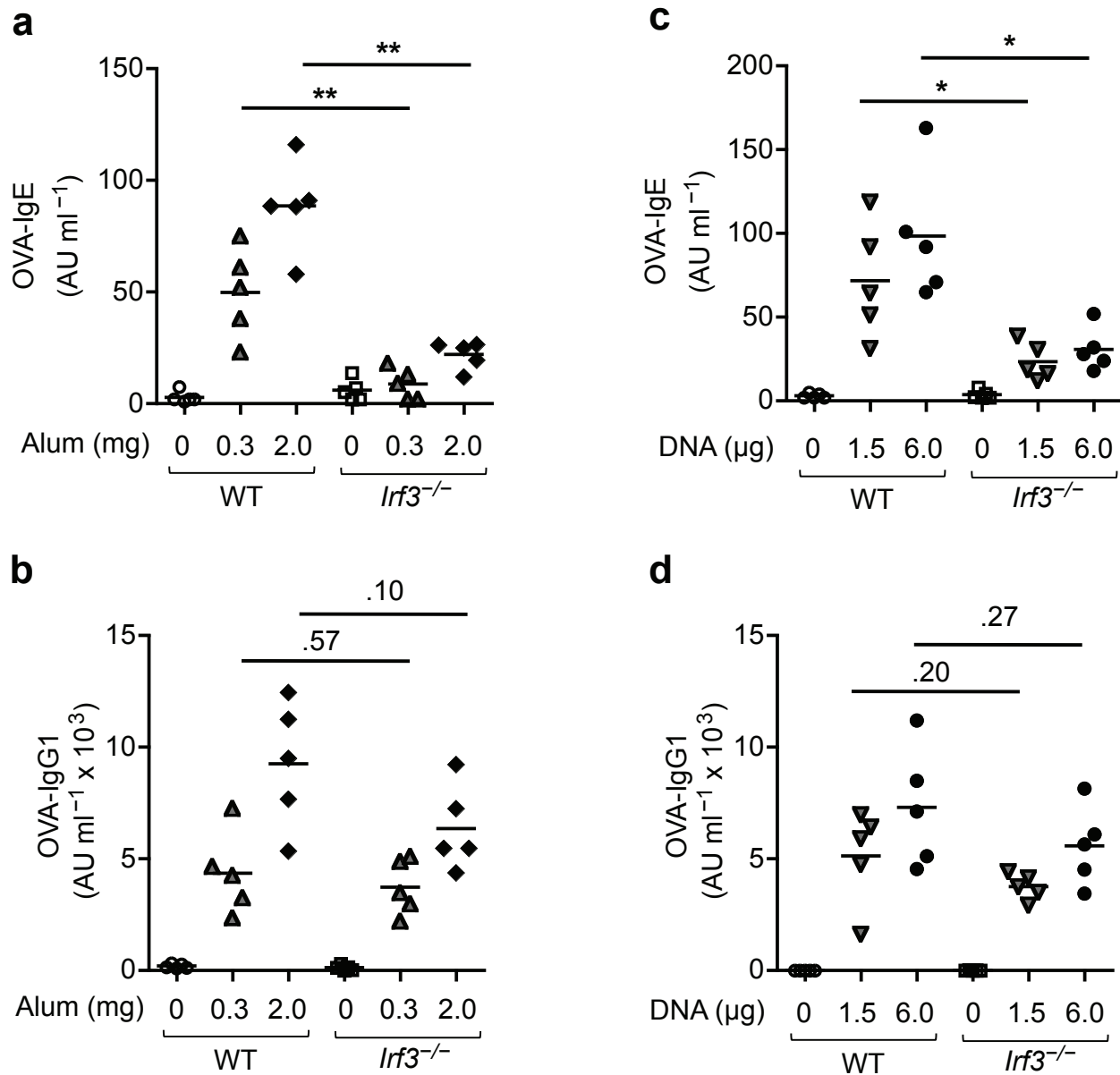


**Supplementary Figure 5** *Nlrp3* or *Casp1* deficiency does not significantly impact on the adjuvant activity of alum on humoral responses. Serum OVA-specific IgE (a) and IgG1 (b) serum antibody titers measured on day 28 in WT, *Nlrp3*<sup>-/-</sup> and *Casp1*<sup>-/-</sup> mice immunized i.m. with OVA or OVA and 0.3 mg alum on days 0 and 14 and boosted with OVA on day 21. *n*=5. Data are representative of one of two independent experiments. (AU, arbitrary unit).

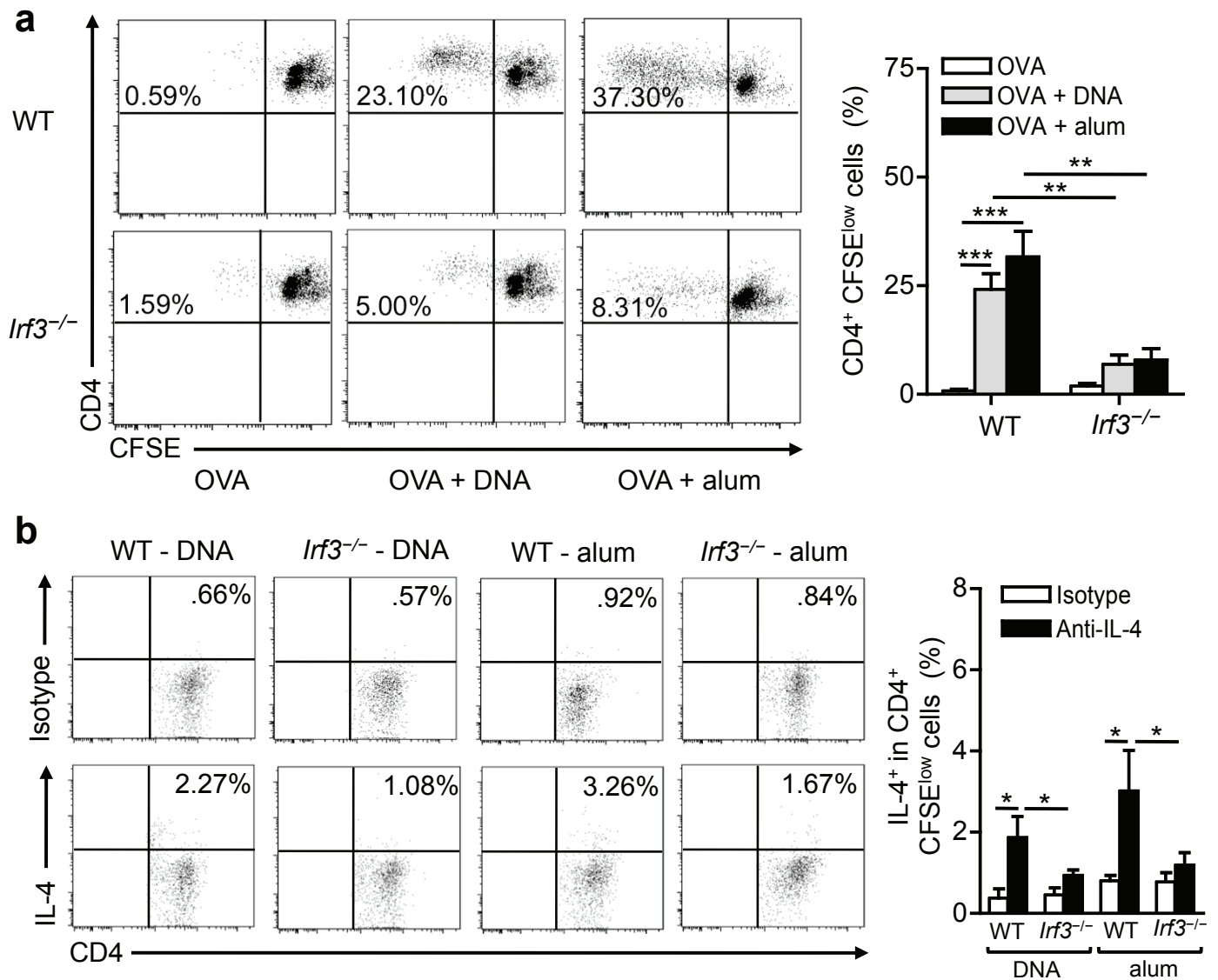


**Supplementary Figure 6** The adjuvant activity of alum on antigen-specific IgE responses requires *Irf3* independently of alum type and antigen. Serum HSA-specific IgE (a) and IgG1 (b) antibody titers measured on day 28 in *Irf3*<sup>-/-</sup> mice immunized i.p. with HSA or HSA combined with the indicated doses of AlHydrogel on days 0 and 14 and boosted with HSA i.p. on day 21. *n*=5. Data are representative of one of two independent experiments. (AU, arbitrary unit).

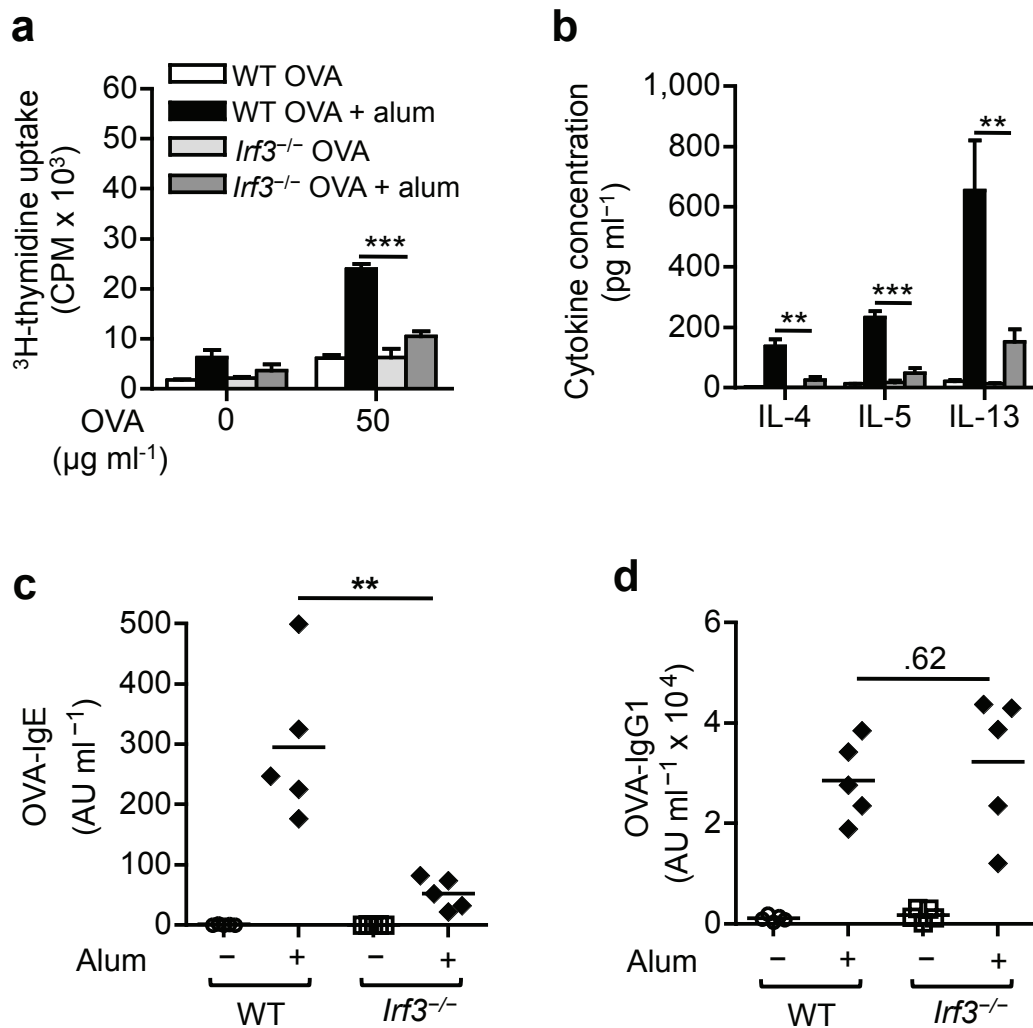




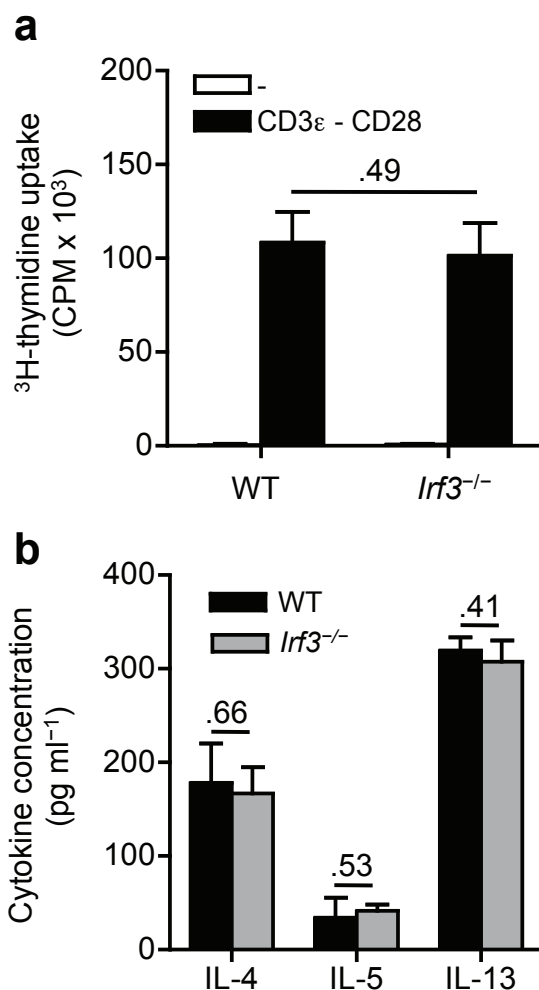
**Supplementary Figure 7** The adjuvant activity of alum and host DNA on antigen-specific IgE responses requires *Irf3* independently of the site of injection. Serum OVA-specific IgE (**a**, **c**) and IgG1 (**b**, **d**) antibody titers measured on day 28 in WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice immunized i.m. with OVA or OVA combined with the indicated doses of alum or DNA on days 0 and 14 and boosted with OVA on day 21. *n*=5. Data are representative of one of two independent experiments. (AU, arbitrary unit).



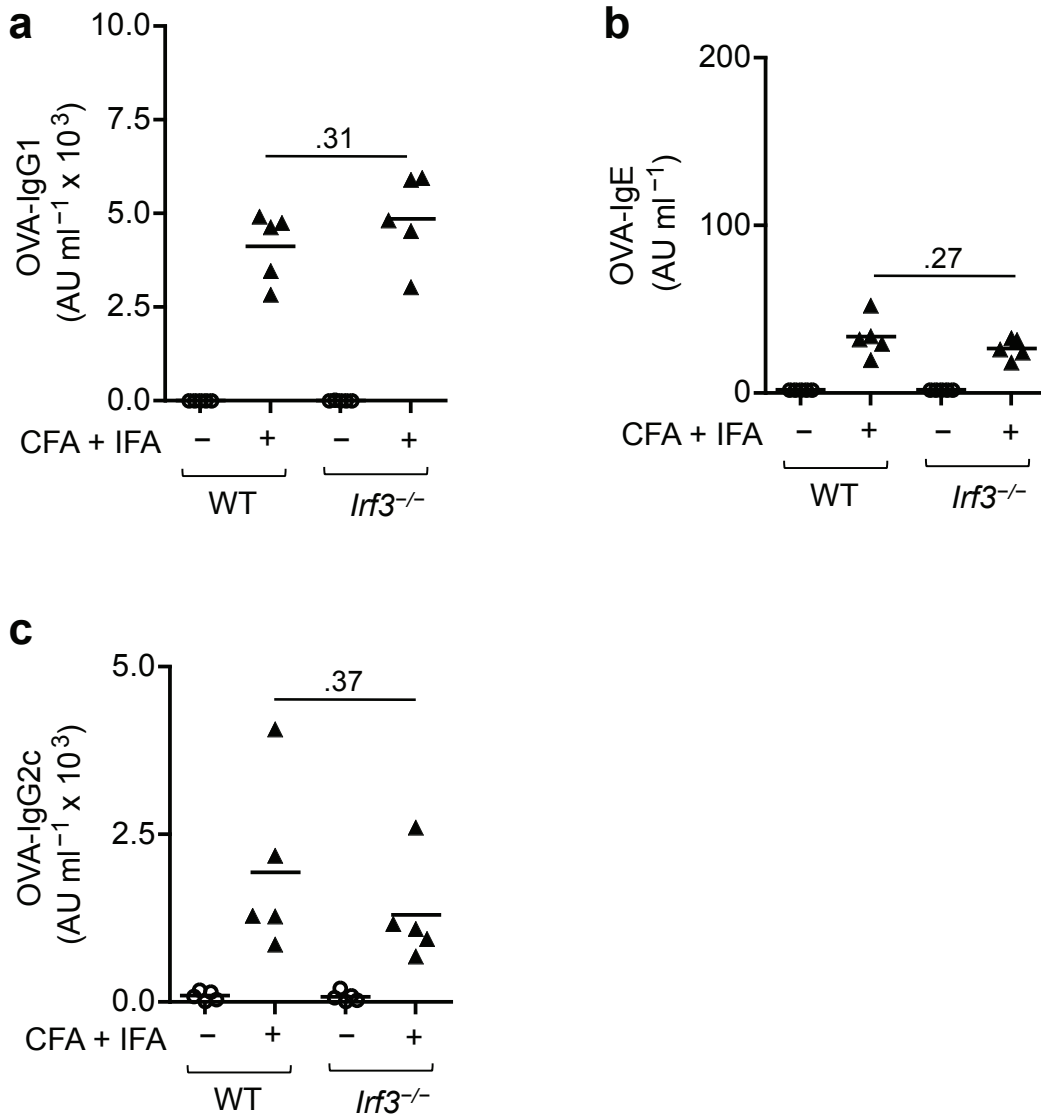
**Supplementary Figure 8** *Irf3* is essential for the boosting of type 2 T cell responses by alum and genomic DNA. We treated WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice i.p. with OVA, OVA and DNA or OVA and alum. Five days later, we isolated BLN cells, labeled them with CFSE and restimulated them *in vitro* with OVA for 5 days. Cell viability remained high following carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling and was not different between WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> cells (data not shown). (a) Proliferation of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells estimated by measuring the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry (inserts indicate the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells). (b) Percentages of IL4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> cells assessed by intracellular staining and flow cytometry (inserts indicate the percentage of IL4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells). *n*=5. Data are representative of one of three independent experiments.



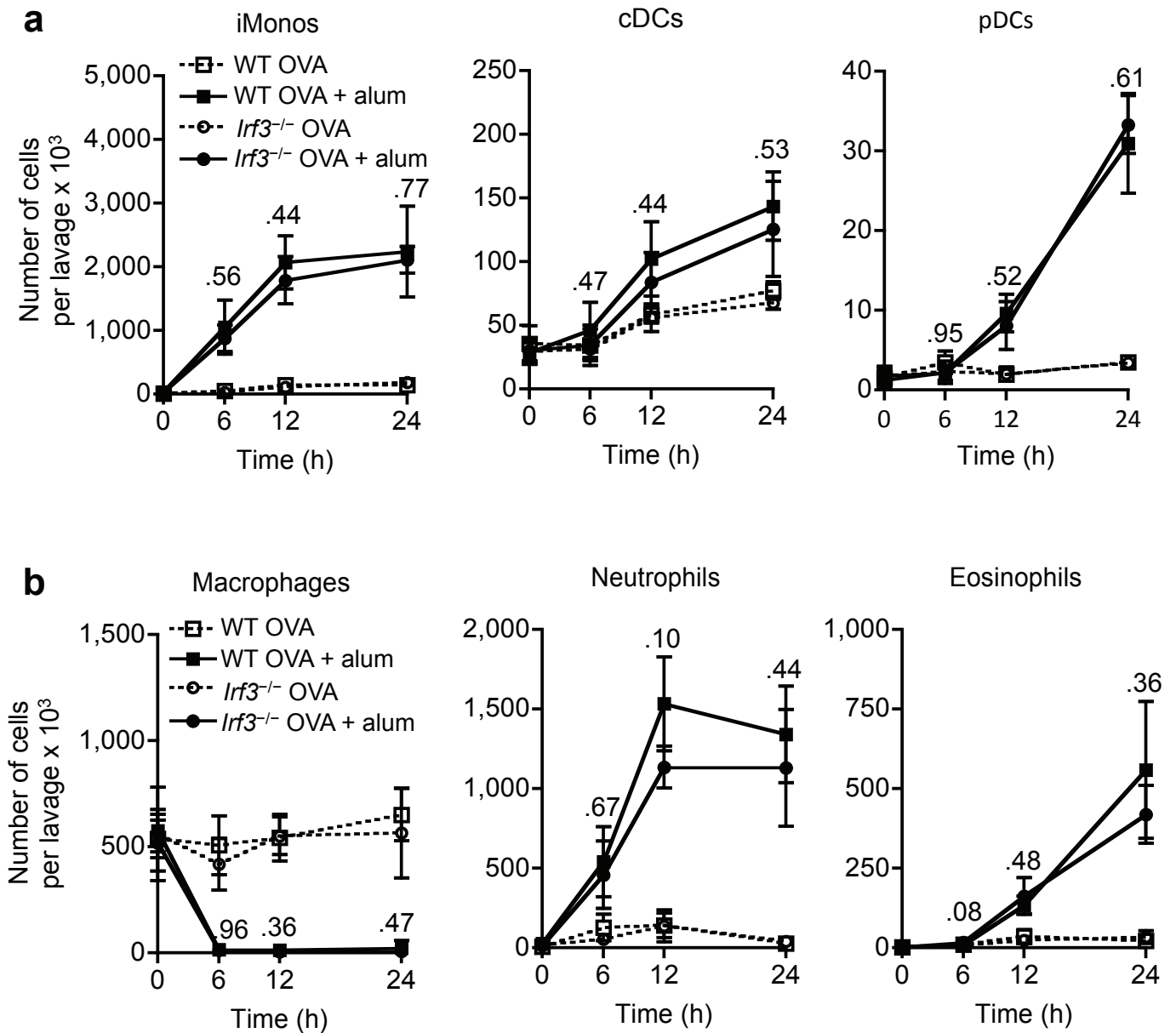
**Supplementary Figure 9** *Irf3* is essential for the boosting of 'canonical' Th2 cell differentiation and IgE responses in an alum-immunization-based asthma model. We challenged OVA- and OVA and alum-sensitized WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice with aerosolized OVA and analyzed for type 2 T cell and humoral responses. (a) BLN cell proliferation in response to 3 days *in vitro* OVA stimulation assessed by the measurement of <sup>3</sup>H-thymidine uptake. (b) ELISA measurement of IL-4, IL-5 and IL-13 concentrations in culture supernatants of OVA-stimulated BLN cells. Serum OVA-specific IgE (c) and IgG1 (d) titers. *n*=5. Data are representative of one of three independent experiments. (CPM, counts per minute).



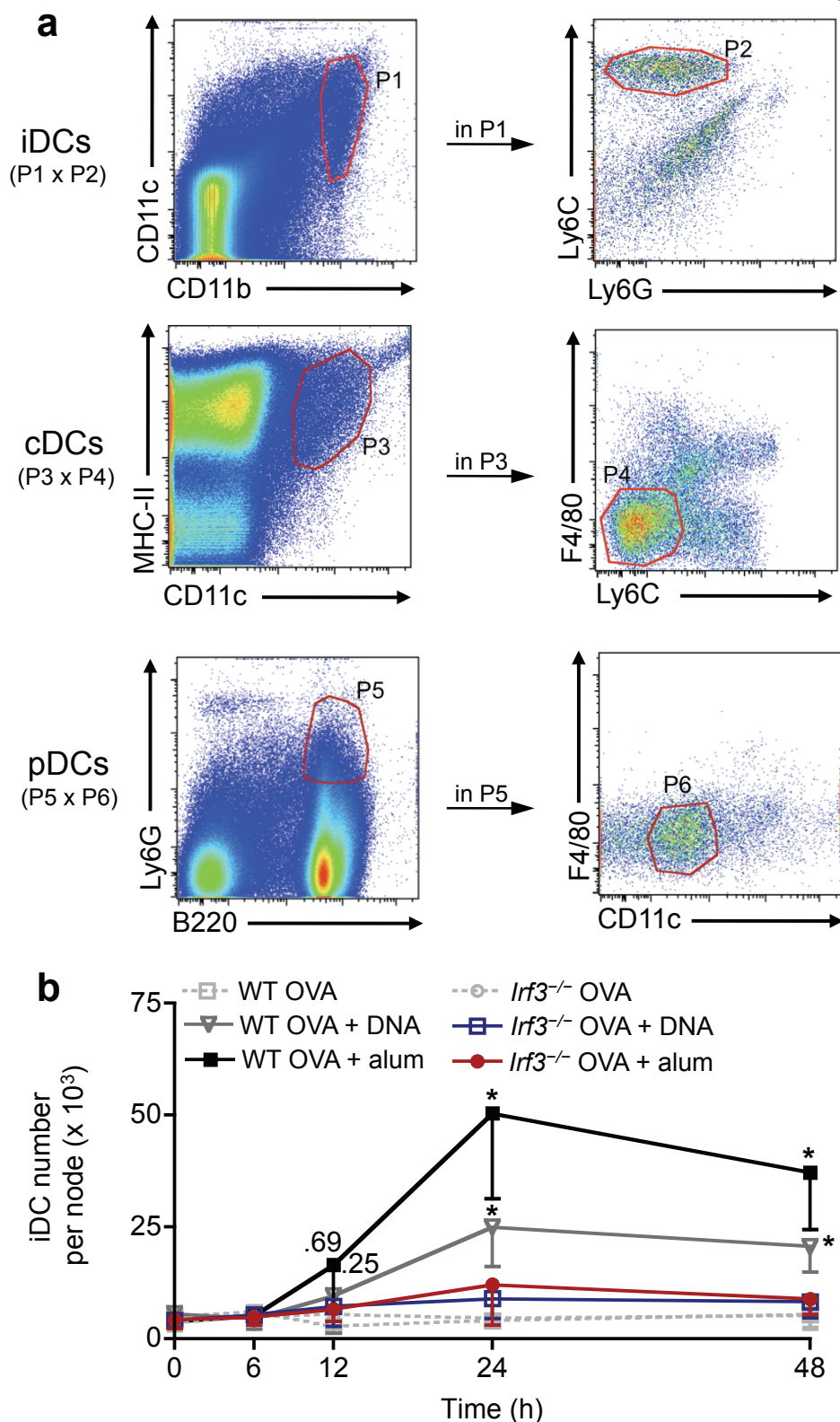
**Supplementary Figure 10** WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> T lymphocytes have similar potential for proliferation and Th2 cytokine secretion. **(a)** Proliferation assessed by measuring <sup>3</sup>H-thymidine incorporation during the last 16 hours of a 2-day culture of T cells ( $2 \times 10^5$  cells, >95% purity) purified from the BLNs of naïve WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> mice and cultured with CD28-specific antibodies into plates coated with CD3-specific antibodies. We cultured controls in uncoated wells without CD28-specific antibodies. **(b)** ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13 in the supernatant of the cells in a.  $n=5$ . Data are representative of one of three independent experiments. (CPM, counts per minute)



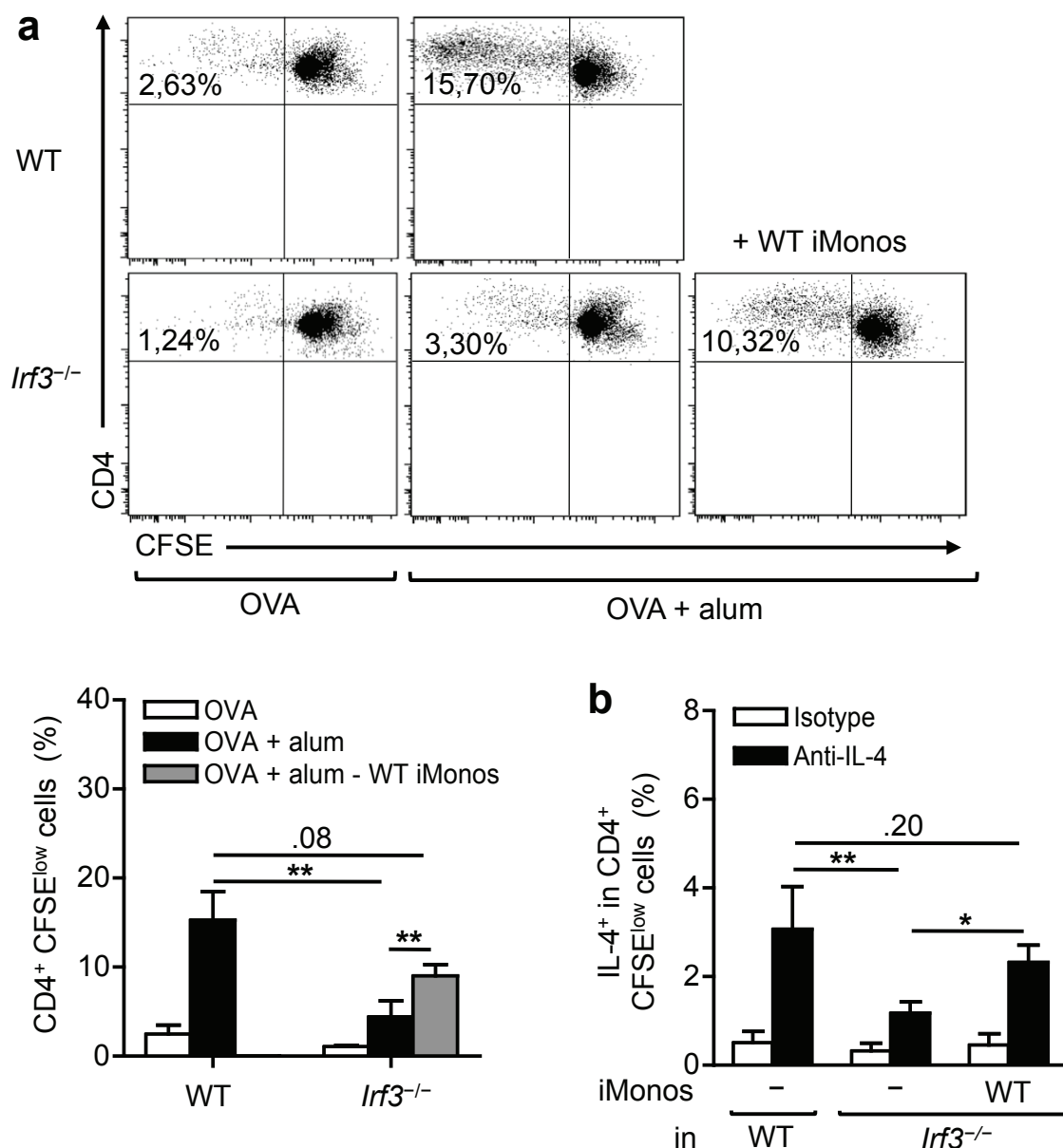
**Supplementary Figure 11** *lrf3*<sup>-/-</sup> mice have normal immunization potential in response to *Irf3*-independent adjuvants. Serum OVA-specific IgG1 (a), IgE (b), and IgG2c (c) antibody titers measured on day 28 in WT and *lrf3*<sup>-/-</sup> mice immunized s.c. with OVA and CFA on day 0 and OVA and IFA on day 14, and boosted with OVA i.p. on day 21. *n*=5. Data are representative of one of two independent experiments. (AU, arbitrary unit).



**Supplementary Figure 12** Alum induces similar recruitment of innate immune cells in WT and *lrf3*<sup>-/-</sup> mice. Recruitment of innate immune cells through time in the peritoneal lavage fluid of WT and *lrf3*<sup>-/-</sup> mice treated i.p. with OVA or OVA and alum, assessed by flow cytometry. **(a)** We defined inflammatory monocytes (iMonos) as F4/80<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> cells, conventional DCs (cDCs) as MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> Ly6C<sup>-</sup> cells, and plasmacytoid DCs (pDCs) as B220<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> CD11c<sup>int</sup> F4/80<sup>low</sup> cells. **(b)** We defined peritoneal macrophages as F4/80<sup>high</sup> CD11b<sup>+</sup> SSC<sup>high</sup> cells, neutrophils as CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> cells, and eosinophils as CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>int</sup> Ly6G<sup>int</sup> F4/80<sup>int</sup> cells. *n*=5. Data are representative of one of four independent experiments.

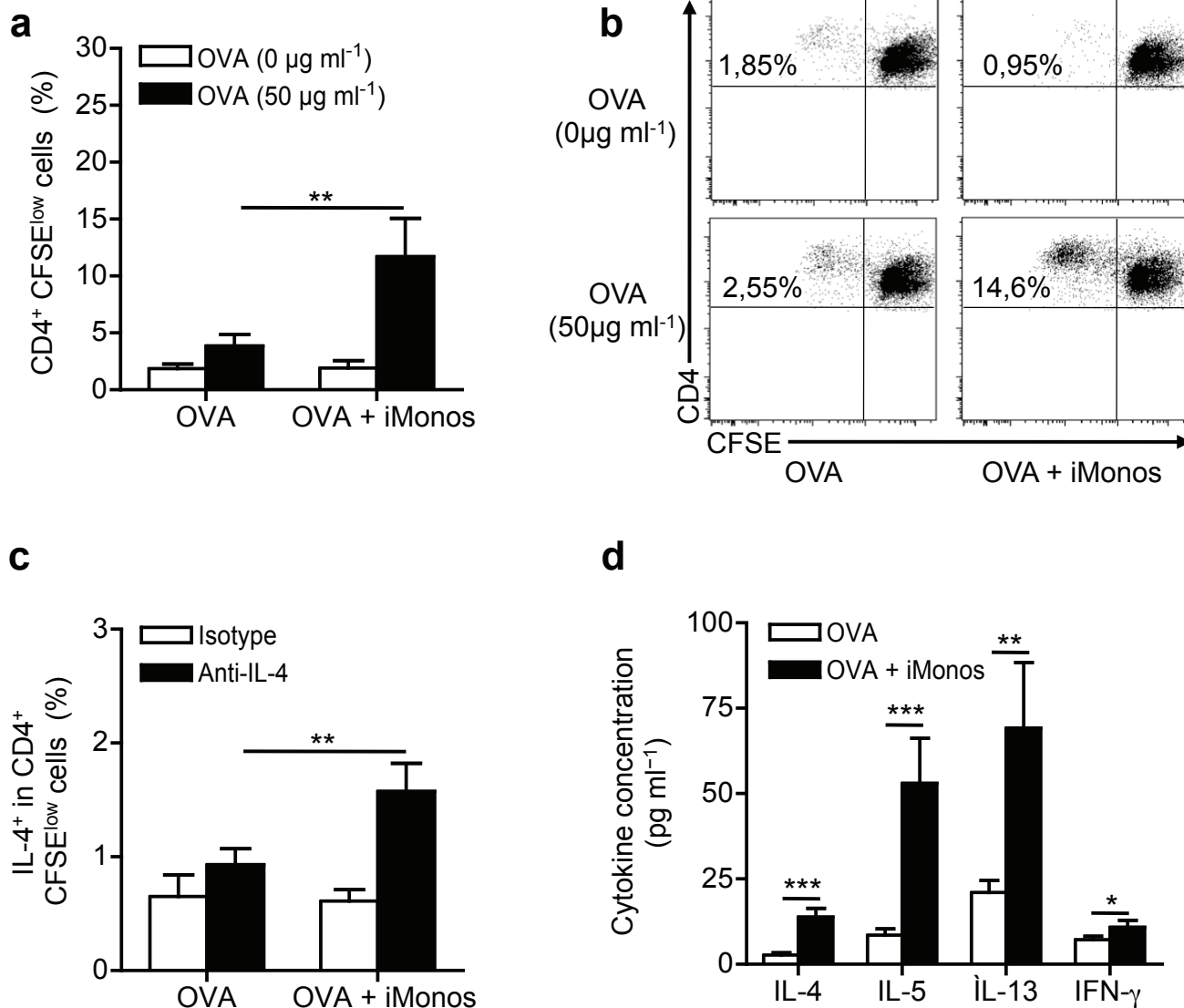


**Supplementary Figure 13** Gating strategy and alum- and DNA-induced migration of iDCs. **(a)** Gating strategy for the identification of inflammatory dendritic cells (iDCs), conventional DCs (cDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) in the BLNs of mice by flow cytometry. We defined iDCs as CD11c<sup>int/+</sup> CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>-</sup> cells, cDCs as MHCII<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>low</sup> Ly6C<sup>-</sup> cells and pDCs as B220<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> CD11c<sup>int</sup> F4/80<sup>low</sup> cells. **(b)** Comparison by flow cytometric analysis of the recruitment of iDCs to the BLNs of WT and *Lrf3*<sup>-/-</sup> mice treated i.m. with OVA, OVA and DNA or OVA and alum. *n*=5. Data are representative of one of more than 4 **(a)** and one of two **(b)** independent experiments.

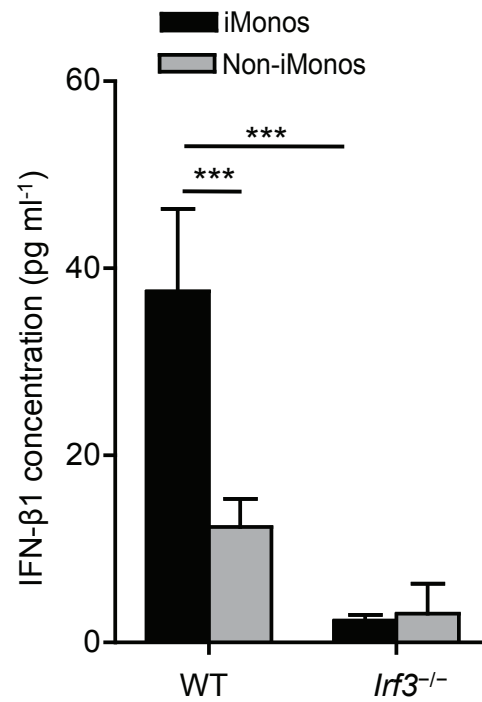


**Supplementary Figure 14** Deficient inflammatory monocyte function is responsible for impaired type 2 responses in the lymph nodes draining alum injection sites in *lrf3*<sup>-/-</sup> mice. We treated *lrf3*<sup>-/-</sup> mice i.p. with OVA and alum and, 6 h later, injected them i.p. with  $2.10^6$  iMonos isolated from the peritoneal cavity of OVA and alum-treated WT mice. Five days later, we labeled the BLN cells of recipient mice with CFSE and restimulated them *in vitro* with OVA for 5 days. (a) Proliferation of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells estimated by measuring the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry (Inserts indicating the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells). (b) Percentages of IL4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> cells assessed by intracellular staining and flow cytometry. We used BLN cells from WT and *lrf3*<sup>-/-</sup> mice that received PBS with OVA alone or OVA and alum as controls.  $n=4$ . Data are representative of one of three independent experiments.

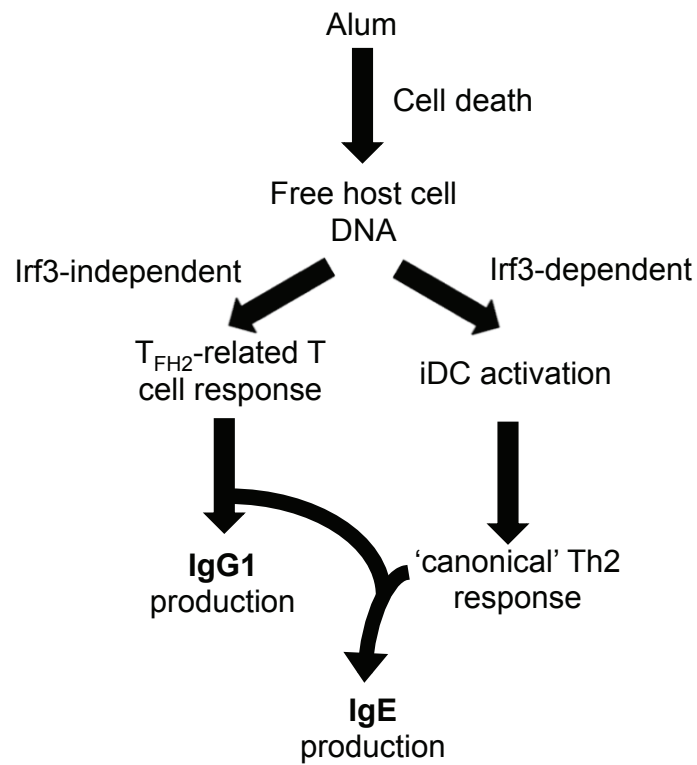




**Supplementary Figure 15** Inflammatory monocytes are sufficient to induce type 2 responses in the lymph nodes draining alum injection sites. We gave WT mice i.p. 10 µg OVA alone or OVA with  $2.10^6$  iMonos isolated from the peritoneal cavity of OVA and alum-treated WT mice (OVA + iMonos). Five days later, we labeled the BLN cells of recipient mice with CFSE and restimulated them *in vitro* with or without OVA for 5 days. **(a)** Proliferation of OVA-specific CD4<sup>+</sup> T cells estimated by measuring the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells by flow cytometry. **(b)** Representative histograms of samples compared in (a), with inserts indicating the percentage of CFSE<sup>low</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. **(c)** Percentages of IL4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> CFSE<sup>low</sup> cells assessed by intracellular staining and flow cytometry. **(d)** ELISA measurement of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  concentrations in the supernatant of the OVA-stimulated BLN cells.  $n=5$ . Data are representative of one of two independent experiments. (iMonos, inflammatory monocytes).



**Supplementary Figure 16.** Imonos are a major source of type I IFN production in alum-treated mice. IFN-β1 immunotrapping and ELISA detection in the supernatants of iMonos and negative fraction cells (non-iMonos) FACS-sorted from the peritoneal cavity of WT and *lrf3*<sup>-/-</sup> mice 18h after OVA and alum treatment. *n*=5. Data are representative of one of two independent experiments.



**Supplementary Figure 17** Proposed model for the adjuvant effect of host cell DNA upon alum immunization.

**Antibodies.** Allophycocyanin- and phycoerythrin-conjugated F4/80 (BM8)-, allophycocyanin-conjugated V $\alpha$ 2 TCR (B20.1)-, allophycocyanin-eFluor780-conjugated CD11c (N418)-, eFluor450-conjugated CD11b (M1/70)-, fluorescein isothiocyanate-conjugated B220 (RA3-6B2)-, biotinylated CCR7 (4B12)-, CD86 (GL1)-, eFluor450-conjugated CD4 (RM4-5)-, CD3e (17A2)-specific antibodies and phycoerythrin-cyanin7-conjugated streptavidin were from eBioscience. Biotinylated anti-MHC class II (I-Ab; AF6-120.1)-, fluorescein isothiocyanate-conjugated-Ly6C (AL-21)-, allophycocyanin-conjugated-Ly6G (1A8)-, peridinin chlorophyll protein-cyanin5.5-conjugated-Ly6C (AL-21)-, allophycocyanin-conjugated IL-4- (11.B.11)-specific antibodies and phycoerythrin-conjugated streptavidin were from BD Biosciences. Fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD40 (3/23) was from Serotec. Pacific-Blue-conjugated streptavidin was from Molecular Probes Invitrogen.

**Lavage of injection sites and measurement of free double-stranded DNA concentrations and cell death rate.** We performed lavages with 1 ml ice-cold Mg- and Ca-free PBS containing 0.6 mM EDTA. We removed cells and alum crystals from the lavage fluid of mice by 2 successive centrifugations at 1,000 g for 4 min at 4 °C. We measured double-stranded DNA in the acellular fraction of the lavage fluid using Quant-iT PicoGreen dsDNA reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. We assessed cell death rate following alum treatment by staining with 5% (vol/vol) 7-AAD (e-Bioscience), followed by flow cytometric analysis.

**Fluorescence microscopy.** We isolated alum depots from injection sites 12 hours after treatment and incubated them for 10 minutes with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). We then placed the depots in RMPI without phenol red, in a 35-mm glass bottom dish. We recorded images with an Olympus FV1000 confocal microscope equipped with a 60x oil objective and an incubation chamber to maintain the cells at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. We visualized DAPI fluorescence with a 405 nm excitation and a 415–480 nm emission window.

**Peritoneal lavage transfer experiments.** We performed peritoneal lavages 12 h after treatment with OVA and alum or OVA alone and removed cells and debris. We submitted peritoneal lavage fluids to DNase I digestion (Roche) for 5 h following the manufacturer's protocol. We mock-treated control peritoneal lavage fluids. We then gave recipient mice 400  $\mu$ l of donor peritoneal lavage fluid or PBS mixed with 10  $\mu$ g OVA i.p. We gave mice an i.p. boost of 20  $\mu$ g OVA 10 d later. Mice were sacrificed for serum analysis one week later.

**Immunizations with Freund's adjuvant.** We injected mice on d 0 subcutaneously with 10  $\mu$ g OVA alone or in conjunction with 400  $\mu$ g CFA (Pierce Biochemicals). We collected serum on d 10. We injected mice subcutaneously on d 14 with 10  $\mu$ g OVA alone or in conjunction with 400  $\mu$ g IFA (Pierce Biochemicals). On d 21, we boosted mice i.p. with 20  $\mu$ g alone and collected serum for analysis on d 28.

**Restimulation of BLN cells.** We cultured BLN cells ( $2 \times 10^5$  cells in a 96-well plate) in Click's medium ( $2.10^5$  cells in 200  $\mu$ l, in 96-well plates) supplemented with 0.5% (vol/vol) heat-inactivated C57 Bl/6 mouse serum (Harlan Netherland), 8 mM L-glutamin, 50 UI ml<sup>-1</sup> G-penicillin and 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin, with or without OVA (OVA grade V, Sigma) (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). We collected culture supernatants for cytokine detection by ELISA. We measured cell proliferation as <sup>3</sup>H-thymidine incorporation during the last 16 h of a 4-d culture.

**T-cell stimulation.** We purified  $2.10^5$  cells T cells from BLNs using the Pan T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) and assessed for purity by staining for CD3e followed by flow cytometry. We cultured cells with CD28-specific antibodies ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ; 37.51, eBioscience) in RPMI supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated FCS and additives into 96 well plates coated with CD3-specific antibodies ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ; 145-2C11, eBioscience). We cultured controls in uncoated wells without CD28-specific antibodies. We measured cell proliferation was measured as  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation during the last 16 h of a 2-d culture.

**CFSE labeling.** We incubated splenic and lymph node cells from OT-II transgenic mice ( $5 \times 10^7$  cells/ml) with CFSE ( $5 \text{ }\mu\text{M}$  in PBS) for 10 minutes at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . We washed cells in PBS containing 10% FCS and then twice in PBS and injected them in the caudal vein of mice.

**Alum-induced asthma model.** We challenged OVA- and OVA and alum-sensitized mice from d 21 to 25 with aerosolized OVA 1% (wt/vol) in PBS for 1 h per day. We performed broncho-alveolar lavages and cytology. Briefly, we catheterized the trachea and washed the lungs with 1 ml ice-cold Mg- and Ca-free PBS containing 0.6 mM EDTA. We assessed cell density in bronchoalveolar lavage fluid using a hemocytometer. We performed differential cell counts on cytopsin preparations stained with Diff-Quick (Dade Behring). We fixed lungs in 10% formalin, paraffin-embedded them, and cut them in 5-mm sections. We estimated the extent of peribronchial inflammation by a score calculated by means of quantification of peribronchial inflammatory cell layers in lung sections stained with hematoxylin and eosin. We quantified mucus production as the percentage of periodic acid-Schiff-stained goblet cells per total epithelial cells in randomly selected bronchi. We randomly selected and analyzed seven sections per lung.

**ELISA.** We assayed culture supernatants for mouse IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  by ELISA (Biosource/Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. We assayed peritoneal lavage supernatants for mouse IFN- $\beta$ 1 and IL-1 $\beta$  by ELISA (PBL Interferon Source and Imtec Diagnostics NV, respectively) according to the manufacturer's protocol. We performed IFN- $\beta$ 1 immunotrapping by culturing FACS-sorted iMonos and negative fraction ( $4.10^6$  cells/ml) overnight in capture antibody-coated 96 wells plates, followed by classical ELISA.

**Cell viability.** We assessed the viability of CFSE-labeled iMonos prior to adoptive transfer by means of DAPI staining and subsequent flow cytometric analysis. The survival of iMonos following labeling was high and comparable between WT and *Irf3*<sup>-/-</sup> cells (data not shown).

**Cell transfer experiments.** For the study of migration, we purified iMonos from the peritoneal lavage fluid of OVA and alum-treated mice by FACS 18 h post-treatment (>95% purity). We stained iMonos with CFSE at a concentration of  $2 \text{ }\mu\text{M}$  for 10 min at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , washed and tested their viability. We then injected  $1.10^6$  cells i.p. into recipient mice treated with OVA and alum 12 h before transfer, or into naïve WT mice. We gave control mice vehicle PBS. For the assessment of their effects on type 2 and humoral responses, we purified iMonos as above 6 h post-treatment, and injected  $2.10^6$  cells i.p. into recipient mice treated with OVA and alum 6 h before transfer.