



HAL
open science

Modulation de la réponse immunitaire par TLR7: rôle dans le diabète de type 1 et l'asthme allergique.

Françoise Grela

► **To cite this version:**

Françoise Grela. Modulation de la réponse immunitaire par TLR7: rôle dans le diabète de type 1 et l'asthme allergique.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université René Descartes - Paris V, 2008. Français. NNT: . tel-00322355

HAL Id: tel-00322355

<https://theses.hal.science/tel-00322355>

Submitted on 17 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS DESCARTES
FACULTE DE MEDECINE PARIS DESCARTES-SITE NECKER

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR
Sciences de la Vie et de la Santé
Ecole doctorale : Gc2ID
Discipline : Immunologie

présentée et soutenue publiquement

par

Françoise-Irène GRELA

le 15 septembre 2008

Titre :

**Modulation de la réponse immunitaire par TLR7 :
rôle dans le diabète de type 1 et l'asthme allergique**

Jury :

Docteur Stefano MARULLO

Docteur Alain LE MOINE

Docteur Richard LO-MAN

Professeur Gilles MARCHAL

Docteur Henri-Jean GARCHON

Docteur Nathalie THIEBLEMONT

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Ca y est, nous y sommes, la thèse est écrite, les papiers soumis, les manips en suspens, j'ai donc un peu de temps pour remercier toutes les personnes qui ont participé à ces quelques années de recherche...

Je commence par remercier le docteur Michel DY, directeur de l'unité CNRS UMR 8147, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour les conseils et encouragements qu'il m'a prodigués durant toutes ces années.

J'exprime toute ma gratitude au docteur Stéfano MARULLO qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse.

Je remercie également les docteurs Alain LE MOINE et Richard LO-MAN d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'avoir critiqué de manière constructive ce manuscrit.

Toute ma reconnaissance est acquise au professeur Gilles MARCHAL et au docteur Henri-Jean GARCHON pour leur participation au jury.

Un merci particulier au docteur Nathalie THIEBLEMONT qui a dirigé (officiellement) cette thèse. Merci de m'avoir initiée à la recherche et permis de m'épanouir dans ce projet. Je pense avoir, grâce à toi et à nos nombreuses discussions, acquis de l'expertise dans ce domaine mais surtout une façon de réfléchir et d'analyser les questions qui me sera très utile pour ma carrière future. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi et je te remercie pour ton enthousiasme (quand j'en manquais parfois) et tes conseils qui m'ont été précieux à différentes phases de la thèse.

Cette thèse n'aurait cependant pas été aussi enrichissante si je n'avais pas été dans un environnement aussi agréable, grâce à tous les collègues qui ont partagé cette expérience.

Je vais commencer par remercier le docteur André HERBELIN qui m'a initiée au monde des NKT, qui finalement se sont révélés être plein de surprises. Je continue par remercier les autres chercheurs de l'unité, les docteurs Elke SCHNEIDER, Anne-France

BERTRON, Maria LEITE-DE-MORAES, Flora ZAVALA, Odile DEVERGNE, Geneviève COURTOIS, Jean-Philippe HERBEUVAL et Olivier HERMINE qui m'ont toujours bien accueillie et qui, par leurs questions et réflexions, ont contribué à faire avancer ce travail. Un merci particulier au professeur Mireille DARDENNE qui a pris le temps de relire cette thèse et pour ses remarques constructives.

Arrive maintenant le moment de remercier l'ensemble des autres personnes du laboratoire dont je ne ferai pas une liste exhaustive de peur d'en oublier... Je leur dirai donc un grand merci pour toutes ces années, pour cette ambiance si agréable qui m'a permis de passer de bons moments et de travailler dans d'excellentes conditions.

Je commencerai par adresser une dédicace particulière aux membres passés, présents et futurs de l'équipe AH-NT en commençant par Aude, avec qui j'ai partagé une chef, un sujet, un bureau et de nombreux fous-rires... Merci pour toutes ces années où nous avons travaillé à quatre mains dans le diabète et pour nos discussions souvent enflammées sur tous types de sujets saugrenus...

Je continuerai par Emilie, qui m'a souvent aidée, avec qui toute manip entreprise est réussie mais je tenais surtout à te remercier pour tes grandes qualités humaines et ta gentillesse. Un merci également à Raouf à qui je passe le relais en tant qu'étudiant le plus ancien de l'équipe NT et à Nathalie à qui je souhaite bonne route. Un petit mot pour Séverine, coach officiel des étudiants en thèse, tu m'as vue arriver dans le labo en tant que petite étudiante en DEA et évoluer tant bien que mal jusqu'à la thèse. Merci pour tout. Je souhaite également à Linh et Elvire bon courage pour leur thèse. Je pense bien sûr à tous ceux qui ont quitté le labo avec tout d'abord Luíza, mon alliée, confidente et voisine de bureau au cours des dernières années, Ren ma petite chinoise préférée qui m'a beaucoup appris tant humainement que scientifiquement. Une mention spéciale pour la « dream team » composée de Jordan et Emi. Le niveau de décibels et le nombre de fous rires a largement diminué dans le labo depuis votre départ !

Bien que très bien entourée dans mon labo, j'ai quand même osé au cours de ces années, m'aventurer au-delà de la porte 592 et pu partager beaucoup de bons moments avec les autres membres du labo. Je commencerai donc par remercier Pascaline et Julie pour nos supers conversations et analyses des séries américaines, Séverine, ma voisine de bureau pour nos petits bavardages entre deux manips. Une petite pensée pour le groupe DY, avec

François, Mélanie et Rachel pour les repas, cafés (chocolat pour moi) et discussions partagées. Merci pour votre bonne humeur et votre humour décapant... Un mot pour l'équipe MLM, avec Marie-Laure avec qui nous avons partagé les aléas du DEA et de la thèse, et tous les membres fluctuants de l'équipe dont je n'ai pas toujours pu me rappeler les prénoms !

Je termine par remercier l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées au sein de l'unité CNRS UMR 8147. Merci pour toutes ces années si agréables.

Une petite pensée pour mes compagnons de fac, Abéline, Lise, Sonia et Alexis, avec qui j'ai commencé cette aventure biologique et à qui j'adresse pour certains qui ont choisi la même route que moi, tous mes vœux de réussite.

Je ne finirai pas ces remerciements sans adresser un mot à mes amis de Judo avec qui j'ai passé de nombreuses soirées sportives. Et bien sûr, un clin d'œil particulier à Barbara, Fred et Sophie, plus connues sous le nom de JUDOCATS. Merci de m'avoir soutenue, et d'avoir écouté, avec amusement souvent, mes histoires de souris...

Je termine par mes parents qui m'ont soutenu moralement et financièrement pendant toutes ces années et qui ont suivi les « grandes » avancées de cette thèse. Non dimentico una parolina per la mamma per avermi sempre sostenuta néi miei studi e avermi consolata nelle qualche fasi di dubbi (e non piangere...). Enfin, je souhaite bonne route à mon petit frère dans la voie qu'il a choisi avec tous mes vœux de réussite.

Bien, c'est donc une étape de plus de franchise, qui met un point final à mes études et à ma vie d'étudiante et qui va me permettre d'entrer enfin dans le « monde adulte »... Mais bon, on peut toujours rêver...

ABREVIATIONS	8
---------------------------	----------

INTRODUCTION.....	10
--------------------------	-----------

I. DETECTION DU DANGER	10
-------------------------------------	-----------

1. Reconnaissance du non-soi	10
-------------------------------------------	-----------

A. Discrimination soi / non-soi : quelques réflexions.....	10
------------------------------------------------------------	----

B. Les vertus de l'immunité innée	13
-----------------------------------------	----

2. Les « Pathogen recognition receptors » à la base de l'immunité innée.....	14
-------------------------------------------------------------------------------------	-----------

A. Evolution des PRR dans les différents règnes.....	14
------------------------------------------------------	----

B. Les PRR des mammifères	17
---------------------------------	----

a) Les PRR à domaine CARD.....	18
--------------------------------	----

① <i>Les protéines Nod</i>	18
----------------------------------	----

② <i>Ipaf</i>	20
---------------------	----

③ <i>Hélicases</i>	20
--------------------------	----

b) Les PRR à domaine PYRIN.....	21
---------------------------------	----

c) Les récepteurs non PRR	22
---------------------------------	----

① <i>Les récepteurs aux lectines de type C (CLR)</i>	23
------------------------------------------------------------	----

② <i>Les récepteurs Scavenger</i>	24
-----------------------------------------	----

3. Les récepteurs Toll-like (TLR).....	25
-----------------------------------------------	-----------

A. Quelques récepteurs, de multiples agonistes, une détection efficace.....	25
-----------------------------------------------------------------------------	----

a) Un domaine de reconnaissance conservé.....	26
-----------------------------------------------	----

b) Une large gamme d'agonistes.....	28
-------------------------------------	----

① <i>TLR4 à l'origine de la recherche sur les TLR des mammifères</i>	29
----------------------------------------------------------------------------	----

② <i>La reconnaissance de protéines ou de sucres microbiens</i>	30
-----------------------------------------------------------------------	----

③ <i>La reconnaissance des acides nucléiques</i>	31
--------------------------------------------------------	----

④ <i>La détection des ligands endogènes</i>	32
---------------------------------------------------	----

⑤ <i>Plusieurs gènes, des fonctions similaires</i>	33
----------------------------------------------------------	----

B. Une réponse spécifique à l'agoniste.....	34
---------------------------------------------	----

a) Dix récepteurs, cinq adaptateurs	34
-------------------------------------------	----

① <i>Initiation du signal</i>	34
-------------------------------------	----

② <i>Le domaine TIR à l'interface entre reconnaissance et signalisation</i>	35
-----------------------------------------------------------------------------------	----

③ <i>Les adaptateurs, premiers maillons de la chaîne</i>	35
----------------------------------------------------------------	----

b) Du récepteur à l'activation des gènes	38
------------------------------------------------	----

① <i>Voies en aval de MyD88</i>	39
---------------------------------------	----

② <i>Voies en aval de TRIF</i>	40
--------------------------------------	----

③ <i>Autres protéines impliquées dans la signalisation</i>	41
------------------------------------------------------------------	----

④ <i>La spécificité de la réponse</i>	41
---------------------------------------------	----

⑤ <i>Les boutons d'arrêt</i>	42
------------------------------------	----

C. La place des TLR dans la réponse immune.....	44
-------------------------------------------------	----

a) TLR : une expression ubiquitaire.....	44
------------------------------------------	----

① <i>Distribution des TLR</i>	44
-------------------------------------	----

② <i>Une expression contrôlée</i>	45
-----------------------------------------	----

b) Les cellules présentatrices d'antigène à l'origine de la réponse	46
---------------------------------------------------------------------------	----

① <i>Première étape : la dendritique s'active</i>	46
② <i>Deuxième étape : la dendritique recrute</i>	48
③ <i>Troisième étape : la dendritique collabore</i>	49
c) Conséquences d'un déficit TLR.....	51
4. TLR7 et infections virales.....	52
A. TLR7 et la détection virale.....	52
a) Les imidazoquinolines : agonistes synthétiques de TLR7	53
b) Les ARNs : agonistes naturels de TLR7	54
B. Un récepteur intracellulaire.....	54
a) Une localisation endosomale.....	55
b) Comment les ARN endogènes échappent-ils à la reconnaissance ?	55
c) Une signalisation efficace	56
C. Rôle central de la cellule dendritique plasmacytoïde (PDC)	57
a) Réponse de la dendritique	57
b) Les IFN de type I : molécules antivirales par excellence	58
c) Un système hautement surveillé.....	58
d) La PDC en situation pathologique	59
II. PLACE DES TLR DANS LA PERFORMANCE DU SYSTEME IMMUNITAIRE ..	62
1. Infections et système immunitaire : un rôle bénéfique ?	62
A. Hypothèse de l'hygiène : réalité ou fiction ?.....	62
a) Les fondements de l'hypothèse	62
b) Les données actuelles.....	63
c) L'hypothèse s'élargit.....	64
B. Les preuves épidémiologiques	66
a) Rôle des microorganismes et de leurs composés	66
b) Le cas des virus	67
c) La difficulté de ces études.....	68
C. La contribution des modèles animaux.....	69
a) Infections et asthme.....	69
b) Infections et diabète	70
c) Les virus, agents déclencheurs ?	70
2. Les TLR en situation pathologique.....	71
A. Le potentiel modulateur des TLR.....	72
a) Polymorphisme et désordres immunologiques	72
b) TLR et modèles d'asthme	73
c) TLR dans le diabète	74
B. Cibles cellulaires et moléculaires dans l'asthme.....	75
a) Aspects immunologiques de la réponse asthmatique.....	75
① <i>Quand respirer devient difficile : causes physiologiques</i>	76
② <i>Cascade allergique</i>	76
③ <i>Des cellules au service de l'inflammation</i>	78
④ <i>Le remodelage des voies respiratoires</i>	79
b) Régulation et potentiel thérapeutique	81
① <i>Modulation de la balance Th1/Th2</i>	81
② <i>Le rôle des lymphocytes T régulateurs</i>	82

③ <i>L'implication des lymphocytes NKT</i>	84
C. Modulation dans le diabète de type 1	85
a) La cellule β cible de toutes les attaques	85
b) Le modèle de la souris NOD	86
c) Contrôle de l'inflammation pancréatique	88
① <i>Deséquilibre de la balance Th1/Th2</i>	88
② <i>Les cellules T régulatrices au secours de la cellule β</i>	88
③ <i>Un défaut en lymphocytes NKT</i>	89
3. Les TLR, une nouvelle cible thérapeutique ?	90
A. Approches thérapeutiques usuelles	90
a) Les traitements contre l'asthme	91
① <i>Nouvelles molécules</i>	91
② <i>Antagonistes des médiateurs inflammatoires</i>	91
b) Immunothérapie du diabète	92
① <i>Thérapie par anticorps monoclonaux</i>	92
② <i>Immunothérapie par les cytokines</i>	93
③ <i>Restauration de la masse de cellules β</i>	93
B. Le potentiel TLR	94
a) Mécanismes d'action	94
① <i>Une modulation de balance Th1/Th2</i>	94
② <i>Un ciblage des cellules régulatrices</i>	95
b) Immunothérapie par les TLR : un nouvel espoir ?	96
OBJECTIFS DU TRAVAIL	98
RÉSULTATS	99
II. Effet de la stimulation des TLR dans la modulation du diabète de type 1	99
Article n°1	100
TGF- β and natural killer T cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. <i>Diabetes</i> . 2006, 55:179-185.	
Manuscrit n°2	109
Immunoregulatory responses induced through TLRs and potential therapeutic implications for autoimmune diseases. <i>Manuscrit soumis</i> .	
Manuscrit n°3	136
TLR2 prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells. <i>Manuscrit soumis</i> .	
Manuscrit n°4	160
The TLR3 agonist poly(I)poly(C) prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells and IL-4 production. <i>Manuscrit soumis</i> .	
II. Effet de la modulation d'une stimulation TLR7 dans l'asthme allergique.....	181
Manuscrit n°5	182

Toll-like receptor 7 stimulation activates directly Natural Killer T cells. *Manuscript soumis.*

DISCUSSION	211
CONCLUSION	223
PERSPECTIVES	224
BIBLIOGRAPHIE.....	225

ABREVIATIONS

AP-1 : activating protein-1

ARNdb : ARN double brin

ARNsb : ARN simple brin

BCG : bacille de Calmette et Guérin

CARD : caspase recruitment domain

CFA : adjuvant complet de Freund

CLR : C lectin receptor

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : cellule présentatrice d'antigène

CRD : carbohydrate recognition domain

DC : cellule dendritique

GPI : glycosyl phosphatidylinositol

HSP : protéine de choc thermique

IFN : interféron

IKK : I κ B Kinase

IL-1 : interleukine-1

IRAK-1 : IL-1 receptor-associated kinase 1

IRF-3 : IFN responding factor-3

ITAM : immunoreceptor-based tyrosine activation motif

JNK : janus kinase

LBP : LPS-binding protein

LCMV : lymphocytic choriomeningitis virus

LPS : lipopolysaccharide

LRR : leucine rich-repeat

MAL : MyD88-adaptor-like protein

MALP-2 : macrophage-activating lipopeptide-2

MDC : myeloid dendritic cell

Mda-5 : melanoma differentiation-associated gene 5

MyD88 : myeloid differentiation primary-response gene 88

NF- κ B : nuclear factor- κ B

NK : natural killer

NKT : natural killer T

NOD : non-obese diabetic
ODN : oligodeoxynucléotide
OVA : ovalbumine
PAMP : pathogen-associated molecular pattern
PDC : plasmacytoid dendritic cell
PG : peptidoglycane
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PKR : protéine kinase R
Poly(I :C) : acide polyinosinique-polycytidilique
PRR : pathogen recognition receptor
R848 : resiquimod
RIG-I : retinoic acid-inducible gene I
RLK : receptor-like kinase
RSV : respiratory syncytial virus
SARM : sterile α - and armadillo-motif-containing protein
TCR : T cell receptor
TGF- β : transforming growth factor- β
Th : T helper
TIR : Toll-IL-1 related domain
TLR : Toll-like receptor
TNF- α : tumor necrosis factor- α
TRAF-6 : TNFR-associated factor-6
TRAM : TRIF-related adaptor molecule
TRIF : TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β
VHC : virus de l'hépatite C
VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

La biomasse terrestre se compose majoritairement de microorganismes dont nombreux sont pathogènes capables de coloniser et de tuer d'autres organismes. C'est pourquoi, très tôt dans l'évolution des espèces, un système s'est développé pour reconnaître et éliminer les dangers potentiels de l'environnement. Le système immunitaire permet ainsi de discriminer les éléments appartenant à l'organisme (soi), des éléments étrangers potentiellement dangereux (non-soi). Les réponses immunitaires développées ont alors pour but d'éliminer le pathogène qui s'est introduit tout en veillant à conserver l'intégrité de l'organisme. Les réactions mises en jeu sont complexes et font appel à de nombreux types cellulaires et molécules contrôlés par de nombreuses boucles de régulation, limitant l'emballement du système. Mais comment l'organisme parvient-il à détecter le danger ?

I. DETECTION DU DANGER

La notion de danger est très importante en immunologie car il s'agit pour l'organisme de détecter l'entrée d'un élément étranger mais surtout d'évaluer son potentiel pathogène afin de déclencher des réponses appropriées.

1. RECONNAISSANCE DU NON-SOI

La définition du système immunitaire est de discriminer le soi du non-soi. En fait, cette idée simple repose sur deux notions qui sont complexes à définir, à savoir soi et non-soi.

A. DISCRIMINATION SOI / NON-SOI : QUELQUES REFLEXIONS

Bien avant la découverte des molécules importantes dans la détection et la présentation des antigènes, différentes théories concernant la discrimination soi / non-soi avaient été émises. Encore aujourd'hui, cette idée divise la communauté scientifique. Cette théorie, aujourd'hui bien étayée mais encore discutée par quelques travaux, implique trois stratégies du système immunitaire : reconnaissance du soi, reconnaissance du non-soi et reconnaissance simultanée des deux.

D'un point de vue évolutif, la première stratégie à avoir été mise en place était la reconnaissance du non-soi grâce aux mécanismes de l'immunité innée. Ces derniers sont portés par des récepteurs codés par le génome qui reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes hautement conservés. Sous la pression sélective imposée par les microorganismes infectieux, le système immunitaire a dû évoluer. A partir des vertébrés à

mâchoire (gnathostomes), un deuxième système plus spécialisé s'est mis en place. Ainsi, s'est développé le système adaptatif, porté par des récepteurs générés par des mécanismes somatiques pendant l'ontogénie de l'organisme. Ces derniers créent de façon aléatoire un répertoire de récepteurs aux antigènes, porté par les lymphocytes T et B permettant la reconnaissance de tous les antigènes microbiens imaginables. Evidemment, l'induction d'une réponse immune n'est appropriée que si l'antigène dérive d'un pathogène. Ce système est avantageux car il propose un répertoire plus flexible mais les cellules portant des récepteurs ayant une affinité trop grande pour les molécules du soi doivent être éliminées.

Ainsi, chez les vertébrés, la présence d'un système immunitaire inné et adaptatif implique que la détection du non-soi est forcément couplée à une discrimination soi / non-soi. Charles Janeway a beaucoup discuté cette notion dans ses différentes publications. Selon lui, le système immunitaire comporte deux branches, une spécifique pour le non-soi infectieux portée par l'immunité innée et l'autre spécifique pour tous les autres antigènes du non-soi *via* le système adaptatif qui, par essence, est lié au soi, car sélectionné et activé par des molécules du soi. Selon sa théorie, la discrimination serait faite par le système immunitaire inné qui activerait le système adaptatif uniquement lors de la présence d'un pathogène (Janeway, Jr. 2001).

Melvin Cohn, qui s'est également intéressé à cette notion de discrimination soi / non-soi, donne moins de poids au système inné. Pour lui, il existe, avant toute réponse immunitaire, deux phénomènes qu'il nomme « décision 1 » et « décision 2 ». Ainsi, il faut tout d'abord éliminer toute cellule réactive vis-à-vis du soi (décision 1) pour ne garder que des clones cellulaires dirigés contre le non-soi. Puis intervient la décision 2, à savoir la régulation du type de réponse effectrice (médiation cellulaire ou humorale). C'est donc la décision 1 qui est à la base de la discrimination (Cohn 2005).

Ce phénomène est depuis longtemps discuté dans les revues d'immunologie. La notion est acceptée mais la définition reste complexe en partie à cause de la difficulté à expliquer soi et non-soi. Qu'est-ce que le soi ? Les réponses sont variées et sont loin de faire l'unanimité. Certains définissent le soi comme quelque chose codé par le génome. D'autres y incluent tout ce qui est sous la peau, y compris des structures codées par le génome d'organismes commensaux. D'autres excluent les sites non accessibles par les lymphocytes (cerveau, cornée par exemple). Ensuite, cette définition peut varier en fonction du type cellulaire auquel on s'adresse. Ainsi, pour les lymphocytes T, le soi pourrait correspondre à l'ensemble des peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce concept est restreint par Waldmann qui suggère que le soi se limite aux peptides induisant une tolérance

(Waldmann et al. 1988) et Zinkernagel qui suggère, lui, que le soi se résume aux molécules portées par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et de l'épithélium thymique (Zinkernagel et al. 1991). Mitchinson introduit une notion de quantité d'antigène qui doit dépasser un certain seuil pour être pris en compte dans la reconnaissance du soi (Mitchison 1993). Ce ne sont que quelques exemples pour attester la difficulté de cette définition. De plus, le système a également une fonction de « nettoyage » des déchets comme les protéines dénaturées, les cellules sénescents ou encore les produits de nécrose qui sont considérés comme non-soi pour le système immunitaire.

La notion de non-soi est également problématique. On pourrait le qualifier de tout ce qui est étranger au corps. Cependant, certaines structures répondant à cette définition n'induisent pas de réponses immunitaires, comme le silicone, des haptènes ou certains types de nourriture. Nous en revenons donc à la théorie de Janeway qui explique que la présence d'un pathogène, donc d'un danger, est nécessaire pour avoir une réaction immunitaire efficace.

Une autre grande théorie, décrite par Polly Matzinger est venue s'opposer à la discrimination soi / non-soi. Pour elle, le but premier du système immunitaire est de détecter le danger sans besoin de reconnaissance du soi et non-soi (Matzinger 1994). La principale différence entre les deux modèles réside dans l'initiation de la réponse immune. Dans le modèle soi / non-soi, c'est le fait qu'une particule soit étrangère à l'organisme qui va induire une réaction alors que dans le modèle du danger, ce qui importe c'est le fait que cette entité puisse causer ou non des dommages. Si la réponse est non et que les cellules environnantes ne sont pas affectées, le système ne réagira pas. A partir du moment où des dégâts apparaissent, la réaction immunitaire est initiée. Il importe peu que les dommages soient causés par le pathogène. Ce qui est essentiel, c'est l'envoi de « signaux de danger » par les tissus endommagés (Matzinger 1998). Ce à quoi Janeway répond que ces signaux ne consistent qu'en des molécules de costimulation et des cytokines induites par les pathogènes qui ont été reconnus par le système immunitaire inné (Janeway, Jr. et al. 1996).

Si l'on suit la théorie de Janeway qui est la plus communément admise, on se rend compte que le système immunitaire inné joue un très grand rôle dans la détection du danger symbolisé par les pathogènes. Quels sont les avantages d'un tel système, qui, après tout a été le premier mis en place dès les invertébrés et perdure encore aujourd'hui chez les organismes dits « supérieurs » en collaborant avec le système adaptatif. En quoi ce système est-il si performant qu'il a été conservé dans l'évolution ?

B. LES VERTUS DE L'IMMUNITE INNEE

Il est vrai que le système adaptatif possède de nombreux avantages qui permettent de faire face à l'évolution des pathogènes et de ralentir l'échappement de ces derniers grâce à un répertoire infini de récepteurs. Cependant, le système inné est lui aussi très performant puisqu'il est capable de reconnaître des constituants moléculaires invariants d'agents infectieux (Figure 1).

Propriétés	Système immunitaire inné	Système immunitaire adaptatif
Récepteurs	Fixés dans génome Pas de réarrangement	Codés par des segments géniques Réarrangement nécessaire
Distribution	Non clonale	Clonale
Reconnaissance	Motifs moléculaires conservés (LPS, LTA, mannanes, glycanes)	Détails de structures moléculaires (protéines, peptides, carbohydrates)
Discrimination soi/non-soi	Parfaite : sélectionnée par l'évolution	Imparfaite : sélectionnée dans des cellules somatiques individuelles
Temps d'action	Activation immédiate des effecteurs	Activation retardée des effecteurs
Réponse	Molécules costimulatrices Cytokines (IL-1 β , IL-6) Chimiokines (IL-8)	Expansion clonale ou anergie IL-2 Cytokines effectrices (IL-4, IFN- γ)

Figure 1 : Immunité innée et adaptative (d'après Charles Janeway, PNAS 2001)

Ces molécules sont pour la plupart essentielles à la survie des microbes et présentent une très faible variabilité dans le sens où des mutations de ces structures pourraient être létales pour les pathogènes. Par exemple, la structure générale du lipopolysaccharide (LPS) est partagée par toutes les bactéries à Gram négatif. Ainsi, un récepteur capable de reconnaître une telle structure est capable de détecter toutes les bactéries à Gram négatif, ce qui somme toute fait déjà un nombre conséquent de microorganismes. Charles Janeway a nommé ces structures PAMP (Pathogen-associated molecular patterns) pour structures moléculaires associées aux pathogènes (Janeway, Jr. 1989). Grâce à la reconnaissance de quelques structures clés, l'organisme peut combattre à peu près toutes les familles de microorganismes. Ainsi, la détection du LPS et de l'acide lipotéichoïque, structures des bactéries à Gram négatif et positif, des ARN double-brin, structures communes à différents groupes de virus et du mannane, constituant conservé des levures, permet à l'hôte de se prémunir contre tous ces pathogènes. La panoplie de récepteurs chargés de reconnaître ces PAMP a par la suite été désignée sous le nom de PRR (Pathogen recognition receptors). Cette stratégie de l'hôte permet de se protéger contre l'échappement des mutants microbiens mais aussi de reconnaître un grand nombre de structures par une quantité limitée de récepteurs codés par le génome.

Un autre avantage de ce système est que les structures sélectionnées pour la reconnaissance immune sont très différentes des molécules du soi, ce qui permet d'éviter tout

dommage aux cellules et tissus de l'organisme. Grâce à ce système, l'organisme peut également distinguer le non-soi « inoffensif » du non-soi associé au pathogène. Cette fonction permet enfin d'éviter des réactions inappropriées à des molécules de l'environnement non dangereuses. Le système inné est aussi capable de produire une réponse rapide à l'entrée d'un pathogène. En effet, là où le système adaptatif devient opérationnel au bout de quelques jours, les mécanismes de l'immunité innée sont efficaces en quelques heures et, grâce à la diffusion de médiateurs moléculaires, permettent un recrutement rapide d'autres effecteurs sur le lieu de l'infection.

Pendant longtemps, la recherche en immunologie s'est focalisée sur les bases moléculaires et cellulaires des réponses immunitaires adaptatives. Très peu de mécanismes étaient décrits sur l'immunité innée. On connaissait son existence mais elle était plutôt considérée comme une « relique » conservée par l'évolution pour contenir l'infection jusqu'à l'induction de la « vraie » réponse immunitaire adaptative. La découverte des PRR a redonné à ce système « archaïque » une réelle fonction dans l'initiation des réactions immunitaires et dans l'orientation des réponses du système adaptatif.

2. LES « PATHOGEN RECOGNITION RECEPTORS » A LA BASE DE L'IMMUNITE INNEE

Depuis longtemps, l'existence de ces récepteurs était soupçonnée et la récente découverte de ces molécules a montré que leur rôle était primordial dans les réponses immunologiques.

A. EVOLUTION DES PRR DANS LES DIFFERENTS REGNES

Si l'on remonte l'échelle de l'évolution, on s'aperçoit que ces récepteurs hautement conservés étaient déjà présents dans les systèmes immunitaires primaires et notamment chez les plantes. En effet, ces organismes ont également besoin de se défendre contre les pathogènes de l'environnement, d'autant plus à cause de leur immobilité. Lorsque l'on étudie le génome des plantes, il est intéressant de noter qu'elles possèdent des gènes dits de « résistance » à une grande variété de pathogènes, tels des bactéries, virus, champignons, nématodes ou insectes (Nurnberger et al. 2004, Jones et al. 2004). En réponse au pathogène, différentes réactions sont mises en place comme la production de peptides antimicrobiens ou une forme de mort cellulaire programmée appelée réponse d'hypersensibilité (Innes 2004). Ainsi, dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, un des modèles pour l'étude génétique des plantes, on considère qu'1% du génome code pour ces gènes de résistance. Deux classes de

récepteurs ont évolué. Les kinases RLK (receptor-like kinases) présentes dans la membrane, comme le récepteur à la flagelline (FLS2), reconnaissent des motifs moléculaires associés aux microbes de manière analogue aux animaux (Gomez-Gomez et al. 2000). Un autre système plus spécifique est apparu chez les plantes sous la forme de protéines R qui reconnaissent en intracellulaire des protéines effectrices de pathogènes (Meyers et al. 2002). Ces gènes possèdent une structure particulière avec des domaines riches en leucine (LRR) que l'on retrouve chez la plupart des PRR.

La découverte de récepteurs analogues chez la drosophile a permis une grande avancée dans l'exploration de ces récepteurs. En effet, la description des voies activées par les pathogènes chez cette mouche a notamment permis de cloner le premier récepteur Toll-like (TLR) chez l'homme. *Toll* a été identifié à l'origine comme un récepteur transmembranaire impliqué dans l'établissement de la polarisation dorso-ventrale chez l'embryon (Hashimoto et al. 1988). Avec la découverte du récepteur humain à l'IL-1 ayant une structure homologue à Toll, il a été suggéré que ceux-ci pouvaient avoir des fonctions homologues. De plus, ils étaient tous deux capables d'induire NF- κ B *via* l'activation de kinases homologues (Belvin et al. 1996, Anderson 2000). L'analyse des régions promotrices des gènes codant pour les peptides antimicrobiens ont montré l'existence de séquences consensus comportant des domaines de liaison de NF- κ B (Engstrom et al. 1993). Etant donné que ces peptides étaient rapidement induits lors d'infections, ces observations ont suggéré que *Toll* pouvait être impliqué dans l'immunité de la drosophile. Ainsi, l'étude du mutant déficient pour *Toll* a confirmé que ce gène était impliqué dans l'immunité anti-fongique (Lemaitre et al. 1996). Ainsi, les voies de transduction induites en aval de *Toll* font intervenir un certain nombre de kinases et de protéines adaptatrices conduisant à l'activation de NF- κ B et à l'induction du gène de la drosomycine (Lemaitre et al. 1997). D'une façon intéressante, l'immunité de la drosophile bien qu'archaïque est finalement assez spécifique du pathogène rencontré. En effet, la réponse immunitaire est portée par une batterie de peptides antimicrobiens produits par le corps gras, un organe analogue au foie des mammifères. Ces peptides lysent les microorganismes en formant des pores dans leurs membranes. Ainsi, la drosomycine est le principal peptide anti-fongique, la diptéricine est plutôt active contre les bactéries à Gram négatif et la défensine contre les bactéries à Gram positif (Hoffmann et al. 1999). Les réponses induites lors d'une infection seront spécifiques du pathogène concerné et activeront la voie correspondante. Ainsi, la mutation de *Toll* ou d'une autre protéine de sa voie de signalisation résultera en une perte de l'induction de la drosomycine mais n'affectera pas la

production de la diptéricine (Lemaitre et al. 1997). Par ailleurs, la voie Toll peut également être activée par une infection par des bactéries à Gram positif mais la reconnaissance des PAMP intervient très probablement en amont de Toll (Imler et al. 2000). La drosophile comporte huit autres homologues de *Toll*, mais elle se défend contre les bactéries à Gram négatif en activant une seconde voie, qui a été définie grâce à l'étude du mutant *imd* (immune deficient) (Lemaitre et al. 1995). Ces mutants montraient une hypersensibilité aux bactéries à Gram négatif alors que leur immunité répondait bien aux infections fongiques et à Gram positif. Toute une voie de signalisation a été identifiée conduisant à l'expression de la diptéricine. Cependant, une des questions majeures concernant cette voie reste l'identification du ou des PRR contrôlant son activation. Toutes ces études sur la drosophile ont permis en très peu de temps une grande avancée des connaissances dans le domaine de l'immunité innée, et notamment dans l'étude des récepteurs Toll-like (TLR), dont le premier a été identifié peu de temps après *Toll*. C'est alors que l'étude de ces récepteurs dont l'existence avait depuis longtemps été soupçonnée prit son envol. Ainsi, renaissait l'ère de l'immunité innée longtemps laissée de côté au profit de l'adaptative grâce à cette mouche. On assiste depuis à une explosion dans le domaine avec des dizaines de publication par semaine sur les TLR et leur implication dans les réponses y compris pathologiques (Figure 2).

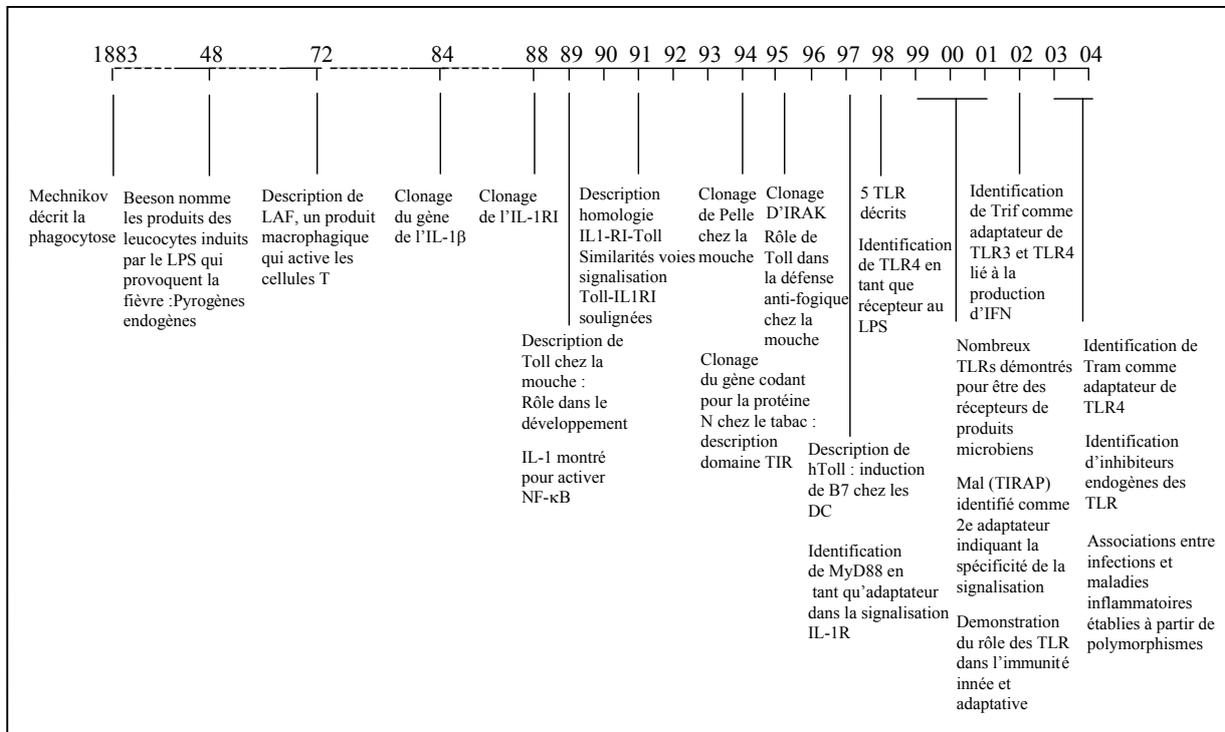


Figure 2 : Evolution de la recherche sur les récepteurs Toll-like (TLRs). Abréviations : DC, cellules dendritiques ; LAF, lymphocyte-activating factor ; TIRAP, Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor protein. D'après Luke A.J. O'Neill, *Trends in Immunology* 2004.

Depuis, on recherche ces récepteurs dans de nombreuses espèces d'intérêt. Ainsi, le moustique *Anopheles gambiae* en comporte dix. L'oursin de mer quant à lui aurait plus de 340 membres de la famille Toll participant à l'immunité. D'autres études ont identifié ces récepteurs chez le poisson zèbre, des bovins, des ovins, différentes espèces d'oiseaux et bien sûr l'homme et la souris, modèles d'étude privilégiés qui, eux, ne comportent qu'une dizaine de récepteurs Toll. Cependant, quelque soit l'espèce considérée, la structure générale de ces molécules a été hautement conservée par l'évolution montrant encore une fois leur rôle essentiel dans les réponses immunitaires.

B. LES PRR DES MAMMIFERES

Cependant, les TLR ne sont qu'une classe de PRR. D'autres molécules à la structure hautement conservée jouent un rôle dans la reconnaissance de ces pathogènes. Avant d'entrer dans le monde des TLR, arrêtons-nous pour faire un petit tour d'horizon de toutes ces autres molécules.

Plusieurs classifications des PRR existent mais j'ai choisi de présenter une organisation essentiellement basée sur leur structure et la présence de domaines conservés particuliers. Le point commun de ces récepteurs est de partager un domaine riche en leucine (LRR) qui est impliqué dans la reconnaissance des déterminants pathogéniques. Ainsi, la plupart des études s'accordent à classer ces récepteurs en trois groupes :

- _ les PRR à domaine CARD (Caspase Recruitment Domain)
- _ les PRR à domaine PYRIN
- _ les PRR à domaine TIR (Toll-IL-1 Related Domain)

En plus de leur structure particulière, ces trois groupes se différencient également par leur localisation subcellulaire. Ainsi, les récepteurs à domaine CARD et PYRIN sont présents dans le cytoplasme alors que les PRR à domaine TIR sont plutôt dans la membrane des cellules ou des endosomes (Werts et al. 2006) (Figure 3).

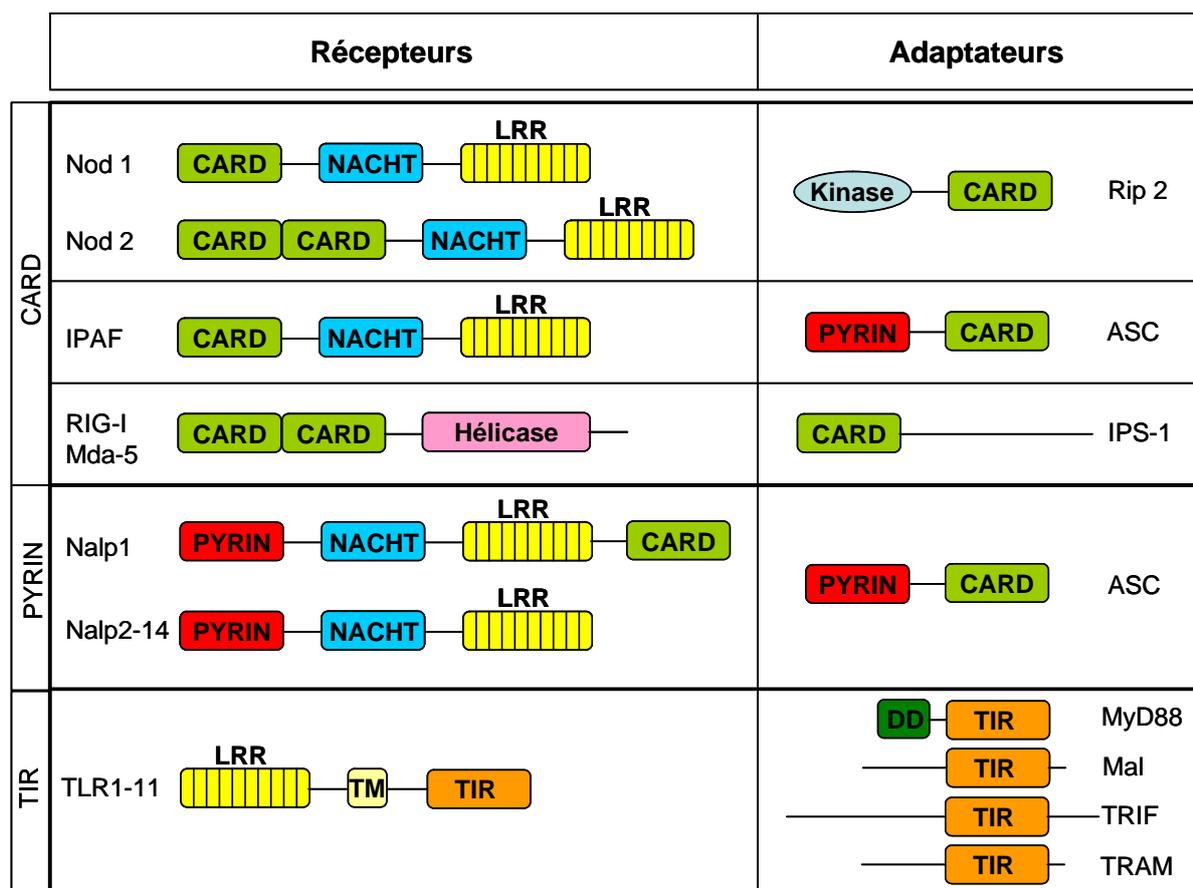


Figure 3 : Représentation schématique des récepteurs de l'immunité innée et des protéines adaptatrices comportant des domaines CARD, PYRIN et TIR. Abréviations : CARD, Caspase recruitment domain ; LRR, Leucine rich repeat ; TIR, Toll-IL-1 related domain ; TM, domaine transmembranaire ; DD, Death domain. D'après C. Werts *et al.* *Cell death and differentiation* 2006.

a) Les PRR à domaine CARD

Depuis la découverte des TLR, les connaissances en immunité innée ont beaucoup progressé et d'autres récepteurs détectant les pathogènes ont été découverts. Cette première famille comporte deux sous-groupes de récepteurs. Tout d'abord, les protéines cytosoliques Nod1 et Nod2 qui partagent le domaine CARD avec d'autres membres de la famille NACHT-LRR comme NAIP, CIITA, HET-E et TP-1. Puis, plus récemment, les hélicases RIG-I et Mda-5 dont l'activation conduit à la production des IFN de type I impliqués dans l'élimination des virus.

① Les protéines Nod

Les premiers récepteurs cytosoliques reconnaissant des PAMP découverts étaient les protéines Nod1 et Nod2 de la famille NACHT-LRR. Ces molécules sont constituées d'un domaine CARD pour Nod1 et de deux pour Nod2 en N-terminal impliqué dans la signalisation, une région NACHT permettant la liaison de nucléotides et l'oligomérisation et

un domaine LRR en C-terminal reconnaissant les ligands (Kufner et al. 2005). Ces molécules reconnaissent une structure conservée de la paroi bactérienne qu'est le peptidoglycane (PG). A l'origine, ce composé avait été décrit en tant qu'agoniste TLR2, mais il s'est avéré que le véritable agoniste de ce récepteur était un contaminant des préparations biologiques, l'acide lipotéicoïque (Travassos et al. 2004). En fait, les vrais récepteurs du PG sont les protéines Nod (Girardin et al. 2003b, Girardin et al. 2003a, Inohara et al. 2003, Chamailard et al. 2003). Cependant, cette question reste controversée.

La structure du PG est complexe. Il s'agit d'un polymère de chaînes de carbohydrates alternées de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique reliées par des petits peptides. La nature de ces derniers apporte la variabilité entre les différents peptidoglycans. En fait, les protéines Nod détectent des monomères muramiques relargués par le peptidoglycane. Ainsi, Nod2 reconnaît le MDP (muramyl dipeptide) des bactéries à Gram positif et négatif, le plus petit motif commun à tous les PG (Girardin et al. 2003b, Inohara et al. 2003). Nod1, quant à lui est plus spécifique et ne reconnaît qu'un type de PG comportant de l'acide meso-diaminopimélique (DAP), porté par la majorité des bactéries à Gram négatif (Girardin et al. 2003a).

Les molécules Nod ont été montrées comme jouant un rôle dans la défense de l'hôte en réponse à différents pathogènes. Ainsi, Nod1 est impliqué dans l'immunité contre *Shigella flexneri* (Girardin et al. 2001), *Escherichia coli* entéroinvasive (Kim et al. 2004a), *Pseudomonas aeruginosa* (Travassos et al. 2005), *Chlamydia pneumoniae* (Opitz et al. 2005) et *Helicobacter pylori* (Viala et al. 2004). Nod2 est impliqué dans la défense contre *Streptococcus pneumoniae* (Opitz et al. 2004) et *Mycobacteria* (Ferwerda et al. 2005).

Après la reconnaissance du pathogène, des voies de signalisation sont activées conduisant à l'induction de NF- κ B, de JNK et à la production de cytokines inflammatoires. N'ayant pas d'activité enzymatique intrinsèque, ces récepteurs vont utiliser des adaptateurs qui comportent également des domaines CARD. La reconnaissance du ligand induit l'homooligomérisation de la molécule Nod via le domaine NACHT permettant ensuite le recrutement par le domaine CARD de l'adaptateur RIP-2 (RICK/CARDIAK) et l'activation de NF- κ B (Kobayashi et al. 2002). Nod1 et Nod2 ont également été montrés pour interagir avec le domaine CARD de la caspase-9 en augmentant l'apoptose induite par cette dernière (Inohara et al. 1999). Nod1 interagit aussi avec la procaspase-1 augmentant ainsi son oligomérisation et son activation qui permet la maturation et la sécrétion de l'IL-1 (Yoo et al. 2002). Les voies de signalisation en aval de Nod sont actuellement à l'étude et de nombreuses molécules intervenant commencent à être connues.

L'importance de ces protéines a été montrée par leur implication dans différents syndromes chez l'homme. Ainsi, des mutations de Nod2 ont été associées à différents désordres granulomateux inflammatoires sévères tels la maladie de Crohn, le syndrome de Blau et la sarcoïdose. L'association Nod2-maladie de Crohn est de loin la plus connue et la plus étudiée. Ainsi, trois mutations majeures ont été identifiées dans la région LRR de Nod2 (R702W, G908R et L1007fsinsC) (Hugot et al. 2001). Cependant, ces mutations n'ont été associées qu'à un risque accru de maladie du greffon contre l'hôte et de complications suite à la greffe allogénique de cellules souches. Des mutations dans le domaine central NACHT de Nod2 ont été associées au syndrome de Blau et à la sarcoïdose (Miceli-Richard et al. 2001).

Un polymorphisme de Nod1 a été relié à une prédisposition génétique à l'IBD (inflammatory bowel disease), à l'asthme et à l'eczéma atopique (McGovern et al. 2005, Hysi et al. 2005, Weidinger et al. 2005).

② *Ipaf*

C'est un autre membre de la famille NACHT-LRR qui possède la même structure que Nod1. Il est principalement exprimé dans les cellules myéloïdes. Avec la protéine adaptatrice ASC (apoptosis-associated speck-like) comportant également un domaine CARD, il a été associé à la régulation de la caspase-1 dans l'inflammasome permettant la maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β . Il est essentiel pour l'activation de la caspase-1 en réponse à l'infection de macrophages par *Salmonella typhimurium* (Mariathasan et al. 2004). Cependant son ligand reste à ce jour inconnu.

Peu d'éléments sont connus sur les voies de signalisation en aval d'Ipaf mais on sait qu'il interagit avec le domaine CARD de la procaspase-1 permettant la maturation de la pro-IL-1 β .

③ *Hélicases*

Les virus sont reconnus par les cellules immunitaires *via* la structure de leurs protéines, leur ADN faiblement méthylé et leurs ARN simple ou double-brin (respectivement ARNsb et ARNdb). L'ARNdb est un PAMP très important car il est la preuve de la répllication intracellulaire de nombreux virus. Le premier récepteur intracellulaire cloné reconnaissant ces ARN était le PKR (dsRNA-dependent serine threonine protein kinase) impliqué dans le contrôle de la répllication virale par inhibition de la transcription chez l'hôte. Puis vint TLR3 mais nous y reviendrons plus tard. Ces deux types de réponses conduisent à une production massive d'IFN de type I. C'est en étudiant cette production, qu'une équipe a proposé l'existence d'une nouvelle voie inductrice d'IFN qui n'était ni TLR, ni PKR-

dépendante (Diebold et al. 2003). Suite à ces travaux, de nouvelles molécules intervenant dans ces réponses ont été clonées.

Il s'agit des hélicases RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) et mda-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) aussi connue sous le nom d'Helicard (Yoneyama et al. 2004, Kang et al. 2004). Chaque protéine comporte deux copies de CARD et un domaine hélicase qui reconnaît les ARNdb et régule la transduction du signal d'une manière dépendante de l'ATP (Kang et al. 2004). RIG-I, Mda-5 et LPG2, un autre membre de cette famille mais sans domaine CARD, sont des protéines cytosoliques inductibles par l'IFN- β (Yoneyama et al. 2005). Le rôle de RIG-I a été démontré en utilisant des cellules fibroblastiques embryonnaires murines déficientes pour cette molécule qui ne répondaient plus aux virus à ARN, tels les virus de la stomatite vésiculaire, de Newcastle et Sendai (Kato et al. 2005). Mda-5 a été initialement identifié comme une molécule ayant des propriétés suppressives de la croissance des mélanomes et potentiellement impliquée dans l'apoptose (Kang et al. 2004). Il a ensuite été découvert que mda-5 se liait à la protéine V des paramyxovirus comme le Sendai et que cette interaction provoquait l'inhibition de la production d'IFN- β (Yoneyama et al. 2005, Andrejeva et al. 2004). Ces actions sont bien sûr régulées notamment par LPG2 qui agit comme un régulateur négatif en séquestrant les ARNdb, empêchant ainsi leur interaction avec RIG-I ou mda-5 (Rothenfusser et al. 2005).

L'activation de RIG-I et de mda-5 par les ARNdb conduit à l'activation de NF- κ B et d'IRF3 (IFN-responding factor 3), facteur de transcription permettant l'induction des IFN de type I. Comme pour tous ces PRR, RIG-I ne déroge pas à la règle de la nécessité d'avoir des adaptateurs pour activer les voies de signalisation. Ainsi, IPS-1 (IFN- β promotor stimulator-1) (Kawai et al. 2005), également appelé MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein) (Seth et al. 2005), CARDIF (Meylan et al. 2005) ou VISA (virus-induced signaling adaptator) joue ce rôle (Xu et al. 2005). La surexpression de cet adaptateur induit la production d'IFN de type I *via* IRF3, IRF7 et NF- κ B. Les voies de signalisation en aval commencent à être bien décrites et font intervenir de nombreuses protéines.

b) Les PRR à domaine PYRIN

Le premier membre de cette famille à avoir été identifié était la Pyrine, molécule dont le gène est muté dans les familles atteintes par la fièvre méditerranéenne congénitale, syndrome autoinflammatoire héréditaire (Hoffman et al. 2001). Une équipe a généré une souris exprimant une pyrine tronquée mais avec son domaine PYRIN intact. D'une manière

intéressante, ces souris se sont révélées être hypersensibles au choc endotoxique et leurs macrophages produisaient de fortes quantités d'IL-1 β en réponse au LPS. Ainsi, les auteurs ont identifié la pyrine comme étant un inhibiteur de la voie caspase-1/IL-1 β (Chae et al. 2003).

Les molécules Nalp, aussi connues sous le nom de Pypafs appartiennent à cette famille et comportent un domaine PYRIN en N-terminal et une région NACHT centrale flanquée d'un domaine LRR en C-terminal. Le génome humain comporte 14 Nalps qui partagent la même structure sauf Nalp1 qui possède également un domaine CARD en C-terminal. Ces molécules sont cytosoliques et, à cause de leur structure similaire à Nod1/Nod2, ont été classées dans la famille NACHT-LRR, ou NLR. Pour la plupart d'entre elles, leur fonction reste inconnue. Seuls Nalp6 (Pypaf5) et Nalp12 (Pypaf7 ou Monarch-1) ont été montrés pour activer NF-kB (Grenier et al. 2002, Wang et al. 2002a). Nalp1 est capable d'induire l'activation de la caspase-1 et -5 en collaboration avec la protéine adaptatrice ASC (Martinon et al. 2002). Il semblerait que les Nalp soient des régulateurs clés de l'activation de la caspase 1 qui régule le relargage de l'IL-1 β , cytokine importante dans les processus inflammatoires.

Le rôle crucial des Nalp dans l'inflammation a été souligné par l'identification de mutations de Nalp3 dans le domaine NACHT associées au développement de désordres inflammatoires sévères comme le syndrome Muckle-Wells, le FCAS (familial cold autoinflammatory syndrome) et la maladie infantile neurologique, cutanée et articulaire (Neven et al. 2004).

Le troisième groupe de PRR dans notre classification correspond aux récepteurs à domaine TIR dont les TLR font partie et qui feront l'objet du prochain chapitre. Cependant, d'autres molécules non classiquement reconnues parmi les PRR jouent également un rôle dans la reconnaissance des pathogènes.

c) Les récepteurs non PRR

Toutes ces précédentes molécules jouaient un rôle dans la détection des pathogènes mais ce signal va souvent être relayé par d'autres récepteurs présents majoritairement à la surface des cellules présentatrices d'antigène qui sont également impliqués dans les phases d'internalisation et de présentation antigénique.

C'est pourquoi, un groupe a récemment proposé une nouvelle classification des PRR beaucoup plus large que celle indiquée précédemment en prenant en compte leur rôle dans la

présentation antigénique et l'immunité des cellules T (Padovan et al. 2007). En effet, les PRR sont portés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et au cours d'une réponse immune, c'est leur activation qui conditionne l'internalisation des antigènes, leur apprêtement et leur présentation aux lymphocytes T. Ainsi, ils proposent trois groupes de PRR :

- _ Les PRR « opsoniques » impliqués dans l'opsonisation des cellules ou produits microbiens qui facilite leur phagocytose et leur destruction. Ce sont des récepteurs solubles sécrétés dans le sérum et dans les fluides entourant les tissus. Les collectines et les pentraxines appartiennent à cette famille qui initie la réponse antimicrobienne et inflammatoire et peut influencer les réponses T (Garlanda et al. 2002, Ogden et al. 2001).
- _ Les PRR « phagocytiques » impliqués dans l'internalisation des microbes et de produits microbiens isolés. Il s'agit de protéines liées à la membrane comprenant les lectines de type C, les intégrines et les récepteurs Scavenger.
- _ Les PRR « instructeurs » apportant un signal à la CPA qui régule sa capacité à déclencher des réponses cellulaires T. Cette famille comporte les TLR et les NACHT-LRR.

Voici quelques exemples de récepteurs reconnaissant des structures de pathogènes.

① *Les récepteurs aux lectines de type C (CLR)*

Ces récepteurs reconnaissent des structures spécifiques de sucres sur les antigènes du soi ou sur les composés de la paroi des pathogènes. Leur principale fonction est d'internaliser les antigènes en vue de les dégrader dans les lysosomes afin de les présenter (Figdor et al. 2002). De nombreux CLR sont exprimés par les DC dérivées de monocytes immatures comme le récepteur au mannose (MR), DEC-205, DC-SIGN, BDCA-2, Dectin-1, DCIR, DCAL-1, C-LEC et DC-ASGPR (Figdor et al. 2002). Par contre, peu d'entre eux ont été identifiés sur les DC du sang ou les cellules de Langerhans. Leur expression est vraiment fonction de la sous-population cellulaire et de leur localisation. Cependant, ils sont fortement exprimés par les DC immatures ayant une forte capacité d'internalisation et d'apprêtement antigénique et leur expression décroît avec la maturation.

La reconnaissance du ligand se fait par un domaine CRD (carbohydrate recognition domain) (Weis et al. 1998). En fonction de la séquence d'acides aminés, ce domaine lie le mannose, le galactose ou le fucose. Plusieurs CLR ont été décrits comme étant capables de lier des pathogènes. Ainsi, DC-SIGN a été impliqué dans la reconnaissance d'une lectine de type C de l'enveloppe du VIH-1 (Curtis et al. 1992, Geijtenbeek et al. 2000). Puis, il a été

démonstré que ce récepteur reconnaissait VIH-1, VIH-2, l'équivalent simien (SIV) mais aussi le virus Ebola, le cytomégalovirus, le virus de l'hépatite C et le virus de la Dengue (Lee et al. 2001, Navarro-Sanchez et al. 2003, Gardner et al. 2003, Simmons et al. 2003, Halary et al. 2002). En fait, DC-SIGN reconnaît des glycoprotéines de l'enveloppe virale qui contiennent de nombreux sucres. D'autres pathogènes non viraux interagissent également avec DC-SIGN. Ainsi, *Helicobacter pylori* et *Klebsiella pneumoniae* se lient à DC-SIGN (Appelmelk et al. 2003) mais également *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania amastigotes*, *Schistosoma mansoni* et *Candida albicans* (Maeda et al. 2003, Colmenares et al. 2002, Cambi et al. 2003).

② Les récepteurs Scavenger

Le récepteur Scavenger (SR-A I/II) a initialement été identifié comme un récepteur pour les lipoprotéines modifiées de faible densité, les LDL acétylés mais aussi le lipide A (Krieger 1997). Il comporte un domaine riche en cystéine (SRCR) qui serait responsable de la liaison du ligand. Il est présent à la surface des macrophages et de certaines sous-populations de DC. Le récepteur MARCO, quant à lui est porté par les cellules dendritiques et les macrophages et se lie à une grande variété de bactéries à Gram positif et négatif (Kraal et al. 2000). Le CD36 est exprimé par les monocytes, macrophages, plaquettes et certains endothéliums et reconnaît les LDL oxydés et les cellules apoptotiques.

Un récepteur particulièrement intéressant appartenant à cette famille est le CD14. Il a été montré comme intervenant dans la signalisation du LPS en lien avec TLR4. Il s'agit d'une molécule de surface ancrée à la membrane par un glycolipide phosphatidylinositol (GPI). Ce type de protéine serait plutôt localisé dans des domaines enrichis en cholestérol (lipid rafts) des membranes cellulaires. Cette propriété lui confère certaines fonctions biologiques importantes. Le CD14 est majoritairement exprimé par les cellules du lignage myéloïde incluant les monocytes, macrophages et granulocytes. Il a été identifié en tant que récepteur au LPS car la présence d'un anticorps anti-CD14 inhibait la liaison du complexe LPS-LBP (LPS-binding protein) aux macrophages (Wright et al. 1990). Par ailleurs, l'expression du CD14 par des cellules CD14-négatives les rendaient sensibles au LPS (Lee et al. 1992). Au fil du temps, d'autres ligands furent identifiés pour CD14, tels l'acide lipotéicoïque, le peptidoglycane et les cellules apoptotiques. Etant donné que CD14 ne comporte pas de domaine transmembranaire mais seulement une ancre GPI, des molécules accessoires sont nécessaires pour la transduction du signal. Ainsi, TLR4 et TLR2 ont été identifiés comme corécepteurs de CD14 pour certains ligands microbiens (Triantafilou et al. 2002). Le domaine extracellulaire du CD14 contient des domaines LRR et la portion N-terminale est importante

pour la liaison au LPS et l'interaction avec des récepteurs accessoires (Ferrero et al. 1990, Juan et al. 1995). Une forme soluble de ce récepteur (sCD14) a originellement été décrite dans des monocytes sous le nom d'antigène MY-4 (Bazil et al. 1986). Cette forme est très importante car elle permet une signalisation du LPS en l'absence de forme membranaire. De plus, il a été montré que le TNF- α et le LPS induisaient le relargage de sCD14 alors que l'IL-4 et l'IFN- γ l'inhibaient. Chez les patients avec choc septique, la quantité de sCD14 sérique est augmentée et a été corrélée avec la mortalité (Landmann et al. 1995).

Voici quelques exemples de récepteurs impliqués dans la détection de pathogène. Cependant, les cellules présentatrices de l'antigène comportent des dizaines de molécules semblables qui ont toutes au moins été décrites pour reconnaître tel ou tel microbe. Ainsi, lors de l'introduction d'un pathogène, le système immunitaire déploie une batterie de molécules chargées de reconnaître, de marquer et d'internaliser des antigènes appartenant à ce microorganisme. C'est pourquoi, ces récepteurs sont souvent localisés au même endroit permettant une coopération pour détruire le pathogène. Bien que très intéressantes, ces interactions sont complexes et leur mise en œuvre est souvent fonction du type de microbe. Ainsi, dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur le premier signal qui est la reconnaissance d'une ou plusieurs structures pathogènes, par les récepteurs Toll-like qui sont maîtres en la matière.

3. LES RÉCEPTEURS TOLL-LIKE (TLR)

L'immunobiologie des TLR est actuellement un des domaines de recherche les plus « à la mode » en immunologie. La description des TLR a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années. Il en ressort qu'ils sont désormais considérés comme des régulateurs clés assurant un lien entre immunité innée et adaptative. Treize TLR ont pour l'instant été identifiés chez les mammifères dont dix sont exprimés chez l'homme. Leur découverte est liée, comme je le précisais dans un chapitre antérieur, à celle du récepteur Toll chez la drosophile, d'où leur nom.

A. QUELQUES RECEPTEURS, DE MULTIPLES AGONISTES, UNE DETECTION EFFICACE

Bien que l'homme ne possède qu'une dizaine de TLR, ces derniers sont très performants et reconnaissent des microorganismes de toute origine : bactérienne, virale, fongique. De nombreux agonistes des TLR, à la fois endogènes et exogènes, ont été identifiés

au cours des dernières années. Ces molécules proviennent de microbes mais pour certains, plusieurs structures synthétiques ont pu être décrites comme agonistes. L'avantage de ces dernières est qu'elles peuvent avoir un pouvoir immunogène sans nécessairement être délétères pour l'hôte comme peut l'être un pathogène.

a) Un domaine de reconnaissance conservé

Comme les autres PRR, les TLR présentent une structure particulière très conservée par l'évolution en lien avec leur fonction. Il s'agit de glycoprotéines de type I intégrées à la membrane avec un domaine extracellulaire LRR et un domaine cytoplasmique TIR. Le domaine extracellulaire interagit avec la structure microbienne et induit l'oligomérisation des récepteurs. Les domaines TIR, quant à eux participent au recrutement de molécules adaptatrices qui initient la signalisation.

Les domaines extracellulaires des TLR comportent 19 à 25 motifs LRR. La cristallisation de ce domaine pour le récepteur TLR3 a révélé une structure solénoïde en forme de fer à cheval (Choe et al. 2005). Les auteurs de ce travail ont été surpris d'apprendre que la liaison de l'agoniste ne se faisait pas dans la partie concave du fer à cheval car la majeure partie de ce domaine était recouverte de carbohydrates. Il semblerait donc que le seul endroit pour l'interaction récepteur-ligand ou récepteur-corécepteur soit situé sur une des faces du récepteur dépourvu de glycosylation. Cette structure serait commune à tous les TLR (Figure 4).

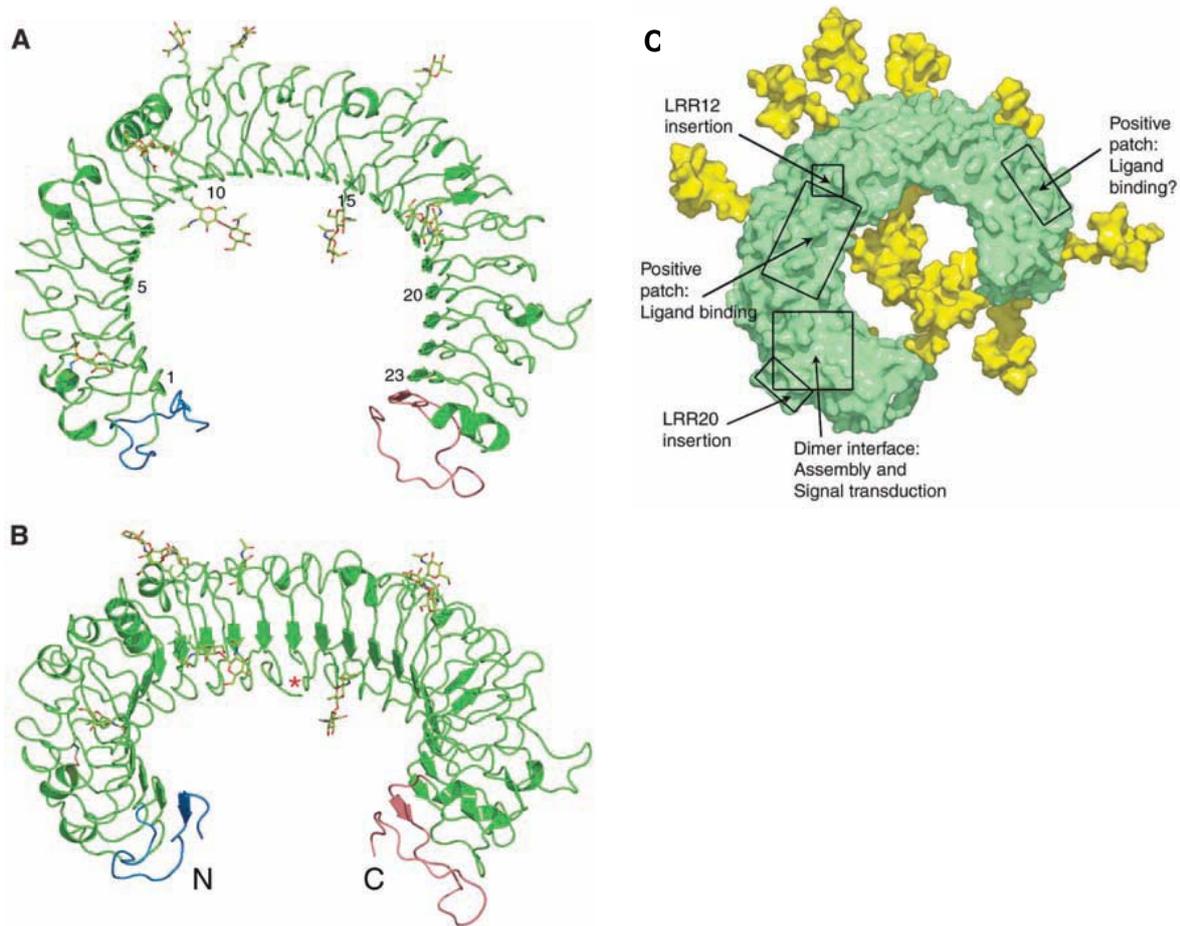


Figure 4 : Architecture du domaine extracellulaire de TLR3. La région N-terminale est colorée en bleu, les 23 LRR en vert et la région C-terminale en rose. Les N-acétylglucosamines sont représentés en version éclatée attachées par leurs résidus Asn respectifs. (A) Vue de côté de TLR3 avec la face convexe orientée vers l'arrière et la concave vers l'avant. (B) Rotation de 45° par rapport à A. (C) Sites fonctionnels potentiels à la surface de TLR3 (en vert) avec la position des sucres de type oligomannose (en jaune). D'après Choe *et al. Science* 2005.

La donnée manquante reste la cocrystallisation du récepteur et de son agoniste. Cependant, il n'existe que peu de cas où il y a liaison directe de l'agoniste à son récepteur. C'est pourquoi, souvent, on ne nomme pas ces structures ligands des TLR. En effet, par définition, le mot « ligand » implique une interaction directe, or tout ce que nous savons de ces structures, c'est qu'elles activent les TLR en induisant une signalisation et que lorsque ces derniers sont absents, le signal est interrompu. C'est pourquoi le terme d'agoniste reste pour le moment plus approprié. Dans de nombreux cas, la présence de corécepteurs est essentielle à l'induction d'une réponse, en faisant un lien entre la molécule microbienne et le récepteur. Ainsi, dans le cas de TLR4, la molécule MD2 interagit directement avec le LPS et transduit le signal par des mécanismes encore peu élucidés à TLR4 (Saitoh *et al.* 2004). Par contre, TLR5 lie directement la flagelline *via* un domaine particulier de cette dernière (Smith *et al.* 2003).

De la même façon, TLR9 interagit directement avec son ligand, les oligonucléotides CpG (Cornelie et al. 2004).

b) Une large gamme d'agonistes

En effet, les agonistes des TLR s'avèrent être d'une nature très variée, mais les structures reconnues sont des éléments microbiens fortement conservés par l'évolution qui n'existent pas parmi les molécules du soi (Figure 5).

Nom	Localisation	Ligand	Origine	Agonistes synthétiques		
TLR2	Surface cellulaire, phagosomes, appareil de Golgi	Osp-A ^a	<i>Borrelia burgdorferi</i>	P ₃ CSK ₄		
		19K, LAM, LprG, PIM	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	N.d.		
		19K, 33K	<i>Mycobacterium leprae</i>	P ₃ CSGGTQ, P ₃ CLPAWK		
		OmpA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N.d.		
		PGN polymérique, LTA	<i>Staphylococcus aureus</i>	N.d.		
		Pneumolysine	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	N.d.		
		Moduline	<i>Staphylococcus epidermis</i>	N.d.		
		MALP-2 ^b	<i>Mycoplasma fermentans, Mycoplasma pneumoniae</i>	P ₂ CGNNDENISFKEK		
		LAMPs ^{a,b}	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	N.d.		
		ancres GPI, GPLs	<i>Treponema maltophilum, Trypanosoma cruzi, Plasmodium falciparum</i>	N.d.		
		Lipopolysaccharide, Lipide A	<i>Pseudomonas aeruginosa, Chlamydia trachomatis, Leptospira interrogans, Bacteroides fragilis, Legionella pneumophila, Rhizobium spp.</i>	N.d.		
		Porin B	<i>Neisseria meningitidis</i>	N.d.		
		HSP60, HP-NAP	Mammifères, <i>Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori</i>	N.d.		
		LcrV	<i>Yersinia spp.</i>	VLEELVQLVKDKKIDISIK		
		Hemagglutinine	virus de la rougeole	N.d.		
N.d.	<i>HSV-1</i>	N.d.				
TLR3	Intracellulaire	N.d.	N.d.	Poly (I:C), Poly(I)		
TLR4	Surface cellulaire, phagosomes, appareil de Golgi	Lipopolysaccharide, Lipide A	<i>Escherichia coli, Salmonella minnesota, Neisseria meningitidis, Yersinia pestis</i>	MPL, AGPs, ER-112022		
		HSP60	<i>Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori</i>	N.d.		
		protéine F	RSV	N.d.		
		Env	MMTV	N.d.		
		Défensine- α , HA, HSP60, HS, HSP70, Gp96, TypeIIIIFA, fibrinogène	Mammifères	N.d.		
		Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>	N.d.		
		Flagelline	<i>Salmonella typhimurium</i>	N.d.		
		TLR5	Surface cellulaire			
		TLR7	Intracellulaire	ARNsb riche en U ^c , snRNP	Virus de la stomatite vésiculaire, virus de la grippe, HIV-1	R-848, Loxoribine, SM360320, Bropirimine, 3M-012
		TLR8 ^d	Intracellulaire	ARNsb riche en U ^c , snRNP	Virus de la stomatite vésiculaire, virus de la grippe, HIV-1	R-848, Imiquimod, 3M-002, 3M012
TLR9	Réticulum endoplasmique	ADN	Mammifères, HSV-2, MCMV	ODN CpG		
		Hemozoine	<i>Plasmodium falciparum</i>	N.d.		
TLR10 ^d	Inconnu	N.d.	N.d.	N.d.		
TLR11 ^e	Inconnu	N.d.	<i>Escherichia coli</i> uropathogène	N.d.		
		Protéine type profiline	<i>Toxoplasma gondii</i>	N.d.		

Figure 5 : Agonistes des TLR. Abréviations : AGP, aminoalkyl glucosaminide 4-phosphatase ; GPI, glycosylphosphatidylinositol ; GPLs, glycoinositolphospholipids ; HA, hyaluronan ; HS, heparan sulfate ; HSP, heat shock protein ; LAM, lipoarabinomannan ; LcrV, low calcium response protein V ; MLP, monophosphoryl lipid A ; ODN, oligodeoxynucleotides ; OmpA, outer membrane protein A ; OspA, outer surface protein A ; P_{2/3}X, di/tri-palmitoyl-S-glycerylcysteine ; PGN, peptidoglycan ; n.d., non défini ; PIM, mannosylated phosphatidylinositol ; poly(I:C), poly(inosinic:polycytidylic) acid ; R-848, resiquimod ; dsRNA, double-stranded RNA ; ssRNA, single-stranded RNA ; snRNPs, small nuclear ribonucleoproteins ; TypeIIIIFA, type III repeat extra domain A of fibronectin.

^a Requiert un hétérodimère TLR1-TLR2. ^b Requiert un hétérodimère TLR2-TLR6. ^c Agoniste pour TLR7 murin et TLR8 humain seulement. ^d Non fonctionnel chez la souris. ^e Non fonctionnel chez l'homme. D'après Padovan *et al. Trends in immunology* 2007.

① *TLR4 à l'origine de la recherche sur les TLR des mammifères*

En 1998, suite à la découverte du rôle de Toll dans l'immunité chez la drosophile, le récepteur TLR4 fut cloné. Deux souches de souris (C3H/HeJ et C57BL10/ScCr) étaient connues depuis longtemps comme ne répondant pas au lipopolysaccharide (LPS). Deux groupes indépendants cherchant les gènes responsables de ce manque de sensibilité ont mis en évidence dans ces deux lignées des mutations du gène codant pour TLR4 (Poltorak et al. 1998, Qureshi et al. 1999). La lignée C3H/HeJ possédait une mutation ponctuelle dans la région intracellulaire de TLR4 conduisant à la substitution d'une proline en histidine et provoquant un défaut dans la signalisation du récepteur (Hoshino et al. 1999). Par contre, la deuxième souche C57BL10/ScCr possédait une mutation non-sens conduisant à un codon stop précoce et à une protéine tronquée. De la même façon, des souris déficientes pour TLR4 générées par recombinaison homologue sont venues confirmer que TLR4 était bien le récepteur du LPS (Hoshino et al. 1999). Cependant, la reconnaissance du LPS nécessite d'autres molécules accessoires. Ainsi, il se lie à la LPS-binding protein (LBP), présente dans le sérum et ce complexe LPS-LBP est ensuite reconnu par le CD14, préférentiellement exprimé par les monocytes/macrophages et les neutrophiles. Le CD14 se rapproche ensuite physiquement de TLR4, suggérant une interaction avec ce dernier et une signalisation en réponse au LPS (Jiang et al. 2000, da Silva et al. 2001). La liaison directe TLR4-LPS n'est absolument pas attestée. Dans ce complexe de protéines, MD-2 a été identifiée comme se liant avec la portion extracellulaire de TLR4 en augmentant la sensibilité au LPS (Shimazu et al. 1999, Akashi et al. 2000). En fait, MD-2 s'associe dès le réticulum endoplasmique avec TLR4 et ce complexe est ensuite transporté vers la membrane (Visintin et al. 2001). D'ailleurs MD-2 est essentiel à l'export de TLR4 à la membrane (Nagai et al. 2002). TLR4 est un récepteur essentiel pour le LPS, cependant, différentes études ont reporté que ce dernier pouvait être reconnu indépendamment de TLR4, notamment par d'autres PRR.

TLR4 a par la suite été associé à d'autres agonistes comme le taxol provenant de *Taxus brevifolia* ayant des activités anti-tumorales chez l'homme. L'action anti-mitotique de ce dernier est due à sa capacité à lier et à stabiliser les microtubules, empêchant ainsi la division cellulaire. Le taxol possède des activités immunostimulatrices similaires à celles du LPS chez la souris mais pas chez l'homme (Byrd-Leifer et al. 2001). Depuis, de nombreux autres agonistes ont été identifiés comme des protéines virales.

TLR4 reste donc le premier récepteur à avoir été identifié et l'un des plus étudié car lié à la reconnaissance des endotoxines, composants majeurs des bactéries à Gram négatif. Mais

d'autres récepteurs ont par la suite été découverts et sont venus compléter la gamme de reconnaissance.

② *La reconnaissance de protéines ou de sucres microbiens*

Parmi les récepteurs reconnaissant des motifs de pathogènes, TLR2 est la molécule reconnaissant le plus grand nombre de structures. Cette liste inclut entre autres le peptidoglycane (Takeuchi et al. 1999a, Schwandner et al. 1999), des lipoprotéines bactériennes (Aliprantis et al. 1999, Brightbill et al. 1999, Takeuchi et al. 2000a), une protéine de la membrane de *Klebsiella pneumoniae* (OmpA ou P40) (Jeannin et al. 2002), des LPS non « classiques » de *Porphyromonas gingivitis* (Hirschfeld et al. 2001) et *Leptospira interrogans* (Werts et al. 2001), des lipides GPI de *Trypanosoma cruzi* (Campos et al. 2001) et le zymosan, composé de la paroi des levures (Underhill et al. 1999).

Une des explications pour la large gamme de molécules reconnues est que TLR2 s'hétérodimérise avec les récepteurs TLR1 ou TLR6 (Ozinsky et al. 2000, Takeuchi et al. 2001). Le rôle de TLR6 a été analysé en introduisant une forme dominant négatif dans la lignée macrophagique RAW264.7. Le peptidoglycane et la moduline sécrétée par *Staphylococcus aureus* sont des agonistes de TLR2 qui induisent la production de TNF- α par cette lignée qui est supprimée lors de la présence de dominants négatifs de TLR6 (Hajjar et al. 2001, Ozinsky et al. 2000). TLR2 et 6 co-immunoprécipitent, suggérant une interaction physique à la membrane (Ozinsky et al. 2000). L'analyse de souris déficientes pour TLR6 a montré une coopération avec TLR2 pour la reconnaissance des lipoprotéines bactériennes (Takeuchi et al. 2001). Ainsi, les lipoprotéines comportant un résidu cystéine en N-terminal diacétylé, comme le MALP-2 sont reconnues par le couple TLR2/TLR6. Par contre, TLR1 est spécialisé dans la détection des lipoprotéines triacétylées (Takeuchi et al. 2002).

TLR5 est également impliqué dans la reconnaissance de protéines microbiennes mais un seul ligand a été identifié jusqu'à présent. Ainsi, les cellules ovariennes de hamster chinois exprimant la forme humaine de TLR5 ont été montrées sensibles aux surnageants de culture de *Listeria monocytogenes*. La purification des ces surnageants a donné lieu à l'identification de la flagelline, une sous-unité protéique du flagelle bactérien, comme agoniste de ce récepteur (Hayashi et al. 2001). Cette structure est très conservée aux extrémités N- et C-terminales qui forment un domaine hydrophobe reconnu par TLR5 (Eaves-Pyles et al. 2001).

TLR11 a récemment été décrit comme détectant une protéine analogue à la profiline provenant de *Toxoplasma gondii* (Yarovinsky et al. 2005). Cette protéine fait partie d'une famille de molécules se liant à l'actine qui joue un rôle dans sa polymérisation. La profiline

est également présente chez des protozoaires, dont l'agent de la malaria. Il pourrait être intéressant de voir si ce récepteur peut reconnaître d'autres parasites. Cependant, ce dernier n'est présent que chez la souris et non chez l'homme. Il a également été associé à la reconnaissance d'*Escherichia coli* uropathogènes bien que l'agoniste demeure encore inconnu. En effet, les souris déficientes pour TLR11 sont très sensibles aux infections rénales induites par ces bactéries (Zhang et al. 2004). La relevance physiologique de ce phénomène demeure inconnue, cependant l'absence de TLR11 chez l'homme pourrait favoriser les infections avec les *E. coli* uropathogènes.

③ *La reconnaissance des acides nucléiques*

Ces récepteurs sont particuliers parmi les TLR car ils reconnaissent des acides nucléiques à la fois bactériens et viraux. Ils se différencient également des autres TLR par leur localisation subcellulaire. A l'inverse des autres récepteurs qui sont plutôt exprimés à la membrane plasmique, ceux-ci sont intracellulaires, à la membrane des endosomes, reconnaissant des agonistes présents dans la cellule. Cette localisation est en rapport avec leur fonction car les acides nucléiques sont rarement présents libres dans le milieu extracellulaire mais sont souvent compartimentés et relargués lors de la prise du pathogène pendant la phagocytose.

Ainsi, TLR3 a été associé à la reconnaissance du Poly(I:C), analogue structural des ARN double-brins (ARNdb) viraux (Alexopoulou et al. 2001). Cependant, l'activation de TLR3 par des ARNdb non synthétiques n'a pas encore été attestée. Récemment, le Poly(I) a également été identifié comme agoniste de TLR3. Les ARNdb sont produits par de nombreux virus en répliation (Marshall-Clarke et al. 2007). Ce sont de puissants inducteurs des IFN de type I (α et β) qui possèdent de nombreux effets physiologiques à la fois anti-viraux et immunostimulateurs.

Si on continue dans la reconnaissance virale, TLR7 et TLR8 reconnaissent les ARN simple-brins (ARNsb). Ils présentent une structure similaire mais TLR8 n'est pas fonctionnel chez la souris. Ces récepteurs ont d'abord été décrits pour détecter des composés synthétiques antiviraux de la famille des imidazoquinolines, tels le resiquimod (R848) et l'imiquimod (Hemmi et al. 2002). Il a récemment été montré que TLR7 et 8 reconnaissaient également les ARNsb riches en guanosine et uridine provenant du virus VIH-1 (Heil et al. 2004). Ils répondent également aux virus de la Dengue et de la grippe (Wang et al. 2006, Diebold et al. 2004). Cependant, chez l'homme, TLR8 serait plutôt impliqué dans la reconnaissance des

agonistes synthétiques. Ces récepteurs feront l'objet d'une analyse plus approfondie lors d'un chapitre ultérieur.

Enfin, dernier membre de ces détecteurs d'acides nucléiques, TLR9 a été impliqué dans la reconnaissance des séquences d'ADN riches en CpG non méthylés (Hemmi et al. 2000). Ces structures sont essentiellement présentes dans l'ADN bactérien car l'ADN des mammifères est fortement méthylé, d'où une discrimination efficace entre ces deux règnes. Les oligonucléotides synthétiques riches en séquences CpG sont également de bons activateurs des cellules immunitaires. Ils permettent l'induction d'IL-12 par les cellules dendritiques et le développement de réponses de type Th1 (Wagner 1999). Il a également été associé à la reconnaissance du MCMV et au HSV (herpes simplex virus), très probablement *via* la détection des séquences CpG non méthylées (Krug et al. 2004). Par ailleurs, TLR9 répond également à l'haemozoïne de *Plasmodium falciparum* (Coban et al. 2005) très certainement *via* une liaison à l'ADN associé à cette protéine (Parroche et al. 2007).

④ *La détection des ligands endogènes*

Les TLR sont spécialisés dans la reconnaissance des structures pathogènes, et sont donc capables de « sentir le danger ». Cependant, certains d'entre eux détectent également des agonistes endogènes non pathogènes. Ainsi, une étude a montré que TLR2 et TLR4 peuvent induire une réponse inflammatoire en réaction à un composé de la matrice extracellulaire, l'acide hyaluronique, qui était connu pour activer les DC *via* TLR4 (Jiang et al. 2005, Termeer et al. 2002). Ce polymère de sucres est hydrolysé par des hyaluronases au cours de lésions, générant des fragments proinflammatoires. D'autres composés de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et l'héparane sulfate qui sont produits lors de lésions tissulaires sont reconnus par TLR4. Ainsi, l'extra domaine A de la fibronectine a montré des activités immuno-stimulatrices similaires à celles du LPS (Okamura et al. 2001). Par ailleurs, des fragments d'héparane sulfate sont capables d'induire la maturation des DC par TLR4. Ce récepteur serait donc impliqué dans différents aspects de la réponse inflammatoire en reconnaissant des ligands endogènes produits pendant l'inflammation même en l'absence d'infection. Cependant, tous ces agonistes n'activent les TLR qu'à forte concentration contrastant ainsi avec les faibles doses de LPS suffisantes pour l'induction d'une réponse.

Par ailleurs, TLR4 est impliqué dans la reconnaissance des protéines de choc thermique HSP60 et HSP70 (Ohashi et al. 2000, Vabulas et al. 2001, Dybdahl et al. 2002). HSP60 est une molécule chaperonne très conservée que l'on retrouve à la fois chez les bactéries et les mammifères. Elle serait relarguée par les cellules nécrotiques pendant les

lésions tissulaires ou la lyse des cellules infectées par des virus. La signification physiologique de la reconnaissance de HSP60 par les TLR n'est pas encore bien comprise, mais la réponse inflammatoire induite par les cellules en nécrose, potentiellement portée par les HSP ou d'autres agonistes libérés par ces cellules mourantes, pourrait avoir un rôle dans le remodelage tissulaire et la guérison des blessures (Li et al. 2001).

Ceci rejoint néanmoins la théorie du danger de Polly Matzinger selon laquelle, ce n'est pas le pathogène qui est directement détecté mais les dommages qui peuvent être liés à sa présence (Matzinger 1998). Ainsi, la fonction de ces agonistes produits lors de lésions tissulaires potentiellement provoquées par des pathogènes pourrait être d'avertir le système immunitaire d'un danger.

⑤ *Plusieurs gènes, des fonctions similaires*

Au cours de cet exposé, nous avons pu nous rendre compte que certains TLR sont proches au niveau des molécules reconnues et parfois coopèrent dans cette fonction. Les similarités de fonctionnement entre certains récepteurs pourraient être expliquées par une structure et une localisation chromosomique particulière. En effet, cette dernière a été déterminée pour les TLR humains. Ainsi, TLR1 et TLR6 sont très proches en 4p14, TLR2, TLR3, TLR4 et TLR5 sont localisés respectivement en 4q32, 4q35, 9q32-33 et 1q33.3 (Rock et al. 1998, Takeuchi et al. 1999b). Par contre TLR7 et TLR8 sont localisés en tandem dans Xp22 alors que TLR9 se place en 3p21.3 (Chuang et al. 2000, Du et al. 2000). Une comparaison de leur séquence d'acides aminés révèle que cette famille peut être divisée en cinq sous-groupes :

_ la famille TLR2 constituée de TLR2, TLR1, TLR6 et TLR10. Ainsi TLR1 et TLR6 sont très similaires avec 69,3% d'homologie dans leur séquence totale et 90% dans leur domaine TIR (Takeuchi et al. 1999b). Etant donné que TLR1 et TLR6 ont des structures génomiques similaires, constituées d'un seul exon et localisées en tandem sur le même chromosome, ils sont probablement le fruit d'une duplication intervenue à un moment donné de l'évolution. Par contre, TLR2 possède deux exons mais les séquences codantes ne sont contenues que dans l'exon 2.

_ la famille TLR9 composée de TLR7, TLR8 et TLR9. Tous ces récepteurs sont codés par deux exons. Les gènes de TLR7 et TLR8 présentent 42,3% d'homologie et 72,7% dans leur séquence d'acides aminés. Ils présentent des

structures génomiques similaires et sont tous deux localisés sur le chromosome X (Chuang et al. 2000, Du et al. 2000).

_ la famille TLR4 composée du gène de TLR4 avec quatre exons

_ la famille TLR5 comportant le gène de TLR5 avec cinq exons

_ la famille TLR3. Ce gène a une structure unique parmi les TLR car il est constitué de 5 exons avec une séquence codante qui s'étend des exons 2 à 5.

Ces trois dernières familles contrastent avec les autres gènes qui ne sont codés que par un ou deux exons. Ces familles de récepteurs se retrouvent également dans leur localisation et leur signalisation.

B. UNE REPONSE SPECIFIQUE A L'AGONISTE

A l'inverse de certains récepteurs de facteurs de croissance qui possèdent une activité enzymatique intrinsèque, les TLR doivent recruter des protéines adaptatrices qui servent de pont pour activer les protéines kinases en aval.

a) Dix récepteurs, cinq adaptateurs

Nous avons vu que les récepteurs TLR sont transmembranaires avec une extrémité N-terminale riche en leucine impliquée dans la reconnaissance des structures pathogéniques. La partie cytoplasmique C-terminale est dédiée à l'activation des voies de signalisation. Elle est caractérisée par un domaine de forte homologie à celui du récepteur de l'IL-1 qui a ainsi été nommé TIR pour « Toll-IL-1 related » (O'Neill 2000). C'est par ce domaine que les TLR recrutent les premières protéines des voies de signalisation que l'on nomme adaptateurs.

① *Initiation du signal*

Après la reconnaissance, il est communément admis que les TLR nécessitent une dimérisation induite par leurs agonistes pour établir une signalisation intracellulaire (Weber et al. 2005). Ce phénomène a d'ailleurs été bien décrit chez la drosophile. Il a également été suggéré que la liaison des ARNdb au domaine extracellulaire de TLR3 induit la multimérisation du récepteur (Bell et al. 2005, Choe et al. 2005). Des contacts entre les domaines intra et extracellulaires sont impliqués dans la dimérisation du récepteur (Cusson-Hermance et al. 2005). Il a été suggéré que les TLR existent également sous la forme de dimères non fonctionnels en l'absence d'agonistes et que leur activation induit des changements conformationnels qui permettent une stabilisation du dimère (Gay et al. 2006). Ainsi, la reconnaissance de l'agoniste conduit également à un changement dans la

conformation des domaines intracellulaires, créant ainsi un site de recrutement des adaptateurs à domaine TIR (Gay et al. 2007) (Figure 6).

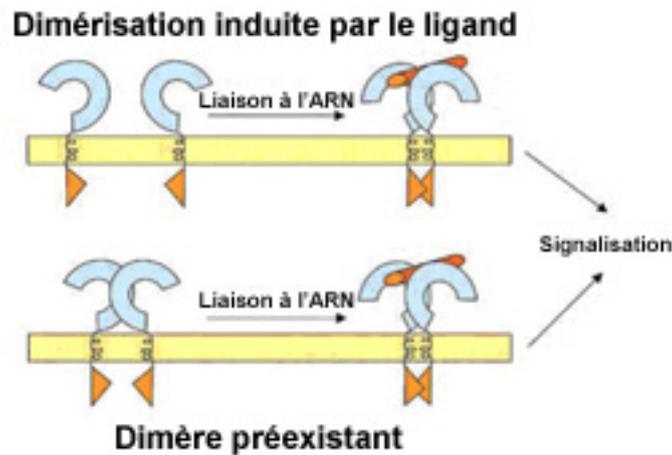


Figure 6 : Modèle de dimérisation de TLR3. La reconnaissance des ARNdb pourrait induire des changements conformationnels à partir d'un dimère préexistant et transmettre le signal. D'après Choe et al. *Science* 2005.

② Le domaine TIR à l'interface entre reconnaissance et signalisation

Ce domaine comporte environ 200 résidus avec trois grandes régions conservées, nommées boîte 1, 2 et 3 (O'Neill 2000). Des études de mutagenèse dirigée ont montré que les boîtes 1 et 2 sont essentielles pour la signalisation mais que la boîte 3 serait néanmoins importante mais pas essentielle (Slack et al. 2000). Les informations concernant la structure de ce domaine TIR sont limitées et seules ont été réalisées les cristallisations de ces domaines dans TLR1 et 2. L'étude de ces domaines et l'observation de la conservation de leurs séquences (en général 20 à 30%) suggèrent des différences structurales significatives qui pourraient expliquer la spécificité dans la transduction du signal (Xu et al. 2000).

Le domaine TIR est d'une importance cruciale dans la signalisation TLR, il sert de pont pour recruter tous les partenaires nécessaires à la réponse. Ainsi, trois types d'interactions TIR-TIR peuvent être identifiées dans le signal TLR : récepteur-récepteur, récepteur-adaptateur, adaptateur-autres protéines.

③ Les adaptateurs, premiers maillons de la chaîne

Le premier adaptateur MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88) a été découvert en 1990 comme protéine induite pendant la différenciation terminale des précurseurs myéloïdes M1D⁺ en réponse à l'IL-6. La partie « MyD » correspond à « Myeloid differentiation » et « 88 » au numéro du gène dans la liste de ceux induits (Lord et al. 1990). Elle a par la suite été impliquée dans la signalisation du récepteur à l'IL-1 puis dans le signal

TLR (Hultmark 1994, Wesche et al. 1997, Medzhitov et al. 1998). L'étude des souris déficientes pour cette protéine a montré une perte de sensibilité aux agonistes de TLR2, TLR4, TLR5, TLR7 et TLR9 (Kawai et al. 1999, Takeuchi et al. 2000b). Cette protéine est aussi commune aux voies de signalisation de l'IL-18 (Adachi et al. 1998).

MyD88 comporte un domaine TIR en C-terminal et un domaine de mort (DD) en N-terminal séparé par un domaine intermédiaire (ID) (Janssens et al. 2002). Il est recruté à la portion cytoplasmique des TLR et interagit avec les kinases de la voie de signalisation *via* son motif DD (Figure 7).

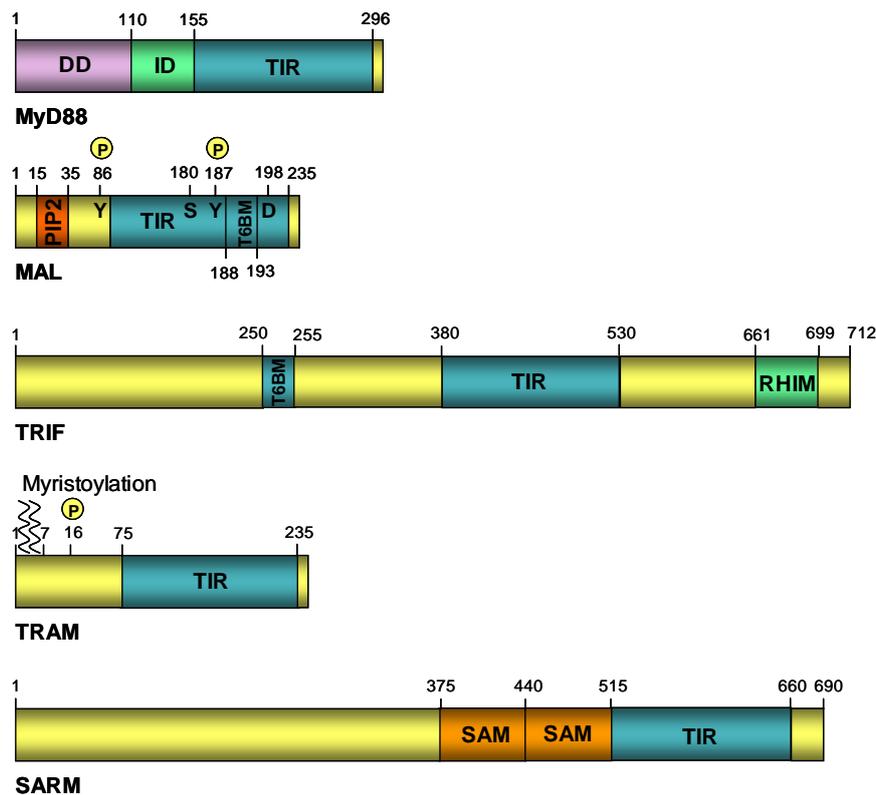


Figure 7 : Représentation schématique des domaines protéiques des adaptateurs à domaine TIR. MyD88 (myeloid differentiation primary-response gene 88) possède un domaine TIR, une région intermédiaire (ID) et un domaine de mort (DD). MAL (MyD88-adaptor-like protein) contient un motif de liaison au PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate), des tyrosines (Y) phosphorylées par la tyrosine kinase de Bruton aux positions 86 et 187, un acide aspartique (D) à la position 198 qui est un site de clivage pour la caspase-1, un résidu sérine (S) en 180 et un site putatif (T6BM) de liaison à TRAF6 (tumeur-necrosis-factor-receptor-associated factor 6). TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β) possède un motif d'interaction homotypique (RHIM) avec RIP (receptor-interacting protein) et un T6BM. TRAM (TRIF-related adaptor molecule) est myristoylé dans sa partie amino-terminale et une phosphorylation par la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ) sur un résidu sérine en position 16. SARM (sterile α - and armadillo-motif-containing protein) comporte deux motifs SAM (sterile α -motif). D'après O'Neill *et al. Nat Rev Immunol* 2007.

Le deuxième adaptateur à avoir été découvert fut MAL (MyD88-adaptor-like protein) (Horng et al. 2001, Fitzgerald et al. 2001). Il est requis pour la signalisation de TLR2 et TLR4

et sert de pont pour recruter MyD88 (Yamamoto et al. 2002). Il possède un domaine de liaison en N-terminal du PtdIns (4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) qui permet le recrutement de MAL à la membrane plasmique et en particulier sur des microdomaines de TLR4 qui contiennent ce composé (Kagan et al. 2006). MyD88 ne se lierait pas directement à TLR4 mais par l'intermédiaire de MAL *via* leurs domaines TIR respectifs. Cependant, des données récentes ont indiqué que MAL pourrait induire un signal indépendamment de MyD88. En effet, il possède un domaine de recrutement de TRAF6 qui participe à la cascade de signalisation et une tyrosine phosphorylée cible de la kinase de Bruton qui joue un rôle dans le signal TLR2 et TLR4 (Mansell et al. 2004, Gray et al. 2006).

Le troisième adaptateur TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN β) a été décrit comme contrôlant une voie indépendante de MyD88 en aval de TLR4 et comme étant l'adaptateur exclusif de TLR3. Il fut identifié en parallèle par deux groupes, un par criblage des protéines contenant des domaines TIR mais aussi grâce à un criblage en double-hybride chez la levure (Yamamoto et al. 2002, Oshiumi et al. 2003). Une étude ultérieure par mutagenèse aléatoire a fourni un mutant *Lps2* qui a confirmé le rôle de TRIF (Hoebe et al. 2003).

Le quatrième adaptateur fut TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (Oshiumi et al. 2003). Celui-ci a été identifié par bioinformatique, suivi d'une combinaison d'études de surexpression, d'analyses de mutants dominant-négatif et d'interactions avec TRIF ainsi que des travaux sur des cellules déficientes en TRAM. Il fut montré qu'il était exclusif de TLR4. Il interagit avec TRIF mais son rôle semble être plus important au sens où la signalisation du LPS est beaucoup plus affectée dans des cellules déficientes pour TRAM que pour TRIF. Ainsi, à l'inverse de MAL, TRAM ne serait pas qu'un simple adaptateur pour le recrutement de TRIF mais jouerait un réel rôle dans la signalisation de TLR4. En effet, la partie N-terminale de TRAM comporte une myristoylation constitutive requise pour l'association à la membrane (Rowe et al. 2006). La mutation de celle-ci conduit à une perte de la capacité de signalisation. Par ailleurs, cette dernière dépend également de la phosphorylation de TRAM sur la sérine 16 par la PKC ϵ (McGettrick et al. 2006).

Enfin, SARM (sterile α - and armadillo-motif-containing protein) est le dernier adaptateur de cette famille. Il a, à l'origine, été identifié par homologie à une protéine de *Drosophila melanogaster* comportant deux motifs SAM (sterile α -motifs) et des répétitions HEAT/Armadillo (Mink et al. 2001). Cette protéine comporte également un homologue chez *Caenorhabditis elegans* et c'est grâce à lui que le rôle immunologique de celle-ci a été révélé

(Couillault et al. 2004). Cependant, cet adaptateur joue plutôt un rôle négatif dans l'activation des facteurs de transcription. En effet, il a été montré un rôle inhibiteur spécifique de la signalisation en aval de TRIF qui résulterait d'une interaction directe entre ce dernier et SARM. Ainsi, le traitement de cellules par du LPS conduit à une augmentation du niveau de SARM permettant une régulation négative de la signalisation *via* TRIF.

b) Du récepteur à l'activation des gènes

Suite à la reconnaissance du ligand, la dimérisation des récepteurs entraîne un rapprochement des domaines TIR cytoplasmiques et un recrutement des adaptateurs au complexe de signalisation. MyD88 étant le principal adaptateur, les voies de signalisation ont souvent été classées en deux groupes : dépendantes de MyD88 et indépendantes de MyD88. En réalité, la plupart des récepteurs s'associent à MyD88 mais pas lorsqu'ils recrutent TRIF, donc on pourrait plutôt parler de voies dépendantes de MyD88 ou dépendantes de TRIF. La signalisation TLR conduit au final à l'activation de trois grands facteurs de transcription : NF- κ B, IRF (IFN-responding factor) et AP-1. Chaque récepteur en association avec un ou deux adaptateurs induit spécifiquement un facteur de transcription. Ainsi, TLR1, 2, 5 et 6 induisent essentiellement NF- κ B et AP-1 *via* MyD88 et MAL alors que TLR4, 7, 8 et 9 peuvent, notamment par l'intermédiaire de TRIF activer les membres de la famille des IRF et par MyD88 NF- κ B et AP-1. TLR3 est un peu particulier car il peut activer IRF et NF- κ B uniquement *via* TRIF (Figure 8).

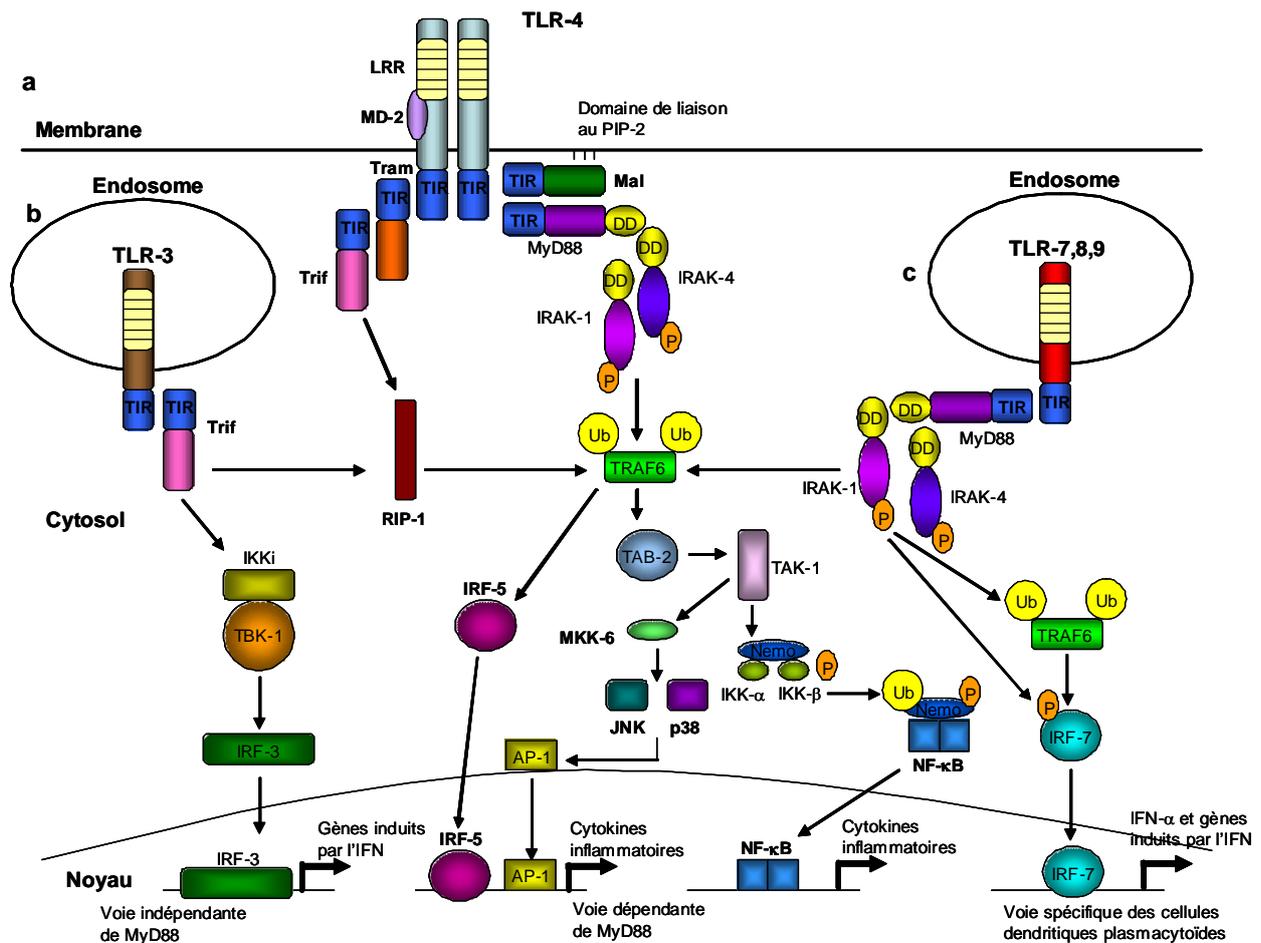


Figure 8 : Les trois grandes voies de signalisation. (a) La voie dépendante de MyD88 est utilisée par tous les TLR à l'exception de TLR3. (b) La voie dépendante de TRIF est utilisée par TLR3 et TLR4 en liant TRAM à la membrane. (c) La voie alternative à MyD88 se déroule chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes. D'après Watters *et al. Immunol Cell Biol* 2007

① Voies en aval de MyD88

MyD88 est recruté à la portion cytoplasmique du TLR par son domaine TIR et interagit avec IRAK1 et IRAK4 par son domaine DD. Une fois IRAK4 activé, il phosphoryle et active IRAK1 qui interagit par la suite avec TRAF-6 (TNFR-associated factor-6) provoquant son oligomérisation et son activation (Qian *et al.* 2001, Deng *et al.* 2000). C'est une ubiquitine ligase E3 qui fonctionne avec l'enzyme Ubc13 et la protéine Uev1a pour catalyser la synthèse des chaînes de polyubiquitine sur les protéines cibles dont TRAF6 elle-même (Deng *et al.* 2000). TRAF6 ubiquitinylé recrute alors TAB2 et active la kinase associée à TAB2, TAK1 (Takaesu *et al.* 2000). Cette dernière active alors le complexe IKK qui phosphoryle IκB conduisant à son ubiquitination puis à sa dégradation par le protéasome. Cette action libère NF-κB qui est alors libre de migrer dans le noyau et d'initier la transcription génique (Wang *et al.* 2001b). TAK-1 est aussi responsable de l'activation de

MKK6 qui phosphoryle les kinases JNK et p38 conduisant à la libération du facteur de transcription AP-1 (Wang et al. 2001b).

MyD88 participe également à l'activation de différents membres de la famille des IRF. Ainsi, notamment en aval de TLR7, 8 et 9, MyD88 est nécessaire à l'activation d'IRF7. Ces trois récepteurs ont un profil d'expression un peu particulier et sont très présents chez une population particulière de cellules, les dendritiques plasmacytoïdes. Au final, IRF7 induit la production d'IFN α (Kawai et al. 2004). Suite à la reconnaissance du ligand par TLR7, 8 et 9, IRF7 est recruté au complexe comportant MyD88, TRAF6, IRAK4 et IRAK1 (Kawai et al. 2004). La phosphorylation d'IRF7 par IRAK1 est essentielle pour activer la transcription, IRAK4 ne jouant un rôle que dans la phosphorylation d'IRAK1 (Uematsu et al. 2005). Par ailleurs MyD88 peut également activer IRF5 et induire la production de cytokines proinflammatoires (Takaoka et al. 2005). Récemment, IRF1 a également été montré comme activable par MyD88 ce qui permet sa translocation nucléaire et l'induction des gènes de l'IFN- β , la NO synthase inductible et l'IL-12p35 (Negishi et al. 2006).

L'adaptateur MAL a été décrit comme s'associant à MyD88 dans les voies de signalisation de TLR2 et TLR4 et joue un rôle de plate-forme recrutant MyD88 pour activer NF- κ B et les MAP kinases conduisant à la production de TNF et d'IL-6 (Horng et al. 2002, Yamamoto et al. 2003).

② *Voies en aval de TRIF*

Cet adaptateur a été décrit pour l'instant dans les voies de signalisation en aval de TLR3 et de TLR4. Il est d'ailleurs le seul recruté par TLR3. Il est capable d'activer IRF3 et NF- κ B et de conduire à la production d'IFN- β et de cytokines proinflammatoires (Yamamoto et al. 2003). Il active IRF3 *via* TBK1 (TANK (TRAF family member-associated NF- κ B activator)-binding kinase 1) qui s'associe à sa partie N-terminale. Récemment, TRAF3 et NAP-1 (NAK-associated protein 1) ont été impliqués dans la régulation de l'activation de TBK1 par TRIF (Hacker et al. 2006, Oganessian et al. 2006). TRIF interagit également avec RIP1 (receptor-interacting protein 1) *via* son domaine RHIM et en l'absence de celle-ci, l'activation de NF- κ B est abolie (Meylan et al. 2004). Dans la voie TLR4, l'adaptateur TRAM est essentiel au recrutement de TRIF (Fitzgerald et al. 2003).

③ *Autres protéines impliquées dans la signalisation*

En plus des voies classiquement décrites, certaines molécules interfèrent dans le signal en aval des TLR. Ainsi, les protéines Pellino, tout d'abord identifiées chez la drosophile ont été décrites chez les mammifères comme interagissant avec IRAK1 et étant requises pour l'activation de NF- κ B (Yu et al. 2002, Jiang et al. 2003). A l'état basal, IRAK1 et Pellino-2 sont séparés, mais lors d'une stimulation, ils forment un complexe (Yu et al. 2002). Etant donné que les Pellino n'ont pas d'activité enzymatique, ces protéines agiraient plutôt comme des plate-formes qui faciliteraient le relargage de IRAK1 phosphorylé du récepteur.

Une autre protéine associée aux voies TLR est la PI3K. Elle est directement activée par l'interaction entre sa sous-unité régulatrice p85 et le récepteur (Koyasu 2003). Ce phénomène implique le domaine SH2 (SRC homology 2) de la PI3K et un domaine du récepteur comportant un motif Tyr-Xaa-Xaa-Met. L'association successive de la sous-unité catalytique p110 complète l'activation, conduisant à la phosphorylation et l'activation de la cible AKT. Cependant, seuls quelques TLR comportent ce motif, à savoir TLR1, 2 et 6 et non TLR3, 4 et 5 (Arbibe et al. 2000). Néanmoins, on retrouve cette séquence sur MyD88 qui peut donc se complexer avec la PI3K mais interagir aussi directement avec AKT (Ojaniemi et al. 2003). En fait, la PI3K est un modulateur positif de la signalisation TLR mais les interactions demeurent complexes.

④ *La spécificité de la réponse*

Découvrant le faible nombre d'adaptateurs, on pourrait se demander comment la réponse peut être aussi efficace et spécifique du microbe détecté. En fait, le système immunitaire inné peut être représenté comme un sablier.

Les microbes sont complexes au niveau moléculaire, composés de milliers de protéines, de larges quantités d'acides nucléiques, et d'une grande proportion de petites molécules organiques. Cependant, le système immunitaire n'en détecte qu'une infime partie, notamment *via* les TLR. Le système se restreint de plus en plus en descendant dans la signalisation avec peu de kinases différentes activées mais induit par la suite une large gamme de réponses différentes, en multipliant le nombre de kinases secondaires, cibles des premières et la quantité de gènes activés par les facteurs de transcription induits. Ainsi, au final, malgré une signalisation quelque peu commune à tous les récepteurs, le système est capable de répondre spécifiquement à chaque stimulant (Figure 9).

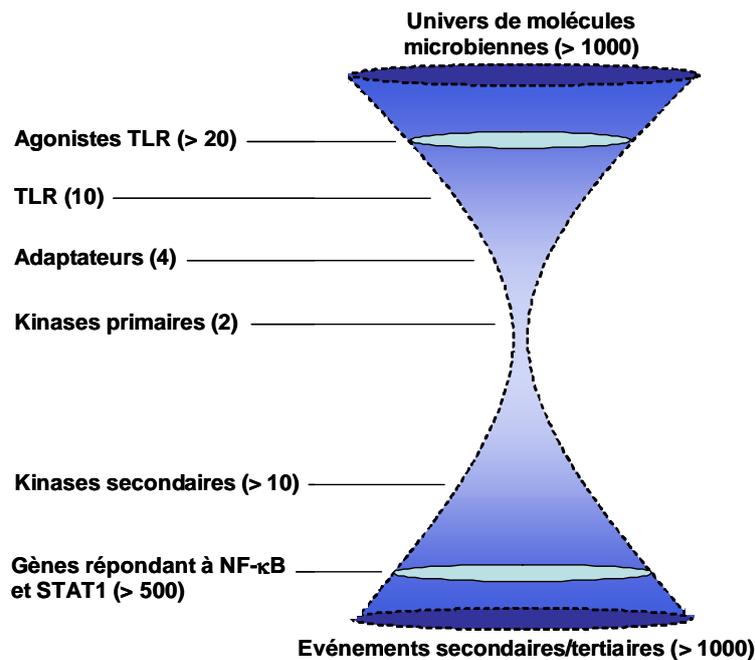


Figure 9 : Représentation schématique de la réponse immunitaire innée. Bien que les stimuli microbiens soient chimiquement complexes et que la réponse immunitaire innée implique au final un millier de gènes de l'hôte, les signaux immunitaires sont peu complexes. En effet, 10 TLR, quatre adaptateurs et deux protéines kinases sont suffisants pour la perception de la plupart des microbes. NF- κ B, nuclear factor- κ B ; STAT1, signal transducer and activator of transcription 1. D'après Bruce Beutler, *Nature* 2004.

Un autre aspect de cette spécificité est l'association différentielle des adaptateurs qui induisent plusieurs types de réponses en fonction du TLR qui les recrute et des autres partenaires. En effet, MyD88 est commun à presque tous les TLR mais s'associe à d'autres protéines qui modulent sa fonction apportant une spécificité. Par ailleurs, des études ont montré une faible homologie du domaine TIR (20-30%) entre les différents adaptateurs suggérant des fonctions différentes, notamment par des conformations variées qui permettent une interaction différentielle avec plusieurs partenaires ou une modification de leur disponibilité. C'est pourquoi cette signalisation puissante nécessite une régulation appropriée évitant tout emballement du système.

⑤ *Les boutons d'arrêt*

Dans toute signalisation, il est important de pouvoir arrêter la réponse en temps voulu. En effet, un signal trop prolongé pourrait devenir dangereux pour l'intégrité de l'organisme, c'est pourquoi de nombreux systèmes de régulation et d'arrêt ont été mis en place à tous les stades de la signalisation. En voici quelques exemples.

Dans la recherche de nouveaux adaptateurs, une nouvelle protéine a été mise en évidence récemment. Elle avait été identifiée en tant que tel car elle possédait un domaine TIR. Au final, il s'est avéré que cette protéine nommée SARM agissait tel un régulateur négatif en s'associant à TRIF et en inhibant l'activation de NK- κ B (Carty et al. 2006). Le mécanisme d'inhibition exact est inconnu mais SARM agirait en séquestrant TRIF et en l'empêchant d'interagir avec d'autres protéines.

Outre cet adaptateur particulier, les autres sont également régulés par d'autres mécanismes. MyD88, le principal adaptateur est la cible de différentes actions inhibitrices conduisant à l'arrêt de la signalisation. Ainsi, le TGF- β (transforming growth factor β) exerce un de ses effets anti-inflammatoires en provoquant l'ubiquitylation de MyD88 qui conduit à sa dégradation par le protéasome, perturbant le signal TLR. Par ailleurs, une protéine contenant un domaine TIR et liée à la membrane du nom de ST2 est aussi capable de bloquer les voies en aval du récepteur à l'IL-1, de TLR2, 4 et 9, en séquestrant MyD88 et MAL par leur domaines TIR. Une isoforme particulière, MyD88 short (MyD88 s) issue d'un épissage alternatif, dépourvue du domaine ID agit comme un régulateur négatif de l'induction de NF- κ B par l'IL-1 et le LPS (Janssens et al. 2002). Cette activité inhibitrice est due à l'incapacité de recruter IRAK4 (Burns et al. 2003).

D'une manière intéressante, l'adaptateur MAL, longtemps considéré comme accessoire par rapport à MyD88 fait l'objet de nombreuses régulations. Ainsi, la présence d'un motif liant le PIP2, important pour son recrutement à la membrane, suggère que la signalisation TLR pourrait être régulée par le métabolisme des phospholipides. En effet, une mutation dans ce domaine entraîne le défaut de recrutement de MAL à la membrane et la perte de sa capacité à lier MyD88 (Kagan et al. 2006). Par ailleurs, la phosphorylation de certains résidus tyrosine de MAL par la tyrosine kinase de Bruton (BTK) est essentielle à une signalisation TLR4. En effet, ce phénomène pourrait conférer à cet adaptateur un changement conformationnel lui permettant de s'associer à d'autres protéines (Gray et al. 2006). MAL est aussi la cible de la protéine SOCS1 qui entraîne sa dégradation par le protéasome suite à son ubiquitylation (Mansell et al. 2006).

TRIF est aussi la cible d'une régulation négative, notamment par TRAF1. En effet, leur interaction permettrait la séquestration du domaine TIR de TRIF par le domaine TRAF-C de TRAF1. Par ailleurs, la signalisation TLR étant primordiale dans la réponse initiale aux virus, ces derniers ont cherché à élaborer différentes stratégies d'évitement. Ainsi, le virus Vaccinia code pour une protéine contenant un domaine TIR, A46R, qui séquestre également

TRIF. A46R cible aussi MyD88 et TRAM, qui tout comme TRIF jouent un rôle dans la défense anti-virale. Dans la même optique, une sérine protéase du virus de l'hépatite C cause la protéolyse de TRIF.

Tout comme MAL, TRAM est associé à la membrane plasmique. La mutation de son site de myristoylation empêche sa localisation membranaire et entraîne un défaut d'activation d'IRF3 et de NF- κ B (Rowe et al. 2006). TRAM est aussi régulé par phosphorylation par la PKC ϵ (McGettrick et al. 2006).

Un dernier système de régulation est la protéine TOLLIP. A l'origine, elle a été décrite comme une protéine accessoire du récepteur à l'IL-1 (Burns et al. 2000). Elle a par la suite été montrée comme se liant au domaine TIR de ce dernier mais aussi à celui de TLR2 et TLR4 et comme inhibant la réponse en supprimant la phosphorylation d'IRAK1 (Zhang et al. 2002).

C. LA PLACE DES TLR DANS LA REPOSE IMMUNE

Suite à la reconnaissance de l'agoniste, des voies de signalisation sont induites conduisant à l'activation de facteurs de transcription, responsables de l'expression de nombreux gènes. Un point commun entre tous les TLR est l'induction de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs immunologiques dépendant notamment de NF- κ B, d'AP-1 et des IRF. Ce type de réponse est légitime pour l'élimination rapide du pathogène. Par la suite, les signaux TLR sont essentiels pour orienter et déclencher une réponse immune adaptative.

a) TLR : une expression ubiquitaire

Pourquoi les TLR jouent-ils un rôle si important en immunité innée ? Bien sûr, ils ne sont pas les seuls PRR à détecter les microbes, mais leur spectre de reconnaissance demeure plus vaste que les NOD, RIG ou autres NALP. Ils sont capables de répondre à toutes sortes de microorganismes. Leur force vient aussi du fait qu'ils sont présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme, y compris bien entendu, des cellules immunitaires.

① *Distribution des TLR*

L'expression des TLR a fait l'objet de nombreuses études et on a désormais une assez bonne image de leur répartition. Parmi les cellules présentatrices de l'antigène, les monocytes/macrophages expriment des ARNm de presque tous les TLR excepté TLR3 (Muzio et al. 2000). Par contre, les cellules dendritiques présentent une distribution différentielle en fonction de leurs sous-populations. D'une façon intéressante, les deux

principaux sous-types de DC, les DC myéloïdes (MDC) et les DC plasmacytoïdes (PDC) présentent une expression des TLR tout à fait particulière. Ainsi, les MDC expriment TLR1, 2, 4, 5 et les PDC TLR7, 8 et 9 (Liu 2001). De plus, cette expression est modulée au fil de la maturation des MDC. Ainsi, ces dernières diminuent la présence des 4 TLR précédemment cités et augmentent celle de TLR3 (Muzio et al. 2000).

Les mastocytes, cellules conservées par l'évolution ayant des fonctions de phagocytose des pathogènes, d'apprêtement des antigènes et de production de cytokines inflammatoires expriment TLR2, 4, 6 et 8 mais pas TLR5 (McCurdy et al. 2001, Varadaradjalou et al. 2003).

En plus des cellules de l'immunité innée, les TLR se retrouvent également sur différents types cellulaires qui contribuent aux réponses inflammatoires. Ainsi, les muqueuses respiratoires et intestinales qui sont à l'interface avec le milieu extérieur expriment ces récepteurs. D'une manière intéressante, l'intestin a mis en place une organisation tout à fait particulière. En effet, la partie apicale des cellules épithéliales qui est continuellement exposée aux bactéries, ne développe pas d'inflammation exacerbée. Par contre, les bactéries qui entrent en contact avec la partie basolatérale de ces mêmes cellules sont la cible de fortes réponses inflammatoires. Ceci s'explique par une localisation des TLR exclusivement dans la partie basolatérale des cellules. Ainsi, la flagelline, le ligand de TLR5 n'induit une réponse que lorsqu'elle sera présentée à la face basolatérale (Gewirtz et al. 2001). Par contre, TLR4 est faiblement exprimé par l'intestin, ce qui pourrait expliquer la faible sensibilité au LPS de cet organe (Abreu et al. 2001). De la même façon, les cellules épithéliales rénales expriment TLR2 et TLR4, mais également chez la souris TLR11, récepteur qui détecte les bactéries uropathogènes (Wolfs et al. 2002). Les cellules de l'épithélium pulmonaire expriment TLR4 (Wang et al. 2002b). Il en est de même pour les cellules de la cornée (Kumar et al. 2006).

② Une expression contrôlée

Malgré une très large distribution de ces TLR, le niveau d'expression est modulable par différents facteurs, tels l'invasion microbienne, des composés pathogènes ou des cytokines, afin d'affiner au mieux la réponse. Ainsi, l'infection avec *Mycobacterium avium* induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de TLR2 et diminue celle de TLR4 chez les macrophages (Wang et al. 2000). *Haemophilus influenzae* induit TLR2 sur les cellules épithéliales (Shuto et al. 2001). Les infections virales augmentent également l'expression des ARNm de TLR1, 2, 3 et 7 par les macrophages. Cette induction est supprimée par le

traitement avec un anticorps anti-IFN α/β , indiquant le rôle de ces molécules dans la modulation de ces récepteurs (Miettinen et al. 2001).

Par ailleurs, des composés de pathogènes tels le LPS peuvent augmenter l'expression de TLR2 par les macrophages et les adipocytes (Matsuguchi et al. 2000, Lin et al. 2000). Par contre, cette molécule induit une diminution de l'expression du complexe TLR4/MD-2 soulignant un mécanisme possible de tolérance au LPS (Nomura et al. 2000).

De nombreuses cytokines ont été impliquées dans la régulation des TLR. Ainsi, le CSF-1 (Colony stimulating factor 1) peut diminuer TLR9 dans les macrophages et supprimer la production des cytokines inflammatoires induite par l'ADN CpG (Sweet et al. 2002). Le MIF (macrophage migration inhibitory factor), une cytokine importante dans l'inflammation et la septicémie, augmente l'expression de TLR4 (Roger et al. 2001). L'IFN- γ qui prépare les macrophages à répondre au LPS, accroît TLR4 dans les monocytes et les macrophages humains (Bosisio et al. 2002). L'expression du gène de TLR2 est induite par le LPS, mais aussi par l'IL-2, IL-15, IL-1 β , IFN- γ et TNF- α (Matsuguchi et al. 2000).

b) Les cellules présentatrices d'antigène à l'origine de la réponse

Les cellules dendritiques occupent une position clé à l'interface entre immunité innée et adaptative. Les cellules dendritiques immatures résident dans les tissus périphériques et surveillent l'entrée d'éventuels pathogènes. La reconnaissance d'un microbe et sa phagocytose vont entraîner sa maturation caractérisée par une capacité d'apprêtement de l'antigène accrue, une augmentation des molécules du CMH et de costimulation, suivie de sa migration dans les ganglions lymphatiques où ces cellules peuvent stimuler les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène (Banchereau et al. 1998). Ainsi, par ce mécanisme, l'activation du système adaptatif ne se déroule que lors de la reconnaissance du pathogène par la cellule dendritique.

① *Première étape : la cellule dendritique s'active*

Que se passe-t-il dans cette cellule, une fois le pathogène reconnu ? Nous avons vu les mécanismes moléculaires déclenchés en aval du récepteur TLR mais qu'en est-il de la réponse globale au final ? Nous nous focaliserons essentiellement dans ce chapitre sur la cellule dendritique myéloïde, la cellule plasmacytoïde faisant l'objet d'un chapitre ultérieur.

L'analyse des souris déficientes pour MyD88 a démontré le rôle critique des TLR dans la maturation des cellules dendritiques. Ainsi, la stimulation de ces cellules par différents

PAMP n'induisait pas leur maturation, excepté le LPS qui possède une voie indépendante de MyD88. De plus, le blocage de l'expression de surface des molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) et du CMH sur ces dendritiques, ne leur permettait pas d'activer *in vitro* les lymphocytes T naïfs spécifiques de l'antigène (Schnare et al. 2001). Par ailleurs, quand les souris MyD88^{-/-} étaient immunisées avec de l'ovalbumine (OVA) dans de l'adjuvant complet de Freund, aucune réponse T OVA-spécifique n'était développée. En outre, ces souris n'étaient plus capables de produire l'IFN- γ et des IgG2a spécifiques de l'OVA. Ces défauts sont en partie dus à l'incapacité de ces cellules à produire l'IL-12. Cependant, ces souris présentaient des niveaux corrects d'IgG1 et d'IgE spécifiques de l'antigène. Ainsi, ces souris présentent clairement un défaut de réponse Th1 alors que les réponses Th2 restent normales. C'est sur la base de ces expériences qu'a été établi le dogme établissant que les TLR étaient impliqués dans les réponses inflammatoires. Nous verrons par la suite que cette idée commence à être remise en question. Mais pour le moment, concentrons-nous sur la cellule dendritique qui va produire des cytokines pro-inflammatoires et qui va pouvoir recruter d'autres acteurs de la réponse immunitaire.

Ainsi, suite au signal TLR, la production d'IL-12 et/ou d'IL-18, va orienter la réponse adaptative vers Th1. Les lymphocytes T, reconnaissant l'antigène présenté par le CMH *via* leur TCR, et les molécules de costimulation (CD40, CD80, CD86) *via* le CD40L et le CD28, vont pouvoir devenir effecteurs Th1 et produire de l'IFN- γ . Par ailleurs, de l'IL-4 dans le milieu pourra orienter la réponse vers Th2 avec des cellules effectrices qui produiront alors de l'IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 (Figure 10).

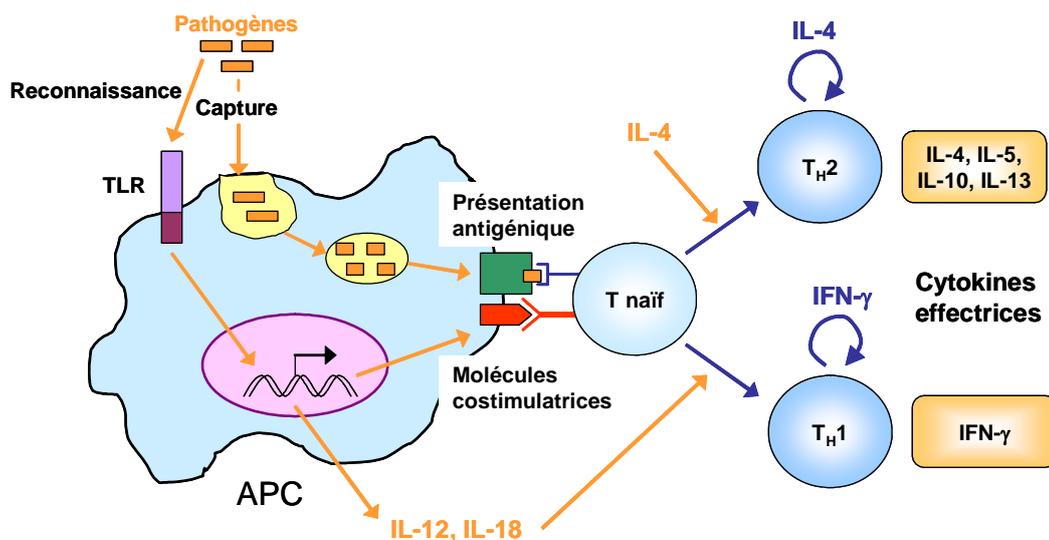


Figure 10 : Régulation du développement des cellules T_H par les TLR sur les APC. D'après Akira *et al. Nature immunology* 2001.

② Deuxième étape : la cellule dendritique recrute

Le signal TLR ne va pas servir qu'à activer les dendritiques et successivement l'immunité adaptative mais il joue également un rôle dans le recrutement des cellules sur le lieu de l'inflammation. Une des particularités du système immunitaire est la capacité de migration nécessaire à la surveillance, l'attaque, le confinement et l'élimination des pathogènes. Deux types de migration cellulaire sont utilisés par les cellules du système immunitaire : inductible et homéostatique. La migration inductible est souvent le résultat de la détection de pathogènes par les PRR. Par contre, celle homéostatique est le fruit de la circulation de lymphocytes naïfs entre les tissus lymphoïdes secondaires du corps dans le but d'augmenter leurs chances de rencontrer un antigène. Cette dernière est constitutive et ne requiert pas l'induction *via* les TLR.

La reconnaissance des PAMP par les TLR de la DC initie comme nous l'avons vu une réponse inflammatoire caractérisée par le recrutement de cellules sur les sites d'infection pour augmenter l'élimination et diminuer la propagation des pathogènes. Cette migration à partir du sang périphérique dans les tissus enflammés implique une séquence d'événements contrôlée (Laudanna et al. 2002). Ces phénomènes sont portés par deux types de signaux : des facteurs chimiotactiques solubles et des molécules d'adhésion à la surface des cellules. L'activation des TLR induit l'expression de sélectines, de chimiokines et de gènes de récepteurs aux chimiokines (Huang et al. 2001). Ainsi, les lymphocytes détectant des signaux inflammatoires vont tout d'abord « rouler » sur les cellules endothéliales grâce aux sélectines exprimées par l'endothélium et aux sucres portés par les leucocytes. En effet, ces protéines vont rapidement être disposées à la surface de l'endothélium soit après reconnaissance directe des pathogènes *via* les TLR, soit par le TNF produit par les macrophages activés dans les tissus, qui jouent le rôle de cellules présentatrices de l'antigène. L'étape suivante sera alors l'induction de la sécrétion de chimiokines par les TLR, comme l'IL-8 (CXCL8), GRO- α (growth-related oncogene- α ; CXCL1), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α ; CCL4) et RANTES (CCL5) (Mantovani et al. 2004). Ces chimiokines permettent l'activation des leucocytes induisant des changements conformationnels des intégrines qui permettent alors l'adhésion à l'épithélium vasculaire (Laudanna et al. 2002). Les ligands des intégrines, les ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule 1) sont aussi induits directement par les TLR exprimés par l'endothélium, ou indirectement *via* le TNF et l'IL-1, qui sont induits par les macrophages résidents activés par

les TLR. Au final, tout ceci permet aux leucocytes de migrer entre les cellules endothéliales et d'arriver dans les tissus.

③ Troisième étape : la cellule dendritique collabore

Lors de l'inflammation aiguë, les infiltrats cellulaires comportent de nombreux types de cellules innées comme les monocytes, les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles et les lymphocytes NK. En effet, bien que les TLR soient des éléments clés dans la réponse innée, l'évolution a conservé d'autres moyens de répondre à une invasion par des pathogènes. Ceux-ci incluent le système du complément, des récepteurs spécialisés qui permettent aux cellules NK de reconnaître le non-soi et d'autres molécules intracellulaires. Tous ces systèmes de perception microbienne sont complémentaires et sont impliqués dans le développement des réponses adaptatives (Figure 11).

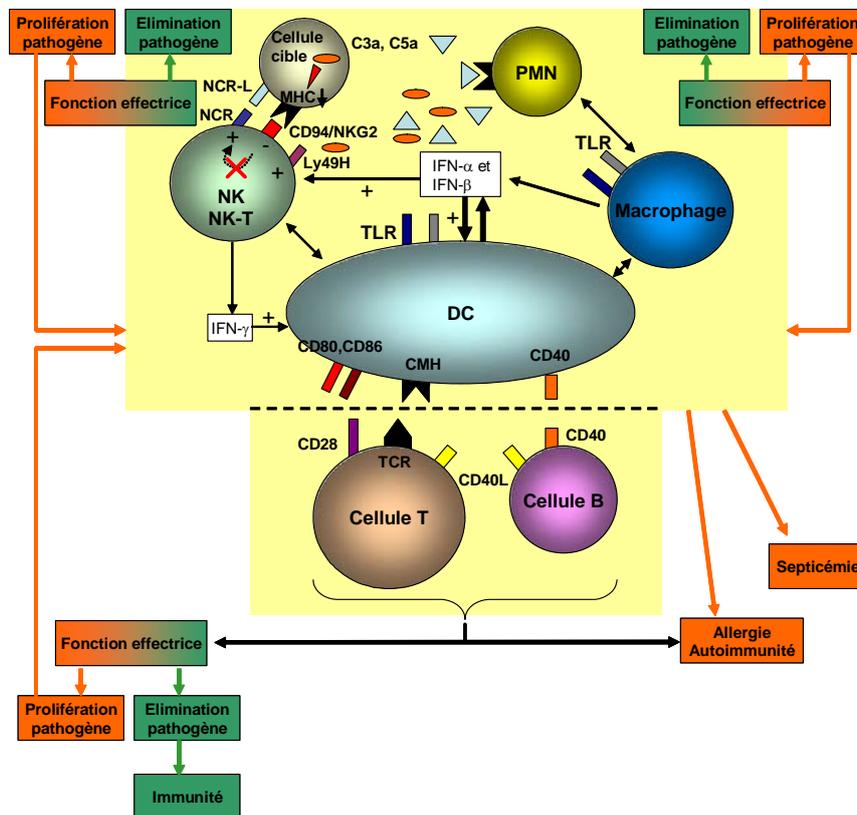


Figure 11 : L'interface entre immunité innée et adaptative et les conséquences du succès ou de l'échec de la réponse. L'événement essentiel de l'élimination des pathogènes est leur reconnaissance par le système immunitaire inné. Ceci implique le système du complément, des récepteurs spécialisés exprimés par les NK et la famille des TLR portés par les cellules myéloïdes et lymphoïdes. L'engagement de ces voies conduit à une réponse inflammatoire avec destruction du pathogène et à une interaction DC/T ou DC/B. Quand la réponse est bien orchestrée (vert), elle conduit à l'éradication du microbe, mais la moindre défaillance peut conduire à la prolifération du pathogène et à la septicémie (rouge) mais aussi à des désordres immunitaires (rouge). CD40L, CD40 ligand ; IFN, interféron ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; PMN, cellules polymorphonucléaires ; TCR, T cell receptor ; NCR, natural cytotoxicity receptor ; NCR-L, natural cytotoxicity receptor-ligand. D'après Hoebe *et al. Nature immunology* 2004.

La cellule dendritique et le macrophage sont toujours au centre de l'action, reconnaissent les pathogènes mais collaborent avec les autres types cellulaires. Une réponse immunitaire bien orchestrée conduira à l'éradication du pathogène. Par contre, tout défaut provoquera une prolifération du pathogène conduisant à la fin à une septicémie ou pouvant provoquer des désordres immunologiques tels des maladies autoimmunes ou allergiques.

Les IFN de type I jouent un rôle très important dans l'histoire. En effet, ils augmentent les réponses T (Honda et al. 2003). Ils sont essentiels pour l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation sur les dendritiques, événement essentiel pour une interaction optimale avec les CD4⁺ et les CD8⁺ naïfs. Cette production joue un rôle important dans l'activation des NK. En effet, ces derniers expriment une multitude de récepteurs capables de reconnaître le soi du non-soi. Leur principale fonction est de protéger l'hôte de l'infection par des pathogènes intracellulaires. Leur activation peut se faire par la reconnaissance d'antigènes étrangers mais aussi par le « soi induit » ou le « soi manquant », tel une augmentation ou une diminution de l'expression de molécules de surface normalement reconnues par les récepteurs inhibiteurs des NK. Mais ces NK sont aussi activés par les DC, *via* des molécules de surface spécifiques ou indirectement par des cytokines. Ceci conduit à la production d'IFN- γ par les NK, à la maturation des DC et à l'augmentation de la réponse T. Par ailleurs, ces cellules ont la capacité d'éliminer les DC immatures, inhibant ainsi la réponse T. Ces fonctions indiquent donc que l'interaction entre NK et DC représente une balance entre induction et répression de la fonction dendritique qui peut être décisive pour le développement d'une tolérance vis-à-vis de la réponse T (Raulet 2004).

Une autre voie capable de moduler les réponses B et T est le système du complément. Ce dernier comporte plusieurs protéines plasmatiques dont la fonction majeure est la reconnaissance et l'élimination des microbes. L'activation de ce système peut se faire soit en liant des anticorps (voie classique), soit par la reconnaissance de structures polysaccharidiques bactériennes (voie des lectines), soit par la détection de structures de surface étrangères pas encore bien caractérisées (voie alterne). Le complément participe dans l'immunité humorale par la ligation des facteurs C au récepteur CD21-CD35 exprimé par les B et les dendritiques folliculaires, conduisant à la régulation des réponses cellulaires B. Par ailleurs, le système du complément est essentiel pour l'opsonisation des microbes et la prise d'antigènes suivie de leur apprêtement par la DC, qui permet une réponse T efficace (Carroll 2004).

c) Conséquences d'un déficit TLR

A l'origine de nombreuses réponses anti-microbiennes, le manque d'un ou de plusieurs TLR ou protéines de leur voie de signalisation peut engendrer de nombreux dysfonctionnements dans le traitement d'une infection. De nombreuses études ont été réalisées chez l'homme pour rechercher d'éventuels polymorphismes que l'on pourrait corréler à une hypersensibilité à un type d'infection.

Le gène de TLR4 humain comporte deux polymorphismes majoritaires, Asp299Gly et Thr399Ile qui altèrent la séquence de la protéine. Le premier a pour conséquence une diminution de la sensibilité au LPS (Arbour et al. 2000). Par contre l'association entre ce polymorphisme et la septicémie est encore discutée. Par ailleurs, ces deux modifications ont été associées à une prédisposition des enfants africains à la malaria (Mockenhaupt et al. 2006). Il existe également une corrélation entre ce polymorphisme et des risques élevés de bronchiolite due au RSV (respiratory syncytial virus), dont la protéine F est connue pour activer TLR4 (Tal et al. 2004).

De nombreuses études ont montré que ces deux modifications étaient associées à un risque accru d'infections. Cependant ces polymorphismes sont corrélés à une résistance à la maladie du légionnaire, une infection pulmonaire causée par la bactérie à Gram-négatif flagellée *Legionella pneumophila* (Hawn et al. 2005). Cet effet serait dû à la structure inhabituelle du LPS de cette bactérie qui serait plutôt reconnue par TLR2 que TLR4 (Girard et al. 2003). Cependant, ces études sont complexes car il existe souvent des systèmes redondants qui reconnaissent les mêmes microorganismes et qui masquent tout effet d'un polymorphisme.

Des études similaires ont montré que le polymorphisme Arg753Gln inhibe le signal TLR2 et est associé à la tuberculose (Ogus et al. 2004) et à des réponses diminuées aux bactéries à Gram-positif comme les streptocoques (Lorenz et al. 2000). D'une manière intéressante, cette même modification semble protéger du développement du dernier stade de la maladie de Lyme, peut-être à cause de la diminution du signal TLR2 (Schroder et al. 2005). Par contre, aucune association n'a pu être mise en évidence avec la susceptibilité à l'infection par *Staphylococcus aureus* (Moore et al. 2004).

Un polymorphisme commun de TLR5 dans le domaine de liaison à l'agoniste (392STOP) abolit la signalisation de la flagelline. Il est associé à une sensibilité accrue à la maladie du légionnaire (Hawn et al. 2003). Cependant, cette modification ne rend pas sensible à toutes les infections par des bactéries flagellées puisqu'elle n'a pas d'impact sur la susceptibilité à *Salmonella enterica* responsable de la fièvre typhoïde (Dunstan et al. 2005).

Les TLR en eux-mêmes ne sont pas seuls responsables. En effet, un certain nombre d'études ont montré une association entre la mutation de protéines des voies de signalisation et la sensibilité à différentes infections. Ainsi, le polymorphisme d'IRAK4 entraîne une sensibilité aux bactéries à Gram-positif pyogènes. Cependant, ces patients montrent une résistance aux infections virales, fongiques et parasitaires (Picard science 2003). De la même façon, le polymorphisme de l'adaptateur MAL (Ser180Leu) est corrélé à un effet protecteur contre la malaria, la tuberculose et les infections à pneumocoques (Picard et al. 2003). Par contre, la modification Cys558Thr est liée à une sensibilité accrue à la tuberculose (Khor et al. 2007).

Cependant, ces études font souvent l'objet de nombreuses controverses car les résultats dépendent des cohortes choisies, de leur taille, des témoins négatifs mais également de l'ethnie choisie. En effet, ces données sont souvent plus représentatives quand les études se font dans une population restreinte avec peu de brassages génétiques, soulignant ainsi le rôle de l'hérédité dans ces phénomènes.

Nous verrons dans un autre chapitre que ces polymorphismes peuvent aussi être impliqués dans des maladies dues à des dérèglements du système immunitaire. Intéressons-nous pour l'instant aux fonctions du récepteur TLR7.

4. TLR7 ET INFECTIONS VIRALES

Nous avons fait un petit tour d'horizon des TLR et de leurs différentes réponses. Nous avons pu voir qu'elles étaient variées et qu'il est très difficile de donner une réponse globale applicable à tous les TLR. En effet, chaque agoniste agit différemment, ce qui renforce la spécificité de réponse. C'est pourquoi, nous nous intéresserons plus spécifiquement à l'un d'entre eux : TLR7.

A. TLR7 ET LA DETECTION VIRALE

TLR7 appartient à une sous-famille des TLR spécialisée dans la reconnaissance des acides nucléiques au même titre que TLR3, 8 et 9. Il est très proche structurellement et fonctionnellement de TLR8 avec lequel il partage les agonistes. Cependant, cette dualité n'existe que chez l'homme puisque TLR8 n'est pas fonctionnel chez la souris. Bien qu'il soit désormais associé à la détection des ARNs viraux et plus largement de certaines infections virales, il a longtemps été privé d'agonistes naturels et n'était connu que pour la reconnaissance de composés synthétiques.

a) Les imidazoquinolines : agonistes synthétiques de TLR7

Cette famille de composés a démontré de puissantes activités antivirales et antitumorales, grâce à leur capacité d'induire des cytokines inflammatoires, notamment l'IFN- α (Figure 12).

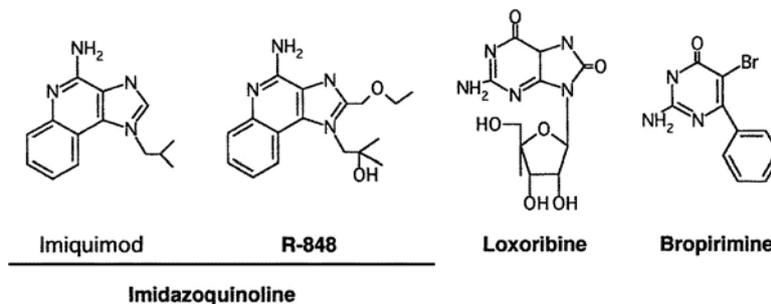


Figure 12 : Structures de composés synthétiques qui activent TLR7. L'analyse des souris déficientes pour TLR7 a révélé que ce récepteur reconnaît ces différentes molécules apparentées structurellement aux acides nucléiques. Ceci inclut les imidazoquinolines (Imiquimod and R-848), la loxoribine, et la broprimine. D'après Takeda *et al. Annual Review of immunology* 2003.

Une de ces molécules, l'imiquimod a été approuvée dans le traitement du papillomavirus humain. Il fut montré que des souris déficientes pour TLR7 perdaient leur capacité de répondre à ces constituants (Hemmi et al. 2002). Ceux-ci possèdent une structure similaire aux acides nucléiques. Outre ses activités antivirales, ce composé a été testé dans la lutte anti-cancéreuse. En effet, l'imiquimod est capable d'induire de grandes quantités de cytokines, telles le TNF α , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le G-CSF, le GM-CSF, l'IFN γ et l'IFN α et de chimiokines comme MIP-1 α , MIP-1 β et MCP-1 (Reiter et al. 1994, Weeks et al. 1994). L'effet global de ces cytokines est la stimulation d'une réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. Ce composé est également capable d'induire l'apoptose des cellules tumorales de façon dose dépendante par l'intermédiaire de Fas et des caspases (Schon et al. 2003).

Le resiquimod (R848, 4-amino-2-ethoxymethyl- α,α -dimethyl-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-1-ethanol) est un analogue de l'imiquimod beaucoup plus puissant (Jones 2003). Il induit 50 à 100 fois plus de cytokines essentiellement Th1 que son analogue (Tomai et al. 1995). Le principal type cellulaire activé par le resiquimod est la cellule dendritique qui produit de l'IL-6, IL-12, TNF- α et IFN- α en réponse à une stimulation (Ahonen et al. 1999). Mais, il est capable d'activer les monocytes, les lymphocytes B chez lesquels il induit la production d'anticorps (Bishop et al. 2000). Par ailleurs, l'IFN- α produit limite la réplication virale dans les cellules infectées et en collaboration avec l'IL-12 et le TNF- α active les lymphocytes NK. Ces derniers font partie de la première phase contre l'infection virale. Les

NK sont également porteurs de TLR7 et 8 et sont donc directement activables par le R848 (Hart et al. 2005). Tout comme l'imiquimod, ce dernier a été testé dans le traitement du virus de l'herpès génital mais les essais cliniques ont été arrêtés en phase III. Par ailleurs, ses activités antitumorales sont moins évidentes que celles de l'imiquimod. Par contre, il est utilisé comme adjuvant de vaccination à cause de ses propriétés pro-inflammatoires (Vasilakos et al. 2000).

D'autres composés immunomodulateurs n'appartenant pas à cette famille mais ayant une structure similaire, la loxoribine (7-allyl-8-oxoguanosine) et la bropirimine (2-amin-5-bromo-6-phenyl-4(3)-pyrimidinone) activent également les cellules immunitaires *via* TLR7 (Heil et al. 2003, Takeda et al. 2003). Le premier augmente l'activité cellulaire des NK et induit la production de cytokines dont les IFN (Goodman 1995) et le second la production d'IFN- α (Sarosdy 1993). Ces deux molécules sont en essai clinique pour leurs activités antitumorales.

b) Les ARNsb : agonistes naturels de TLR7

Bien que TLR7 et TLR8 soient fortement homologues, il existe une petite spécificité inter-espèces dans la reconnaissance des ARNsb. En effet, TLR7 étant le seul récepteur fonctionnel chez la souris, il est chargé de la reconnaissance de tous les agonistes. Par contre, compte-tenu de l'existence de deux récepteurs chez l'homme, la tâche est mieux répartie. Ainsi, TLR7 et TLR8 présentent quelques différences dans les molécules détectées.

Des études chez des souris déficientes pour TLR7 ont montré l'induction d'IFN de type I en réponse au virus A de la grippe et à celui de la stomatite vésiculaire (VSV) (Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004). TLR8, quant à lui, reconnaît préférentiellement les ARNsb riches en guanine et uridine dérivés du VIH (Heil et al. 2004). Par ailleurs, des composés synthétiques non viraux mais analogues de ces ARNsb, comme le Poly(U) peuvent aussi activer les cellules immunitaires *via* TLR7 (Diebold et al. 2004).

B. UN RECEPTEUR INTRACELLULAIRE

Il y a quelques années, on pensait que tous les TLR étaient présents à la surface des cellules, ce n'est que depuis peu que l'on sait que certains d'entre eux (TLR3, 7, 8 et 9) sont exclusivement intracellulaires, portés par la membrane des endosomes.

a) Une localisation endosomale

Celle-ci est en total accord avec les molécules reconnues. En effet, ce sont des récepteurs pour les acides nucléiques, qui sont rarement présents à l'état libre dans le cytoplasme mais plutôt compartimentalisés. D'ailleurs, TLR2 et 4 sont également impliqués dans la reconnaissance virale mais détectent plutôt des protéines de l'enveloppe virale qui peuvent être exposées à l'extérieur de la cellule. Tous les TLR qui reconnaissent les acides nucléiques sont endosomaux.

Par ailleurs, cette localisation est essentielle pour la reconnaissance puisqu'il a été avancé qu'il fallait une acidification de ce compartiment pour permettre une détection par les TLR. Le traitement des cellules par des inhibiteurs des lysosomes comme la chloroquine inhibe la réponse (Diebold et al. 2004, Lund et al. 2004). De plus, plusieurs travaux ont suggéré que la localisation endosomale aurait un avantage dans la discrimination soi/non-soi.

b) Comment les ARN endogènes échappent-ils à la reconnaissance ?

Des études ont montré que des ARNm adsorbés sur des liposomes cationiques étaient capables d'activer le système immunitaire alors que les mêmes séquences déposées dans le cytoplasme ne l'étaient pas (Sioud 2005). Ainsi, contrairement aux ARN viraux qui sont présents dans les endosomes, les ARN endogènes sont plutôt dans le cytoplasme, ce qui permet une reconnaissance préférentielle des ARN étrangers. La séquestration de TLR7 et TLR8 dans les endosomes a donc une relevance physiologique qui les empêche de reconnaître les ARN cytoplasmiques. Mais cette hypothèse n'est pas encore prouvée.

D'autres travaux ont suggéré que la queue polyA des ARNm eucaryotes pourrait les protéger d'une reconnaissance par le système immunitaire (Koski et al. 2004). Par ailleurs, certaines modifications des ARN de l'organisme pourraient les rendre invisibles aux TLR. Ainsi, Kariko *et al.* ont montré que l'ajout de nucléosides modifiés (N6-méthyladanosine, 5-méthylcytidine, 2-thiouridine ou pseudouridine) dans des ARN synthétiques diminuait fortement leur capacité à induire une réponse (Kariko et al. 2005). Etant donné que ces modifications se rencontrent plus souvent dans les ARN des mammifères que dans les ARN bactériens, cela pourrait expliquer la non reconnaissance des structures mammaliennes.

Ainsi, ces différents facteurs pourraient expliquer la non réponse aux acides nucléiques endogènes.

c) Une signalisation efficace

Tel que je l'ai déjà détaillé précédemment, TLR7 recrute la protéine MyD88 qui forme un complexe avec IRAK1, IRAK4 et TRAF6. Cette dernière protéine va conduire à l'activation de NF- κ B et d'IRF5, tous deux impliqués dans l'induction de cytokines inflammatoires. A partir de TAK1, s'active la voie des MAP kinases avec leurs facteurs de transcription associés comme ATF2-c-jun. Par ailleurs, le facteur IRF7 lui, est impliqué dans l'expression des IFN de type I (Figure 13).

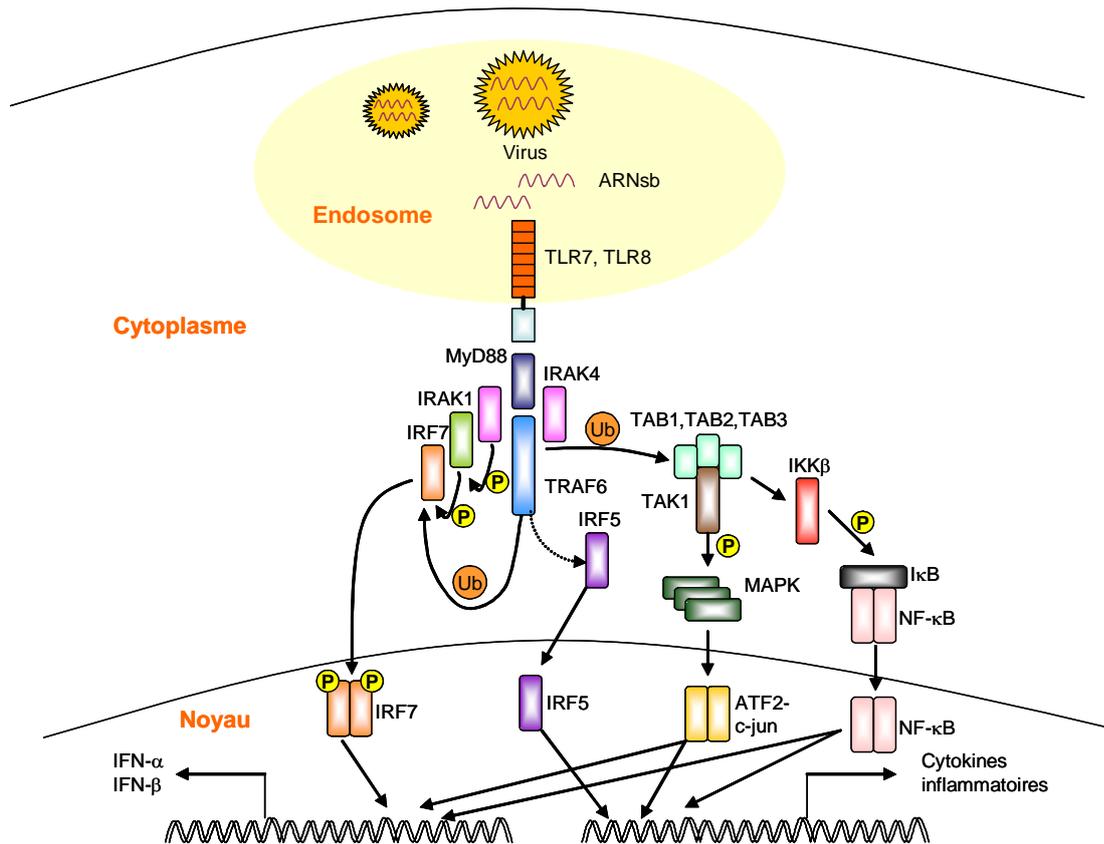


Figure 13 : Reconnaissance des acides nucléiques viraux par TLR7, TLR8. La détection des ARNs viraux par TLR7 conduit au recrutement de l'adaptateur MyD88, qui interagit avec IRAK4 et TRAF6. En retour, ce dernier active TAK1 par un mécanisme dépendant de l'ubiquitinylation. TAK1, en association avec TAB1, 2 et 3 active NF- κ B et ATF2-c-jun par la dégradation d'I κ B par IKK et l'activation des MAPK respectivement. Cette voie contrôle l'expression de cytokines inflammatoires. MyD88 s'associe également avec IRAK1 et IRF7. Ce dernier est phosphorylé par IRAK1 et passe dans le noyau. L'ubiquitinylation par TRAF6 est aussi nécessaire à l'activation d'IRF7. Cette voie régule l'expression des IFN de type I. D'après Kawai *et al. Nature immunology* 2006.

Ainsi, en aval de TLR7, différentes voies de signalisation se détachent mais finissent par se rejoindre pour activer deux grands types de réponses : la production de cytokines inflammatoires et d'IFN de type I. Géographiquement, la reconnaissance se fait dans l'endosome, mais la signalisation est cytosolique comme tous les autres TLR. Le récepteur TLR9 impliqué dans la détection de l'ADN CpG partage ces voies.

Une particularité de cette signalisation est la capacité de MyD88 à activer la production des IFN. En effet, jusque là, c'était le rôle de l'adaptateur TRIF dans les signaux en aval de TLR3 et TLR4. Ce phénomène a peut-être une relevance physiologique.

C. ROLE CENTRAL DE LA CELLULE DENDRITIQUE PLASMACYTOÏDE (PDC)

Les PDC représentent une population rare mais importante du système hématopoïétique. En tant que sentinelles du système immunitaire, elles diffèrent drastiquement des DC conventionnelles (DC myéloïdes immatures CD11c⁺, MDC) de par leur expression de TLR7, 8 et 9 mais pas TLR2, 3, 4, 5 ou 6 que l'on trouve chez les MDC (Liu 2005). A cause de ce spectre d'expression restreint, les PDC ne répondent pas aux composés bactériens comme le LPS ou le peptidoglycane, agonistes respectifs de TLR4 et TLR2. Elles sont spécialisées dans la détection des acides nucléiques viraux.

a) Réponse de la cellule dendritique

L'activation TLR conduit les PDC à produire rapidement et massivement les IFN de type I, des cytokines et des chimiokines mais aussi à subir une maturation et une différenciation. L'amplitude de la réponse IFN est telle qu'après une infection par le virus de l'herpes (HSV), 60% des transcrits exprimés dans la PDC sont des IFN de type I (Ito et al. 2006). Ces cellules expriment toute la gamme des IFN, à savoir α , β , λ , ω et τ . En plus des IFN, elle produit de forts taux de TNF α et d'IL-6, aussi bien que des chimiokines (Colonna et al. 2004, Piqueras et al. 2006). Néanmoins, à la différence des PDC murines, les humaines ne produisent pas d'IL-12p70 (Ito et al. 2006).

Cependant, tout ne passe pas par TLR et d'autres voies sont impliquées. Il s'agit de molécules dont nous avons déjà parlé, les RNA hélicases RIG-I et MDA5 ainsi que leur adaptateur IPS-1. Bien que l'activation de ces molécules soit essentielle pour l'induction d'IFN en réponse aux virus par d'autres cellules immunitaires ou non hématopoïétiques, les PDC semblent le faire indépendamment de cette voie (Kawai et al. 2006). Néanmoins, différentes études suggèrent des réponses anti-virales des PDC indépendantes des TLR notamment en ce qui concerne les ARNdb qui peuvent activer TLR3. Ces cellules répondent uniquement à la forme vivante, non inactivée du RSV, un processus insensible à l'acidification endosomale et indépendant de l'activation TLR7, TLR9 (Hornung et al. 2004). Dans un autre cas, les ARNsb du virus Sendai activent la production d'IFN de type I des PDC de façon MyD88-indépendante (Hornung et al. 2004).

b) Les IFN de type I : molécules antivirales par excellence

Ils appartiennent à une famille multigénique conservée chez les vertébrés. Ils diffèrent de la plupart des autres familles de cytokines et comportent de nombreux sous-types. Chez l'homme, on ne compte pas moins de 30 gènes codant pour ces différentes molécules (Hardy et al. 2004). Leur action est bien sûr antivirale en rendant les cellules résistantes aux virus. Les modalités sont différentes en fonction du type de virus mais interviennent grâce à des gènes induits par l'IFN (IRG) codant pour des protéines effectrices qui agissent à différents stades : entrée du virus, transcription, initiation de la traduction, maturation, assemblage, relargage. Par exemple, la PKR (proteine kinase R) induit par l'IFN et qui phosphoryle de nombreux substrats dont le facteur initiateur de la synthèse protéique eIF2 α , est capable de bloquer la traduction de l'ARN viral (Lu et al. 1999).

Néanmoins, ils possèdent également des effets antiprolifératifs en ciblant des molécules du cycle, comme c-myc, l'induction de facteurs de croissance et de leurs récepteurs (Hu et al. 2005, Iacopino et al. 1996). Par ailleurs, ils peuvent induire l'apoptose, ce qui permet une élimination des cellules infectées.

c) Un système hautement surveillé

Etant donné l'importance de la réponse plasmacytoïde, celle-ci nécessite d'être régulée. Les recherches récentes ont permis d'apporter quelques éléments de régulation grâce à la découverte de multiples récepteurs de surface qui modulent le signal TLR (Figure 14).

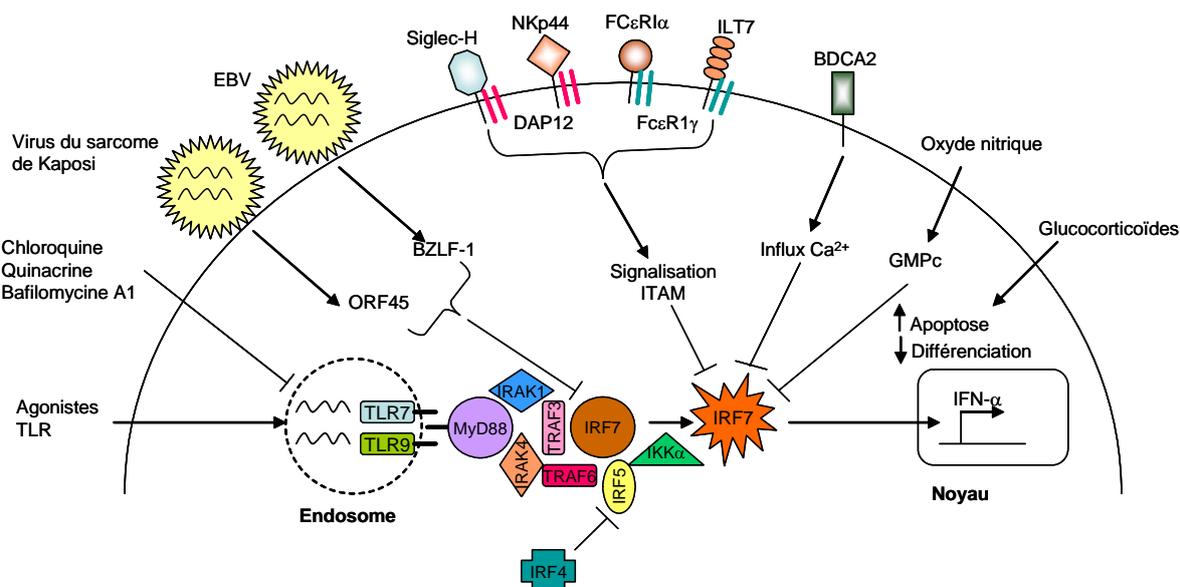


Figure 14 : Régulation de la production d'IFN- α par la cellule dendritique plasmacytoïde. Des récepteurs de surface, des composés codés par les virus, des facteurs intracellulaires et des agents exogènes régulent les réponses immunitaires innées de la PDC en interférant dans la signalisation TLR. D'après Cao *et al. Current opinion in immunology* 2007.

Par exemple, BDCA2, une lectine de type C exprimée uniquement à la surface des PDC humaines, a été décrite pour supprimer la capacité de ces cellules à générer l'IFN en réponse aux ligands TLR (Dzionek et al. 2001). Récemment, il a été montré que la ligation aux CpG du récepteur ILT7, qui s'associe à FcεRIγ, ou sa stimulation par le virus de la grippe inhibait la production de cytokines par les PDC (Cao et al. 2006). Cette voie passe par une signalisation par des motifs ITAM (Immunoreceptor-based tyrosine activation motif). De la même façon, deux molécules qui signalent *via* DAP12, NKp44 et Siglec-H, par l'intermédiaire de motifs ITAM modulent également la réponse (Fuchs et al. 2005, Blasius et al. 2006). Ces résultats montreraient donc que la signalisation *via* ITAM pourrait supprimer la réponse des agonistes des TLR (Hamerman et al. 2005).

D'autres facteurs intracellulaires et des agents exogènes modulent les réponses innées des PDC. Ainsi, IRF4 qui est fortement exprimé par ces cellules, entre en compétition avec IRF5 et IRF7 pour l'interaction avec MyD88, régulant ainsi négativement la production de cytokines induite par les TLR (Negishi et al. 2005). Cependant, les régulateurs de la voie générale des TLR sont également impliqués dans cette modulation chez les PDC. Une classe importante de facteurs qui interfèrent fortement avec le signal appartient aux virus qui essaient de trouver des moyens d'échapper à la reconnaissance en ciblant des molécules du système. Ainsi, le virus du sarcome de Kaposi et celui d'Epstein-Barr expriment des facteurs spécifiques bloquant la fonction d'IRF7, régulant ainsi négativement la réponse (Haller et al. 2006).

Viennent ensuite des agents chimiques qui peuvent perturber l'acidification endosomale, comme la chloroquine, la quinacrine ou la bafilomycine A1 (Rutz et al. 2004). Le NO (nitric oxyde) supprime l'IFN-α et la production des cytokines *via* une voie dépendante de la GMPc (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) (Morita et al. 2005). Les glucocorticoïdes ont été décrits comme étant capables de supprimer la différenciation PDC et d'augmenter l'apoptose (Abe et al. 2006).

d) La PDC en situation pathologique

Les PDC sont impliquées dans la lutte contre de nombreux virus mais deux d'entre eux font l'objet de nombreuses études : le VIH et le virus de l'hépatite C (VHC).

Les PDC humaines expriment CD4, CXCR4 et CCR5, les récepteurs pour le VIH. Elles sont activées par différentes souches de VIH *via* l'engagement de TLR7 conduisant à la production massive d'IFN de type I, de cytokines et l'expression de marqueurs de surface de maturation (Beignon et al. 2005). Ce phénomène est crucial dans le contrôle de l'infection au

VIH. En effet, on observe une diminution du nombre de PDC dans les infections chroniques au VIH-1 associées à de fortes charges virales et infections opportunistes (Schmidt et al. 2006). Par ailleurs, le recouvrement de la fonction plasmacytoïde a été corrélée avec l'efficacité de la thérapie antivirale (Zhang et al. 2006). Cependant, la capture du VIH-1 par les PDC facilite la transmission de particules infectieuses aux cellules T. C'est une des stratégies d'évitement mises en place par le virus (Lore et al. 2005).

Dans le cas du VHC, on observe chez les patients infectés une diminution de la fréquence des PDC dans le sang et de leur capacité à activer des réponses immunitaires (Kanto et al. 2006, Szabo et al. 2005). Des observations similaires ont été réalisées pour les infections chroniques avec le virus de l'hépatite B (van der Molen et al. 2004). Par ailleurs, des études ont suggéré qu'un agoniste de TLR7 pouvait activer une réponse anti-VHC *in vitro*, ce qui laisse présager d'éventuelles applications thérapeutiques (Lee et al. 2006).

Outre leur rôle dans les infections virales, les PDC ont été associées à certains troubles du système immunitaire comme les maladies autoimmunes. Ainsi, la présence d'IFN- α et d'une infiltration massive de PDC a été corrélée à la sévérité de différentes maladies comme le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjogren et la dermatomyosite, dans lesquelles les autoanticorps sécrétés sont dirigés contre les acides nucléiques et les composants nucléaires (Pascual et al. 2003, Gottenberg et al. 2006, Greenberg et al. 2005). Les PDC peuvent répondre à ces anticorps *via* une coopération entre Fc γ RII et TLR9 (anticorps anti-ADN) ou Fc γ RII et TLR7 (anticorps anti-protéines nucléaires) (Vollmer et al. 2005, Means et al. 2005, Barrat et al. 2005). Par ailleurs, le recrutement des PDC et la production d'IFN- α dans la peau peut conduire au psoriasis (Nestle et al. 2005).

L'organisme a donc mis en place un système très performant de détection du danger. Une fois entré dans l'organisme, le pathogène va être la cible de toute une batterie de molécules qui vont reconnaître ses structures très conservées par l'évolution, le marquer comme dangereux et l'attaquer en vue de son élimination. Peu importe le type de microbe, il existe toujours une structure qui va activer une Nod, un Nalp, une RIG ou encore un TLR. Une des forces de cette première barrière immunologique est, en plus de la détection de molécules variées, une disposition à différents endroits dans la cellule qui permet de reconnaître les éléments étrangers aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur. La coopération entre ces différents PRR permettra une réponse adaptée à chaque pathogène. Si ce premier système ne suffit pas, l'immunité adaptative, activée par ce dernier, prendra le relais en

proposant cette fois une réponse plus ciblée. Néanmoins, dans la plupart des cas, l'immunité innée est suffisante.

Dans cette jungle de PRR, les TLR sont des éléments clés qui reconnaissent une grande variété de pathogènes. On connaît de plus en plus d'éléments sur leur biologie, et l'on peut s'apercevoir qu'ils sont pratiquement de toutes les réponses immunologiques. TLR7, un des membres de cette famille, bien que peu connu il y a quelques années, commence à prendre de l'importance à la suite de la découverte de son rôle dans la détection virale. Son implication dans les infections au VIH ou au VHC laisse présager de grandes potentialités dans le futur.

Bien que ces TLR aient largement été décrits comme premiers acteurs de la réponse inflammatoire, on commence à comprendre que leur action est beaucoup plus large et qu'ils jouent un rôle très important dans la modulation et l'éducation du système immunitaire. Il y a presque trente ans, une hypothèse, nommée hypothèse de l'hygiène a émergé. Cette idée souligne le fait que les cellules de l'immunité ont besoin d'être stimulées très tôt chez l'enfant pour pouvoir ensuite assumer correctement leur rôle défensif. Ainsi, de nombreuses études se penchent de plus en plus sur le rôle des infections dans la modulation du système immunitaire et plus précisément sur son bon fonctionnement. C'est pourquoi les TLR qui détectent les infections pourraient être de fabuleux outils pour protéger ce dernier de ses dysfonctionnements.

II. PLACE DES TLR DANS LA PERFORMANCE DU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le versant pro-inflammatoire des TLR a été, depuis leur découverte, la cible de toutes les attentions. Il est bien entendu primordial dans la lutte anti-infectieuse. Mais, pourquoi, les TLR qui sont des molécules si puissantes ne pourraient-elles orienter la réponse que dans un seul sens. En effet, la plupart des infections parasitaires nécessitent des réponses de type anti-inflammatoires dans lesquelles les TLR peuvent être impliqués. Depuis quelques années, on assiste à une réévaluation de leur rôle dans ces réactions et notamment dans différentes pathologies liées à une rupture de tolérance. Ainsi, ces récepteurs pourraient moduler en fonction de l'environnement immunologique, la réponse et rétablir l'équilibre entre pro- et anti-inflammatoire. C'est pourquoi, au cours de ce chapitre, nous envisagerons leur rôle dans des situations où cet équilibre est rompu et chercherons à savoir s'ils sont impliqués dans cette rupture et s'ils peuvent la réparer. Ainsi, nous nous intéresserons essentiellement à des situations dans lesquelles le système immunitaire fonctionne mal et met en péril l'intégrité de l'organisme, comme dans le cas de maladies autoimmunes ou allergiques.

1. INFECTIONS ET SYSTEME IMMUNITAIRE : UN ROLE BENEFIQUE ?

Ce débat fait rage depuis des années. Les infections sont-elles nécessaires à l'éducation du système immunitaire ? Contribuent-elles au bon fonctionnement de ce dernier ? Peuvent-elles, au final, avoir un rôle bénéfique ?

A. HYPOTHESE DE L'HYGIENE : REALITE OU FICTION ?

Cette hypothèse, proposée par David Strachan en 1989, a été la première à suggérer que les infections et un contact non hygiénique pouvaient conférer une protection contre le développement des maladies allergiques. Cette idée a depuis fait du chemin, et de nombreux autres travaux sont venus l'étayer ou la réfuter. Mais, tout d'abord, arrêtons-nous sur ces travaux pionniers.

a) Les fondements de l'hypothèse

Ainsi que je l'ai souligné, David Strachan a publié en 1989 une étude concernant l'incidence du rhume des foins dans différentes familles britanniques. Il s'agit d'un travail particulièrement intéressant puisqu'il a suivi l'histoire médicale de 17414 enfants britanniques, nés au cours de la même semaine en mars 1958, jusqu'à l'âge de 23 ans. Il s'est intéressé à trois événements : (1) épisode de rhume des foins dans les 12 mois précédant l'âge

de 23 ans, (2) épisode de rhume des foins ou rhinite allergique dans les 12 mois précédant l'âge de 11 ans et (3) épisode d'eczéma pendant la première année de vie. Il introduisit dans son étude 16 facteurs non médicaux de l'environnement. Parmi ces derniers, deux se détachèrent, à savoir la taille de la famille et la position dans la fratrie.

Il mit ainsi en évidence qu'à l'âge de 11 ans, l'incidence du rhume des foins était inversement corrélée aux nombres d'enfants dans la maison. La même analyse à l'âge de 23 ans suggéra que le nombre d'enfants plus âgés dans la famille était une variable encore plus influente. Par contre, l'eczéma dans la première année de vie était indépendant de ces facteurs. Il existerait donc une association entre l'incidence du rhume des foins et la position dans la fratrie.

Bien que n'en apportant pas la démonstration directe, David Strachan suggère que les maladies allergiques pourraient être prévenues par les infections contractées pendant la petite enfance, transmises par un contact non hygiénique avec les frères et sœurs aînés ou acquises de façon prénatale d'une mère infectée par contact avec l'un de ses aînés. Les infections successives ou les réinfections des cadets leur confèreraient une meilleure protection contre le rhume des foins (Strachan 1989).

b) Les données actuelles

Une grande quantité d'études épidémiologiques sont venues confirmer la relation inverse entre le nombre de frères et sœurs et le développement de maladies allergiques. Les observations originelles ont par la suite été étendues au rôle des expositions microbiennes de l'environnement. Ainsi, cette hypothèse a été étayée et trois éléments la désignent désormais :

1. Les infections visibles ou non apparentes de l'homme avec des virus ou des bactéries pourraient diminuer le risque de développer des maladies allergiques.
2. Les expositions microbiennes non-invasives de l'environnement seraient associées à un risque atténué d'allergies.
3. Les deux types d'expositions précédemment citées influenceraient les réponses immunes innées et adaptatives du sujet (von Mutius 2007).

Les études épidémiologiques successives ont montré que l'hypothèse de l'hygiène est constituée d'une interaction complexe de nombreux facteurs. Ainsi, de nombreux travaux sur des cohortes ont montré, en particulier dans le cas de l'asthme, que différents phénotypes existent. Les affections respiratoires ne sont pas toujours associées à l'allergie. Par contre, certaines d'entre elles peuvent évoluer vers la chronicité et conduire à une insuffisance pulmonaire et une hyperréactivité respiratoire. Le deuxième facteur compliquant le système

est la cinétique d'exposition. En effet, de nombreux travaux ont clairement montré l'importance du moment d'exposition au cours de la vie du sujet. Au cours de l'enfance et de l'adolescence, l'organisme est encore en développement et en maturation. C'est probablement au cours de ces moments que certaines expositions ont des effets majeurs sur la maturation du système immunitaire et le développement des maladies allergiques. Néanmoins, un élément non négligeable reste la génétique de l'individu, notamment pour les prédispositions mais aussi en interaction avec l'environnement. En effet, un certain nombre d'altérations génétiques pourraient interagir avec les facteurs de l'environnement pour influencer le développement de maladies allergiques.

c) L'hypothèse s'élargit

Strachan avait proposé une association inverse entre infections et allergies. Désormais, l'hypothèse va plus loin et englobe toutes les pathologies liées à un dysfonctionnement du système immunitaire. En effet, des données épidémiologiques ont apporté la preuve que l'on assistait, depuis environ 50 ans, à une augmentation de l'incidence des maladies autoimmunes et allergiques dans les pays développés. Parallèlement, on observe une diminution de l'incidence des maladies infectieuses, notamment à cause de l'utilisation d'antibiotiques, de vaccins ou plus simplement, de meilleures conditions d'hygiène et d'un environnement socio-économique convenable (Figure 15).

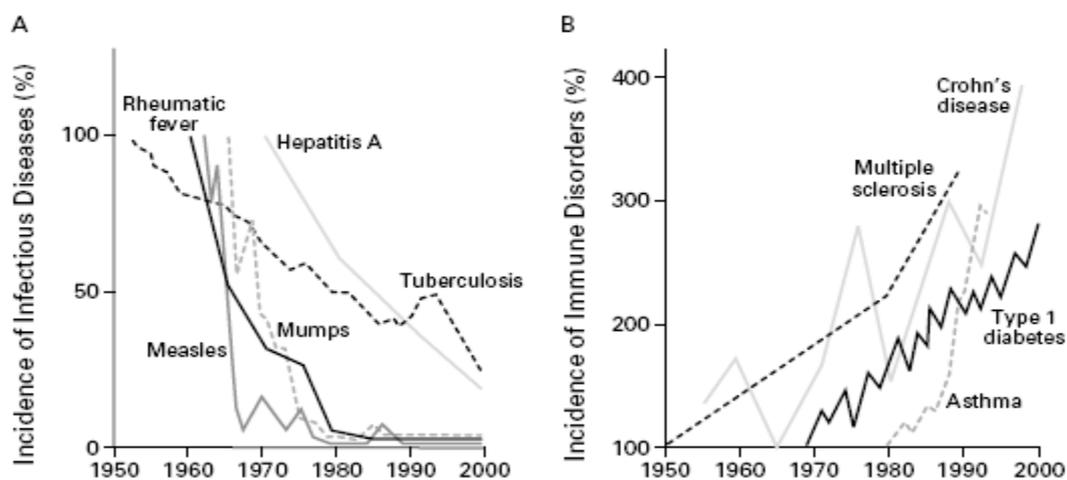


Figure 15 : Relation inverse entre l'incidence des maladies infectieuses et celles des désordres immunologiques de 1959 à 2000. D'après Bach JF, *New England Journal of Medicine* 2002.

Les maladies autoimmunes et allergiques ne sont pas uniformément réparties à la surface du globe et l'on peut mettre en évidence un gradient nord-sud. Ainsi, l'incidence de ces pathologies décroît du nord au sud dans l'hémisphère Nord et inversement dans

l'hémisphère Sud. On observe ce phénomène pour les cas de sclérose en plaque et de diabète de type 1 en Europe mais il se retrouve lorsque l'on compare Europe et Afrique, et ce bien que les données épidémiologiques y soient moins bien documentées (Bach 2002, Kagan et al. 2006). On peut se demander si ces différences sont réelles, ou si elles sont dues par exemple à un mauvais diagnostic de ces pathologies dans des pays moins développés. Néanmoins, il existe d'autres explications à ce gradient, et notamment génétiques. Une étude a par exemple montré que l'incidence du diabète de type 1 est plus importante chez les habitants de la Sardaigne, comparée aux habitants des régions voisines. Il en est de même pour les enfants de sardes ayant migré en Italie continentale (Muntoni et al. 1997).

Un facteur flagrant dans le gradient nord-sud est la différence de statut socio-économique. Ainsi, différentes études ont trouvé une fréquence diminuée de maladies immunologiques dans les populations ayant un niveau de vie faible. Dans le Yorkshire et en Irlande du Nord, il existe une corrélation positive entre la faible incidence du diabète de type 1 et certains index socio-économiques (chômage, non possession de voitures, familles nombreuses, locataires vs. propriétaires) (Staines et al. 1997, Patterson et al. 1996). Ainsi, les niveaux socio-économiques plus faibles et les températures plus élevées, deux facteurs souvent partagés des pays du sud, pourraient prédisposer les habitants aux infections de différentes façons, comme un contrôle moins astringent de la contamination microbienne de l'eau et de la nourriture, un risque accru de la prolifération bactérienne à cause des températures élevées, et des conditions sanitaires faibles augmentant le risque de contaminations (Bach 2002).

Par ailleurs, tout comme pour l'asthme, les infections dans la petite enfance pourraient protéger des maladies autoimmunes. Ainsi, des enfants allant à la crèche et ayant des frères et sœurs aînés présentent une incidence du diabète de type 1 diminuée par rapport à des enfants uniques n'allant pas à la crèche (McKinney et al. 2000). Le fait que les enfants soient en relation avec d'autres enfants et puissent donc plus facilement être infectés, est un facteur bénéfique contre les désordres immunologiques. Au contraire, tous les moyens de lutte contre ces infections, tels les antibiotiques et les vaccins ont tendance à augmenter les risques de pathologies immunitaires. Ainsi, une étude a montré un risque accru de maladies allergiques chez des enfants prédisposés traités par antibiotiques lors de leur première année de vie (Droste et al. 2000).

Toute une panoplie d'études a été réalisée sur le rôle de l'environnement et notamment de la vie en milieu rural vs. urbain. Ainsi, les enfants dont les parents sont fermiers et qui vivent dans les fermes sont moins sujets aux allergies que d'autres enfants résidant dans la

même région mais pas dans des fermes (Braun-Fahrlander et al. 1999). De la même façon, les enfants exposés jeunes aux animaux de la ferme et buvant du lait de vache présentent un risque diminué (Riedler et al. 2001). Cet effet serait notamment dû au niveau d'endotoxine dans la literie plus élevé à la campagne (Braun-Fahrlander et al. 2002).

De toutes ces données ressort un point essentiel : l'importance des infections dans la diminution du risque de développement de maladies du système immunitaire. Tous les facteurs favorisant la rencontre microbienne sont associés à cette diminution. Mais l'hypothèse de l'hygiène est-elle réellement une bonne explication pour l'augmentation de l'incidence des désordres immunologiques ?

Aussi séduisante soit-elle, cette notion fait intervenir différents facteurs qui rendent les études complexes, notamment à cause des interactions gènes-environnement. De plus, toutes les infections ne sont pas protectrices. En effet, les infections du tractus respiratoire peuvent être des facteurs de risque de la rhinite et de l'asthme (Arshad et al. 2005, Nafstad et al. 2005). Néanmoins, elle peut permettre une meilleure compréhension des mécanismes stimulant le système immunitaire afin de mieux contrer ses débordements. C'est pourquoi, de nombreux travaux ont été réalisés sur le rôle protecteur des infections dans les pathologies du système immunitaire. Dans la suite de l'exposé, nous nous intéresserons essentiellement à deux d'entre elles, le diabète de type 1, une maladie auto-immune et l'asthme, une maladie allergique.

B. LES PREUVES EPIDEMIOLOGIQUES

Ce type d'étude a essentiellement été réalisé pour l'asthme. En effet, peu de données épidémiologiques sont disponibles dans le cadre des maladies auto-immunes. Pour celles-ci, on dispose essentiellement de données sur des modèles animaux.

a) Rôle des microorganismes et de leurs composés

L'idée que les microbes de l'environnement puissent être responsables des effets protecteurs contre l'allergie a été confortée par des études sur des populations vaccinées ou infectées avec des mycobactéries. Par exemple, la vaccination avec le bacille de Calmette et Guérin (BCG) qui contient des mycobactéries dont la virulence a été atténuée, a été associée à un risque réduit de développer des maladies allergiques. Une étude dans une école japonaise a révélé une association entre fortes réactions à la tuberculine, de faibles niveaux d'IgE, une dominance de réponses Th1 et la diminution de la prévalence des maladies allergiques (Shirakawa et al. 1997). La réduction la plus importante était observée chez les enfants

vaccinés pendant la première année de vie. Mais, d'autres observations ont suggéré que l'exposition naturelle aux mycobactéries pouvait avoir renforcé la réponse anti-tuberculine et ses effets protecteurs (Aaby et al. 2000). Ces données furent confirmées par les résultats de l'ISAAC (International Study of Asthma and Allergies in Childhood) sur plus de 200000 enfants. Cette étude montra que l'augmentation du taux de tuberculose était associée à une diminution de la rhinite (von Mutius et al. 2000). Par contre, une autre étude a montré qu'il n'y avait pas d'association entre vaccination BCG et atopie (Alm et al. 1998). Mais, dans ce travail, furent analysés des enfants avec une atopie héréditaire.

En plus de l'étude de ces microorganismes pathogènes, certaines études se sont intéressées à l'effet protecteur de la microflore commensale et des bactéries probiotiques. Ainsi, une comparaison a été établie entre estoniens, qui développent peu d'allergies et suédois, dont le taux est plus fort. Les différences observées seraient dues à la microflore intestinale qui comporte beaucoup plus de Lactobacilles et de Bifidobactéries chez les estoniens. Ainsi, il a été suggéré qu'un changement dans la flore pouvait moduler l'incidence de l'atopie (Bjorksten et al. 2001). Des équipes étudient actuellement la possibilité de donner des probiotiques aux femmes enceintes et aux enfants dès leur naissance pour stimuler le système immunitaire et limiter le risque d'allergie. D'autre part, dans certaines populations, la consommation d'aliments fermentés est un facteur réducteur d'allergie (Alm et al. 1999).

Toutes ces études montrent clairement que la présence de composants microbiens dans le milieu environnant peut avoir des effets protecteurs sur l'allergie. Mais le moment de l'exposition est important et plus il intervient tôt dans la vie, meilleure est la protection.

b) Le cas des virus

De nombreux travaux se sont intéressés à l'influence des infections virales dans le développement ou la protection de l'asthme. Cependant, les résultats sont beaucoup plus contradictoires. Certains montrent que les infections virales respiratoires sont liées au développement des maladies allergiques mais les démonstrations ne sont pas concluantes.

Le RSV est considéré comme le microbe responsable de la plupart des symptômes respiratoires de l'enfant. Cependant, des études plus récentes ont décrit que le rhinovirus humain (RV) est en fait le pathogène le plus fréquent à cet âge (Van Bentem et al. 2003). Néanmoins, le RSV est l'agent responsable de la bronchiolite. Des études épidémiologiques ont montré que les infections au RSV pouvaient non seulement conduire à des symptômes liés à l'asthme mais aussi contribuer à la sensibilisation allergique et au développement de l'asthme. Ainsi, les infections sévères qui conduisent à une hospitalisation provoquent un

risque élevé de développer un asthme à long terme (Sigurs et al. 2005). Néanmoins, celles-ci ne seraient pas liées aux rhinites chroniques qui peuvent se développer pendant les dix premières années de vie (Stein et al. 1999). Par ailleurs, un traitement avec des immunoglobulines anti-RSV a conduit à une amélioration de la fonction pulmonaire et un risque atténué d'atopie chez les enfants traités (Wenzel et al. 2002). Cependant, étant donné que tous les enfants sont infectés par le RSV pendant les deux premières années de vie, on s'aperçoit que des facteurs génétiques et environnementaux peuvent moduler ces réponses (Arruda et al. 2005).

Les infections virales peuvent-elles donc être protectrices ? Il a été montré que l'exposition répétée à celles-ci pendant l'enfance et notamment dans les crèches pouvait réduire le risque de sensibilisation aux allergènes, grâce à la diminution des réponses de type Th2 (Ball et al. 2000). Par ailleurs, la vaccination contre le virus de l'hépatite B a été associée à une diminution du risque de maladies allergiques, alors que ce n'est pas le cas pour l'hépatite C (Uter et al. 2003). Cependant, la présence d'anticorps anti-hépatite A est inversement corrélée à l'incidence de l'asthme, de l'atopie et du rhume des foins (Matricardi et al. 2000).

Néanmoins, ces études restent très difficiles à interpréter car elles font intervenir de multiples paramètres qui ne sont pas toujours contrôlés.

c) La difficulté de ces études

Les contradictions qui apparaissent dans ces études sont dues aux difficultés d'analyse des données épidémiologiques. Un paramètre essentiel est la définition de la cohorte. Ainsi, pour des études sur les paramètres influençant le développement d'allergies, doit-on choisir des patients prédisposés ou n'ayant pas de passé allergique ? Alors que les infections virales du tractus respiratoire ont été associées au risque de développement de rhinite et d'asthme dans les premières années de vie, ces symptômes à la petite enfance peuvent également devenir protecteurs vers l'âge scolaire. Ces contradictions seraient liées à la non prise en compte d'un facteur important, à savoir l'atopie. La composante allergique d'un syndrome respiratoire est un élément essentiel. Ainsi, dans deux cohortes, l'une au Royaume-Uni et l'autre en Allemagne, l'incidence de la rhinite non-atopique était la même que celle de la rhinite atopique à l'âge scolaire (Kurukulaaratchy et al. 2005). Cependant, le facteur de risque différait significativement entre les deux conditions. Ainsi, la rhinite non atopique a été associée à des infections pulmonaires récurrentes à l'âge de 2 ans ou aux infections du tractus

respiratoire, alors que la rhinite atopique était plutôt liée aux maladies allergiques de l'enfant et de sa famille.

D'autres facteurs importants sont le choix du contrôle négatif, aussi bien que la taille de la cohorte. Le nombre d'individus pris en compte peut évidemment modifier les statistiques de façon drastique. Ainsi, ces études bien que très intéressantes sont souvent complexes à interpréter. C'est pourquoi de nombreux groupes ont choisi d'étudier ces effets dans des modèles animaux mieux contrôlés, notamment au niveau génétique.

C. LA CONTRIBUTION DES MODELES ANIMAUX

Le nombre d'études dans les modèles animaux est assez conséquent, à la fois dans l'asthme et le diabète de type 1. Ils ont permis de mieux comprendre l'influence que pouvaient avoir les infections sur le développement de désordres immunologiques.

a) Infections et asthme

Les modèles animaux d'asthme sont complexes à mettre en place et quelque peu imparfaits. Néanmoins, de nombreuses études ont été publiées. Le modèle le plus fréquemment utilisé est l'allergie à l'ovalbumine, dans lequel on observe un recrutement d'éosinophiles dans les poumons, une hausse des IgE et une hyperréactivité pulmonaire, symptômes proches de ceux de l'asthme. Le principe est simple, on immunise les souris avec de l'ovalbumine et de l'alum, et on représente l'antigène à intervalles réguliers (provocation) pour induire une intolérance.

Ainsi, Tükenmez *et al.* observent une diminution des IgE après immunisation avec l'ovalbumine lorsque les souris sont préimmunisées avec *Mycobacterium bovis* juste après leur naissance (Tukenmez et al. 1999). Cet effet est accompagné de changements histopathologiques atténués (Ozdemir et al. 2003). Les mycobactéries n'influencent pas la sensibilisation à l'antigène mais exercent des effets bénéfiques quand elles sont administrées chez des souris déjà immunisées ou qui ont déjà développé une inflammation allergique. En effet, l'administration intranasale de BCG après une première provocation diminue l'hyperréactivité pulmonaire, l'éosinophilie et les niveaux d'IL-5 dans les lavages bronchopulmonaires (Hopfenspirger et al. 2002). D'autres espèces bactériennes sont également protectrices. Ainsi, l'administration de *Listeria monocytogenes* (Li et al. 2003), *Propionibacterium acnes* (Braga et al. 2003), *Bordetella pertussis* (Kim et al. 2004b) et *Chlamydia* (Han et al. 2004) protègent dans différents modèles d'asthme.

Le rôle bénéfique de la microflore a également été vérifié puisque l'administration d'antibiotiques qui modifient sa composition est liée à une augmentation des IgE et des réponses Th2 (Bashir et al. 2004). De la même façon les bactéries probiotiques comme *Lactococcus* sont capables de moduler les réponses immunitaires et de protéger du développement de maladies allergiques (Fujiwara et al. 2004, Repa et al. 2003).

Nous avons pu noter l'effet bénéfique des infections dans les maladies allergiques. En est-il de même pour les maladies autoimmunes ? En effet, d'après les données épidémiologiques, l'incidence de ces maladies suit celle des maladies allergiques. Néanmoins, il n'existe pas de travaux étudiant les éventuelles infections de patients atteints de troubles autoimmuns. Les seules données disponibles ont été apportées par les modèles animaux.

b) Infections et diabète

Tout comme dans l'asthme, il existe de nombreux modèles. L'un d'entre eux est particulièrement intéressant car spontané. Il s'agit de la souris NOD qui développe un diabète de type 1 à partir de 12 semaines d'âge. Ainsi, il a été montré que les mycobactéries étaient capables d'inhiber le développement du diabète chez cette souris (Harada et al. 1990, Martins et al. 1999). Un des composés de ces mycobactéries, hsp65 (heat shock protein 65), inhibe également la pathologie à long terme (Elias et al. 1991). De la même façon, l'adjuvant complet de Freund (CFA) qui contient des extraits mycobactériens protège la souris NOD et le rat BB, un autre modèle de diabète spontané (Sadelain et al. 1990b, Sadelain et al. 1990a). De plus, la protection peut être transférée par des cellules spléniques issues de souris préalablement traitées par du CFA (Qin et al. 1992).

Les infections parasitaires comme portées par *Schistosoma mansoni* réduisent également le diabète (Cooke et al. 1999). Lors du cycle de ce parasite, les œufs sont déposés dans le foie où ils induisent la formation de granulomes caractérisés par la présence d'un grand nombre d'éosinophiles. Ainsi, ces œufs, et même leurs extraits solubles, confèrent une protection totale s'ils sont injectés à 6 semaines d'âge (Zaccone et al. 2003).

c) Les virus, agents déclencheurs ?

Les contradictions dans le rôle protecteur des virus se retrouvent également dans ces études animales. D'ailleurs, certains avancent que ces agents pourraient déclencher les troubles chez des personnes prédisposées.

Ainsi, des études chez l'animal, indiquent que l'infection avec le paramyxovirus peut non seulement induire une bronchiolite aiguë mais entraîne également une réponse chronique

avec une hyperréactivité respiratoire conduisant au développement de l'asthme (Walter et al. 2002). Le virus de la grippe A est lui aussi capable d'induire des symptômes allergiques (Dahl et al. 2004). Cependant, en fonction du moment d'administration de ce dernier, il peut également protéger en développant des réponses de type Th1 (Wohlleben et al. 2003).

Il a longtemps été avancé que le diabète de type 1 était déclenché par une infection virale (Yoon 1991). Mais il semble qu'au final la cause soit beaucoup plus complexe. Bien que chez l'homme, la corrélation soit difficile à démontrer, un certain nombre de virus sont capables d'induire le diabète chez l'animal. Ainsi, le virus de l'encéphalomyélite (EMCV) induit un diabète chez différentes souches de souris (Craighead et al. 1968). L'effet semble être lié à un effet cytolytique du virus. Par ailleurs, des souris transgéniques dont les cellules β pancréatiques expriment la glycoprotéine du LCMV ou l'hémagglutinine du virus de la grippe développent un diabète après infection virale (Oldstone et al. 1991, Roman et al. 1990). Une des hypothèses du rôle déclenchant de ces virus est le mimétisme moléculaire. En effet, la ressemblance entre un antigène exogène et un autoantigène du soi pourrait entraîner une réaction contre l'organisme. Ainsi, dans le cas du diabète de type 1, les protéines virales pourraient partager une séquence avec les autoantigènes des cellules β , ce qui entraînerait une perte de tolérance vis-à-vis du soi.

Le rôle des virus demeure encore complexe à définir. Il est probable qu'en fonction du moment de l'infection et de l'environnement immunologique, les effets soient variables.

Ainsi, les infections peuvent avoir un rôle protecteur contre les troubles immunologiques. Evidemment, cette loi n'est pas universelle et les réponses varient en fonction des agents mis en jeu. Parmi les récepteurs détectant les infections, les TLR sont en première ligne pour moduler ces désordres immunologiques. Ainsi, quelques études ont commencé à s'intéresser aux réponses que des structures purifiées de pathogènes pouvaient induire et à la modulation de la balance Th1/Th2 qui en découle.

2. LES TLR EN SITUATION PATHOLOGIQUE

De plus en plus d'études soulignent le rôle des TLR dans la réponse immune mais également dans différentes pathologies. En effet, tout comme les infections précédemment, ils peuvent moduler les réponses et apporter une protection. Ainsi, différents travaux chez l'homme et la souris ont permis d'apporter une dimension régulatrice à ces molécules.

A. LE POTENTIEL MODULATEUR DES TLR

Pour étudier le phénomène, plusieurs stratégies ont été mises en place : (1) l'analyse de l'association entre polymorphismes TLR et pathologies, (2) la description de l'implication de ces récepteurs grâce à des souris déficientes et (3) la stimulation des TLR au sein de modèles animaux.

a) Polymorphisme et désordres immunologiques

Beaucoup de travaux se sont intéressés à TLR4. Bien que les premières études n'aient pas démontré d'associations entre polymorphisme et développement de maladies allergiques, elles soulignèrent le rôle de celui-ci dans la sévérité de ces désordres (Raby et al. 2002, Yang et al. 2004a). Néanmoins, le polymorphisme TLR4 (Asp299Gly) a été corrélé à une augmentation de l'incidence de l'asthme chez les enfants suédois et à une augmentation plus générale de l'atopie chez les enfants asthmatiques (Fageras et al. 2004, Yang et al. 2004a). D'une façon intéressante, une étude a montré que le polymorphisme du corécepteur de TLR4, CD14 est associé chez l'adulte à un risque réduit d'asthme avec des niveaux limités d'IgE (Sharma et al. 2004).

Par ailleurs, un polymorphisme de TLR2 peut être associé à une augmentation du risque de développer de l'asthme et des allergies chez les enfants de fermiers (Ahmad-Nejad et al. 2004, Eder et al. 2004). Par contre, il n'existe pas d'association dans une étude sur une population japonaise (Noguchi et al. 2004). Parmi, les récepteurs associés à TLR2, la modification Ser249Pro sur TLR6 a été corrélée à une diminution du risque asthmatique dans une population afro-américaine (Tantisira et al. 2004). TLR9, par contre a été associé à une augmentation du risque d'asthme chez des ethnies américaines (Lazarus et al. 2003). Cependant, ce résultat n'a pas été retrouvé dans la population japonaise (Noguchi et al. 2004). Par contre, deux polymorphismes de TLR10 ont été associés à un risque accru d'asthme (Lazarus et al. 2004).

Ce type de travail a également été réalisé dans le diabète mais c'est encore un domaine d'investigation peu développé au regard de ce qui se fait dans l'asthme. Ainsi, un polymorphisme de TLR3 a été associé chez une population noire sud-africaine atteinte de diabète de type 1 (Pirie et al. 2005a). Par contre, aucune association entre polymorphisme TLR2 et TLR4 n'a pu être trouvée chez des patients basques atteints de diabète (Santin et al. 2006b). Cependant, dans une population coréenne, une modification de TLR2 entraîne une protection contre la maladie (Park et al. 2004). Par ailleurs, un polymorphisme de TLR4 a été rattaché à une diminution du diabète de type 2 (Rudofsky, Jr. et al. 2004).

Les associations entre polymorphismes et pathologies sont difficiles à analyser. En effet, le plus souvent, les corrélations positives ne sont attestées que dans des ethnies particulières, très restreintes. Ainsi, la composante génétique semble essentielle. C'est pourquoi il est peut-être plus facile d'évaluer ces points dans des populations avec peu de brassages génétiques. Les études dans des modèles animaux ont donc permis d'étayer les connaissances dans le domaine.

b) TLR et modèles d'asthme

Tout comme les études précédentes, les travaux sur les traitements de souris par des agonistes TLR ont apporté leur lot de contradictions. Ainsi, on savait depuis longtemps que le LPS d'*Escherichia coli*, un ligand de TLR4, augmentait la synthèse d'IgE *in vitro* chez la souris et, d'un autre côté, inhibait le développement de l'asthme chez le rat (Purkerson et al. 1994). Ce rôle protecteur fut ensuite confirmé chez la souris (Gerhold et al. 2003, Gerhold et al. 2002). Cependant, son action était fortement dépendante de la cinétique de traitement par rapport à celle de l'allergène. Ainsi, le LPS administré après l'immunisation entraînait un effet protecteur, alors qu'il exacerbait la maladie s'il était injecté alors que le phénotype asthmatique était établi. Néanmoins, le LPS pouvant être toxique, d'autres molécules ont été proposées. Ainsi, le lipide A, molécule issue du LPS de *Salmonella minnesota* R595, a été proposé pour ses effets modulateurs moins toxiques (100 à 10000 fois moins que le LPS) et fait l'objet de nombreuses investigations en thérapie (Kaisho et al. 2004).

Par ailleurs, l'activation de TLR2 par son ligand synthétique, le Pam₃Cys induit une forte réponse Th2 qui aggrave l'asthme expérimental (Redecke et al. 2004). Néanmoins, une deuxième étude a conféré un caractère protecteur à ce même agoniste (Patel et al. 2005). Ces contradictions pourraient s'expliquer par les différentes souches de souris utilisées mais également par la cinétique de traitement. En effet, cet agoniste de TLR2 est administré pendant la phase d'immunisation dans la première étude, alors qu'il est délivré pendant la provocation dans le deuxième travail.

Beaucoup de travaux ont porté sur TLR9. En effet, sa stimulation par des ODN CpG induit une forte réponse Th1 qui inhibe le phénotype allergique, ainsi, l'ADN CpG fut une des premières substances testée pour ses effets thérapeutiques dans les modèles animaux d'allergie. Ainsi, un traitement par ce produit juste après l'immunisation, est très efficace pour atténuer les réactions d'hypersensibilité comme l'asthme, la conjonctivite allergique et la rhinite allergique (Horner et al. 2001). Utilisé comme adjuvant avec l'allergène, il permet un

effet anti-allergique. On observe alors une augmentation de l'effet protecteur quand l'ADN CpG est administré avec l'allergène (Tighe et al. 2000, Horner et al. 2001).

Par ailleurs, les agonistes de TLR7 et 8 de la famille des imidazoquinolines, à savoir Imiquimod et Resiquimod (R848), ont été montrés comme protecteurs dans l'asthme (Jin et al. 2006, Quarcoo et al. 2004, Moisan et al. 2006). Ainsi, deux articles ont montré chez deux souches de souris différentes qu'un traitement par le R848 inhibe l'inflammation et l'hyperréactivité des voies respiratoires en modulant l'augmentation des réponses Th2 (Quarcoo et al. 2004). Récemment, cet agoniste a prouvé son efficacité à long terme dans un modèle d'asthme chronique en inhibant le remodelage des voies respiratoires (Camateros et al. 2007).

c) TLR dans le diabète

Quelques réponses ont également été apportées dans le diabète. Néanmoins, le nombre d'études reste encore limité. Il en existe qui confèrent aux TLR un rôle protecteur mais d'autres qui soulignent leur rôle déclencheur.

Ainsi, un des composés des mycobactéries, la protéine Hsp65 protège les souris NOD du développement du diabète de type 1 à long terme (Elias et al. 1991). L'homme possède un homologue de cette protéine, connu sous le nom d'Hsp60. D'une manière intéressante, le peptide p277 dérivé de Hsp60 confère une protection équivalente (Quintana et al. 2000). L'action protectrice de ce dernier serait liée à sa capacité d'orienter la réponse vers le phénotype Th2. De plus, hsp60 est un agoniste de TLR2 et TLR4 (Ohashi et al. 2000, Vabulas et al. 2001). Le peptide p277 actuellement en essai clinique de phase III est capable de maintenir une production d'insuline qui limite son apport exogène (Raz et al. 2001). Cependant, au cours de cette étude, le vecteur vide utilisé en tant que contrôle de celui contenant le peptide p277 conférait également une protection. Ainsi, fut souligné le rôle protecteur de l'ADN dans ce modèle. Néanmoins, une étude ultérieure contraria ces résultats puisqu'il fut prouvé que l'administration de différentes classes d'ODN CpG ne parvenait pas à protéger les souris du diabète (Lee et al. 2005).

La plupart des travaux décrits dans la littérature se sont plutôt intéressés au développement des maladies autoimmunes et, notamment au rôle des virus. Ainsi, dans un modèle d'étude du diabète, l'utilisation d'une souris transgénique exprimant une glycoprotéine du LCMV (lymphocytic choriomeningitidis virus) sous le contrôle du promoteur de l'insuline de rat a permis de montrer un développement de la maladie quand elle était traitée par le Poly(I :C) (Lang et al. 2005). De la même façon, le traitement d'un autre

modèle de souris transgénique par cette molécule déclenchait le diabète alors que le LPS, le peptidoglycane et les ODN CpG n'y parvenaient pas (Wen et al. 2004).

Outre les virus et leurs constituants agonistes des TLR, certaines autres molécules ont été impliquées dans le développement de maladies autoimmunes, notamment par l'intermédiaire des lymphocytes B. Ainsi, Leadbetter *et al.* ont démontré que l'activation simultanée du BCR (B cell receptor) et de TLR9 sur les B rendaient une sous-classe d'immunoglobulines (IgG2a) reconnaissable par ces cellules comme non-soi (Leadbetter et al. 2002). Ainsi, la présence d'IgG2a anti-ADN à faible taux pourrait être suffisante pour déclencher une réponse autoréactive exacerbée.

Récemment, une incidence de diabète retardée chez les souris NOD déficientes pour TLR2 a été observée, montrant que ce récepteur est impliqué dans l'initiation de la maladie. Ainsi, les cellules β en apoptose stimuleraient les cellules T diabétogènes via TLR2 (Kim et al. 2007). Le rôle protecteur des TLR dans le diabète est encore controversé mais il existe quelques éléments dans la littérature suggérant que l'administration de leurs agonistes au bon moment pourrait moduler la réponse autoimmune.

B. CIBLES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES DANS L'ASTHME

L'asthme est une maladie immunologique dont l'incidence n'a cessé de croître tout au long des vingt dernières années. Dans les pays industrialisés, elle a presque doublé depuis 1980. En France, on compte 3,5 millions d'asthmatiques, dont un tiers a moins de 15 ans. L'asthme est très souvent d'origine allergique. Selon les dernières études épidémiologiques, 80% des asthmes de l'enfant et 50% de ceux de l'adulte ont cette origine. Ainsi, les recherches s'orientent de plus en plus vers les mécanismes liés à ces réponses immunologiques, afin de trouver de nouveaux traitements.

C'est pourquoi, avant de nous intéresser à l'action potentielle des TLR dans ce modèle, nous allons essayer de comprendre ces réponses asthmatiques et de décrire les différents acteurs sur lesquels on peut agir pour contrer le phénotype allergique. Pourquoi se développe une réponse asthmatique ? Quels sont les principaux événements ?

a) Aspects immunologiques de la réponse asthmatique

L'asthme est causé par des facteurs environnementaux, tels l'exposition aux antigènes et les infections, chez des individus prédisposés génétiquement. Il est estimé qu'au moins une dizaine de gènes polymorphiques régule l'asthme, en contrôlant la réponse inflammatoire, les

IgE, la production de cytokines et chimiokines ainsi que la fonction respiratoire et le remodelage des voies aériennes (Cookson 1999).

① *Quand respirer devient difficile : causes physiologiques*

Les manifestations cliniques de l'asthme sont le résultat de trois événements physiopathologiques sur les voies respiratoires : obstruction réversible, réponse bronchique à des stimuli physiques et chimiques augmentée (hyperréactivité respiratoire) et inflammation (McFadden, Jr. et al. 1992).

L'obstruction et l'hyperréactivité respiratoires sont dues à un certain nombre de processus pathologiques. Ainsi, le lumen des voies respiratoires se rétrécit à cause de l'œdème qui touche la membrane de celles-ci, à l'infiltration des leucocytes et à l'hypertrophie et la contraction du muscle lisse. De plus, la forte production de mucus par les cellules gobelet de l'épithélium bronchique renforce cette obstruction (O'Riordan et al. 1992). Des changements mineurs dans le diamètre de ces voies diminuent le flux d'air et augmentent leur résistance (Wiggs et al. 1992). L'élasticité pulmonaire se réduit. La réversion partielle ou totale de cette obstruction soit spontanément, soit après thérapie bronchodilatatrice est tout d'abord due aux effets sur la contraction du muscle lisse.

Des études histologiques des voies respiratoires ont apporté très tôt des informations quant aux événements se déroulant dans les poumons. Ainsi, elles révélèrent une desquamation étendue de l'épithélium, une hypertrophie des cellules gobelet, des glandes muqueuses et du muscle lisse. On observa également une accumulation de mucus, d'éosinophiles, de protéines dérivées de ces derniers et de cellules mononucléées principalement des lymphocytes (Saetta et al. 1991).

② *Cascade allergique*

La réaction d'asthme se déroule en trois phases appelées phase d'induction, réaction asthmatique précoce et réaction asthmatique tardive. Chacune de ces phases est caractérisée par la production de nombreux médiateurs. Les causes de cette maladie demeurent inconnues mais certains facteurs environnementaux l'influencent (Figure 16).

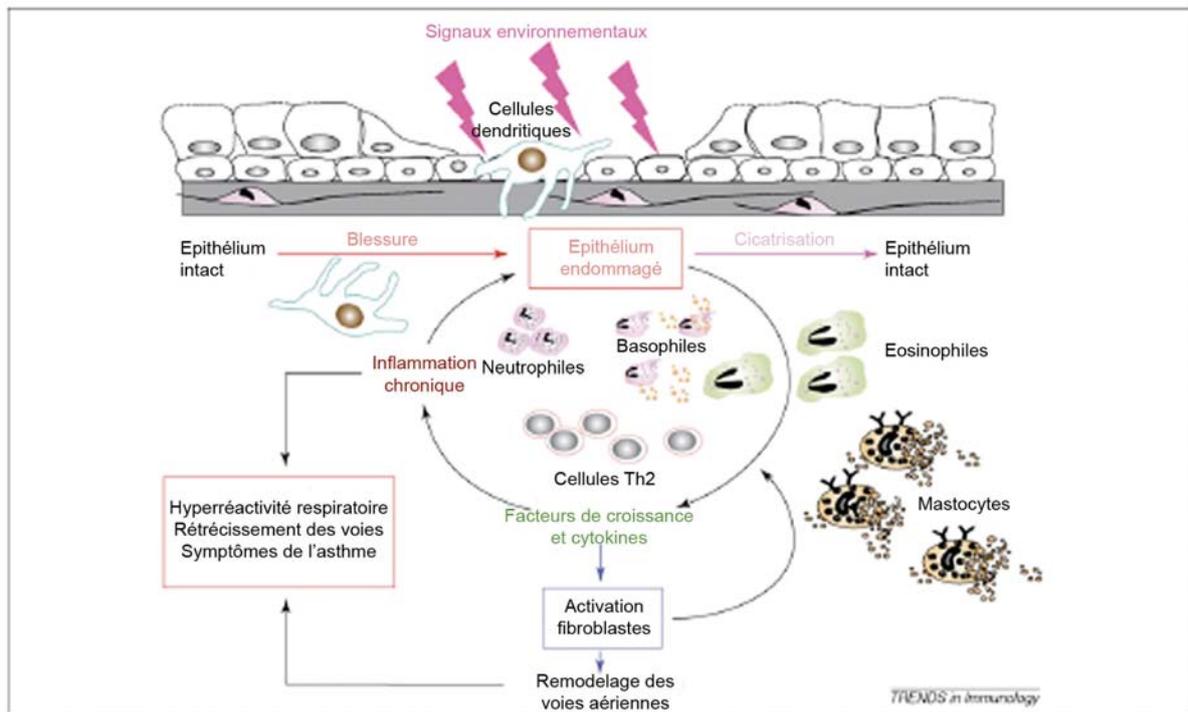


Figure 16 : Représentation schématique de la pathophysiologie de l'asthme. Une gamme de facteurs environnementaux interagit avec l'épithélium et les cellules dendritiques pour diriger une réponse inflammatoire Th2, avec une activation des mastocytes et un recrutement d'éosinophiles, basophiles et neutrophiles. Les facteurs de croissance et les cytokines de ces cellules activent également les fibroblastes afin de réorganiser la matrice extracellulaire permettant le remodelage des voies aériennes, leur rétrécissement et les symptômes de l'asthme. Les dommages à l'épithélium avec les cytokines et les facteurs de croissance soutiennent l'inflammation. D'après S.T. Holgate *Trends in immunology* 2007.

La maladie se développe suivant une cascade d'événements allergiques. Pendant la phase d'induction, les allergènes inhalés qui échappent à l'élimination mucociliaire sont pris en charge par les CPA qui sont distribuées tout le long du tractus respiratoire de la muqueuse nasale aux poumons. Ces cellules migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques où les antigènes sont apprêtés et présentés aux lymphocytes T et B (Holt 2000). L'activation des cellules T helper (Th) par les APC conduit à la production de cytokines variées qui régulent la commutation de classe des lymphocytes B pour leur production d'IgE (Corry et al. 1999). Les cytokines produites sont nombreuses : IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- γ , TNF- α , TNF- β et GM-CSF. Parmi celles-ci, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 sont les plus importantes dans le développement de l'asthme (Kay 2003). L'IL-4 et l'IL-13 jouent un rôle dans la production des IgE, et en coopération avec l'IL-9, sont importantes pour le développement des mastocytes, la surproduction de mucus et l'hyperréactivité respiratoire. L'IL-5, quant à elle, joue un rôle dans l'accumulation des éosinophiles.

Vient ensuite la réaction asthmatique précoce où le type cellulaire crucial est le mastocyte (Venkatesha et al. 2005). Une fois synthétisées, les IgE circulent dans le sang avant de se lier au récepteur de haute affinité FcεRI porté par les mastocytes dans les tissus et les basophiles du sang périphérique. Après réexposition, les allergènes se lient directement aux IgE liées à la membrane du mastocyte causant l'activation des voies de signalisation conduisant à la sécrétion de médiateurs préformés tels l'histamine, à la synthèse des prostaglandines et leucotriènes et à la transcription de cytokines (TNF-α) et facteurs de croissance (Vascular endothelial growth factor (VEGF)) (Turner et al. 1999). Une fois sécrétée, l'histamine exerce un effet sur le muscle lisse (contraction), les cellules endothéliales, la perméabilité des capillaires, les terminaisons nerveuses et la sécrétion de mucus (Bloemen et al. 2007). Les prostaglandines et les leucotriènes ont une action variée dans l'asthme comme le recrutement de cellules inflammatoires, la bronchoconstriction et la sécrétion de mucus. Le TNF-α, quant à lui, augmente l'expression des molécules d'adhésion épithéliales et endothéliales et l'hyperréactivité respiratoire. Les mastocytes produisent également une large gamme d'autres cytokines (IL-3, GM-CSF, IL-5, IL-6, IL-8, IL-16) et chimiokines (Macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α), Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) et eotaxin-1) permettant le recrutement et la survie d'autres types cellulaires, notamment des éosinophiles (Bradding et al. 2006, Prussin et al. 2006). En collaboration avec les mastocytes, les basophiles jouent également un rôle précoce dans la réponse.

Arrive alors la phase de réaction asthmatique tardive, caractérisée par une inflammation excessive des voies respiratoires qui résulte de changements structurels induits par les différents médiateurs dérivés des cellules inflammatoires, telles les éosinophiles, neutrophiles, cellules T, macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales, cellules du muscle lisse et cellules épithéliales bronchiques.

③ *Des cellules au service de l'inflammation*

Les éosinophiles occupent un rôle central dans cette inflammation. Ils peuvent être activés par un certain nombre de facteurs incluant IL-3, IL-5, GM-CSF, les chimiokines CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL13 et le facteur d'activation des plaquettes (PAF) (Prussin et al. 2006). Ce phénomène conduit à la production des protéines MBP (major basic protein), ECP (eosinophil cationic protein), EDN (eosinophil-derived neurotoxin) et EP (eosinophil peroxydase) (Pearlman 1999). Ensemble, ces molécules peuvent infliger des

dommages aux cellules endothéliales des voies respiratoires, à la matrice extracellulaire et aux neurones et contribuer au développement d'une inflammation excessive, notamment *via* la production de grandes quantités de radicaux libres (Maddox et al. 2002).

Les neutrophiles par la production de leurs médiateurs (leucotriènes, protéases, produits anti-microbiens, radicaux libres, oxyde nitrique) jouent également un rôle important en favorisant le rétrécissement des voies respiratoires, la sécrétion de mucus et la réponse des cellules du muscle lisse (Gibson et al. 2001).

Les lymphocytes T, notamment Th2 sont impliquées dans la pathologie asthmatique par la sécrétion des cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 et GM-CSF qui jouent un rôle dans les effets inflammatoires. Pendant la phase d'induction, les cytokines Th2 sont responsables de la production des IgE, par contre, dans les stades tardifs de la maladie, elles contribuent à l'inflammation. La production des chimiokines CCL1, CCL2, CCL11 et CCL17 (thymus and activation-regulated chemokine (TARC)) par ces cellules amplifie le recrutement des cellules CD4⁺ Th2 (Teran 2000).

Les macrophages et les cellules dendritiques, bien qu'ils jouent un rôle au tout début dans la présentation de l'allergène, sont également importants pour le recrutement des cellules inflammatoires par la production de molécules du type de celles décrites précédemment. Par ailleurs, les cellules endothéliales, en exprimant en plus des molécules d'adhésion favorisent l'arrêt et l'infiltration des cellules, contribuant à une augmentation de l'inflammation (Bloemen et al. 2007).

④ *Le remodelage des voies respiratoires*

L'inflammation des voies respiratoires peut conduire à leur restructuration, à savoir un épaissement de la membrane, une fibrose subépithéliale, une métaplasie, une hypertrophie et une hyperplasie de leurs cellules, une rupture du cartilage et une angiogenèse (Black et al. 2002) (Figure 17).

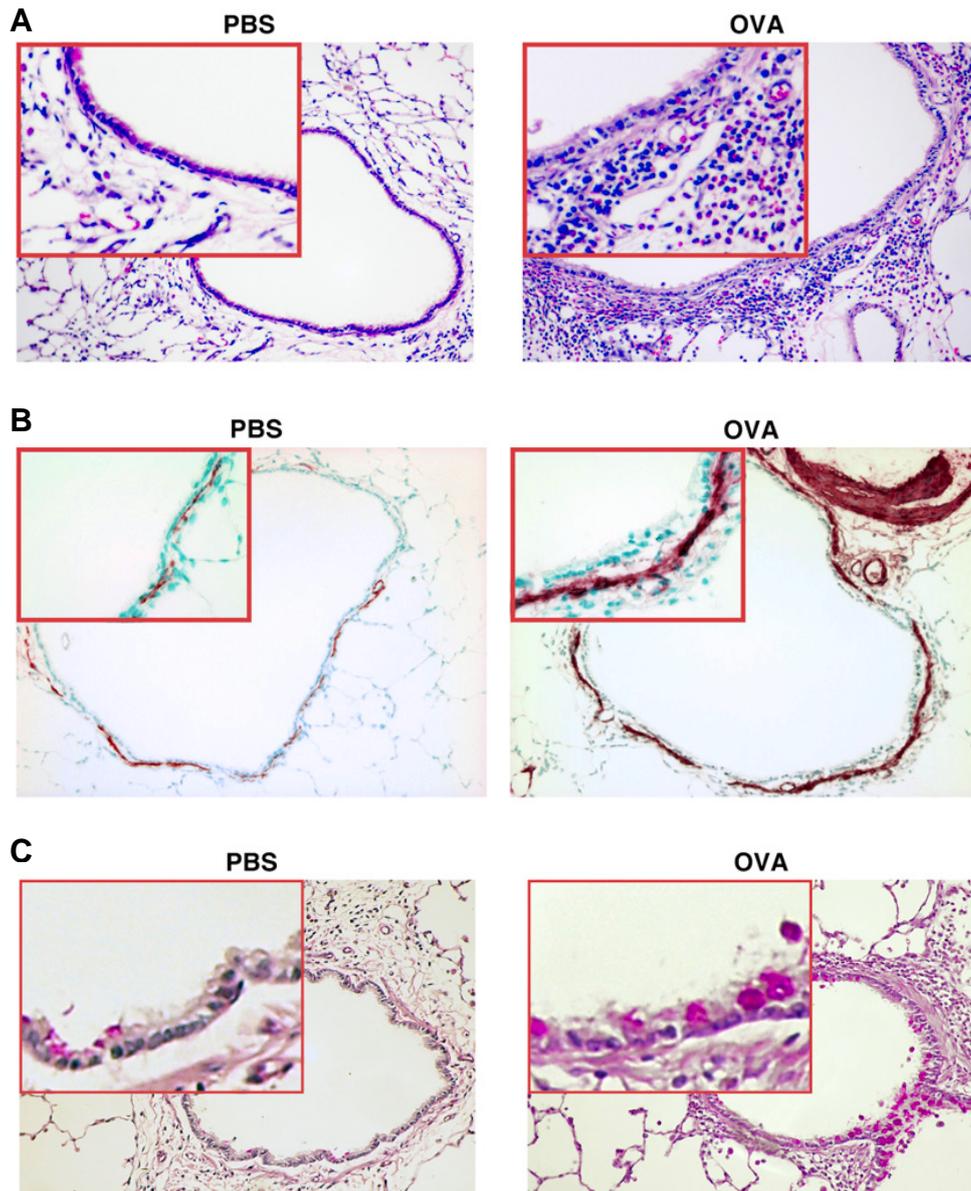


Figure 17 : Quelques paramètres histologiques caractéristiques de l'asthme allergique chez l'animal. (A) Sections pulmonaires colorées à l'hématoxyline et l'éosine 48 heures après provocation avec du PBS ou de l'OVA où l'on observe une forte infiltration cellulaire dans le groupe traité. (B) Epaissement du muscle lisse (coloration de l'actine- α en rouge) chez le groupe traité par l'OVA. (C) Hyperplasie des cellules gobelet (en magenta, colorées par l'acide de Schiff périodique (PAS+)). D'après P. Camateros *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2007.

Différents facteurs solubles contribuent à ce remodelage, notamment les metalloprotéinases (MMP) sécrétées par les cellules inflammatoires, qui participent à la réorganisation de la matrice extracellulaire (MEC), mais aussi à l'altération de l'angiogenèse et aux processus d'hyperplasie des muscles lisses (Nagase et al. 1999). La production du TGF- β par les macrophages, les cellules épithéliales, les éosinophiles stimulent les

fibroblastes à produire de nombreuses protéines de la MEC et diminue la synthèse de plusieurs MMP (Ignatz et al. 1986).

L'IL-4 et l'IL-13 ont des effets similaires au TGF. Ainsi, l'activation des fibroblastes du poumon est associée à une augmentation du dépôt de collagène et de fibronectine causant un épaissement de la membrane basale et l'apparition d'une fibrose subépithéliale diffuse (Doucet et al. 1998). Les chimiokines sont également impliquées dans ce phénomène. Ainsi, CCL2 provoque la sécrétion de TGF- β , le dépôt de collagène par les fibroblastes du poumon et le recrutement des cellules Th2 (Gharaee-Kermani et al. 1996, Carr et al. 1994).

Par ailleurs, les autres molécules sécrétées par les cellules inflammatoires, telles le VEGF, les prostaglandines, les leucotriènes participent également à ce remodelage, augmentant ainsi la pathologie.

b) Régulation et potentiel thérapeutique

Les maladies allergiques sont causées par des réponses Th2 exagérées chez des individus prédisposés génétiquement. Ainsi, le principal mécanisme protecteur sera de contrer ces réponses, soit en activant des réactions Th1 qui inhiberont les Th2 ou en bloquant les cellules Th2.

① *Modulation de la balance Th1/Th2*

En effet, les cellules Th1 sont capables de réguler négativement les réponses Th2 en inhibant le développement et la prolifération des cellules Th2 et en modulant la production d'IgE réciproquement par l'IL-4 et l'IFN- γ (Mosmann et al. 1989). Des clones de cellules T spécifiques de l'antigène dérivés du sang périphérique d'individus non allergiques sont capables de produire des cytokines Th1 (Wierenga et al. 1991, Marshall et al. 1993). Par ailleurs, des patients avec une sclérose multiple, une maladie autoimmune caractérisée par la surproduction de cytokines Th1 par les cellules T spécifiques de la myéline et par une forte capacité de production d'IL-12, sont protégés du développement de l'allergie (Oro et al. 1996, Tang et al. 1998). Enfin, l'administration intra trachéale d'IL-12, ou d'IL-12 plus IL-18 inhibe le développement de maladies allergiques et de l'hyperréactivité respiratoire (Gavett et al. 1995, Hofstra et al. 1998).

Néanmoins, ces réponses Th1 ne sont pas toujours protectrices et peuvent même exacerber l'asthme. Ainsi, les cellules T spécifiques de l'antigène dans le sang périphérique et les poumons des patients asthmatiques produisent également l'IFN- γ qui semble contribuer à

la sévérité de la maladie (Corrigan et al. 1990, Cembrzynska-Nowak et al. 1993). De plus, le transfert adoptif de cellules Th1 chez la souris ne contre pas les cellules effectrices Th2 mais génère plutôt des réponses inflammatoires dans les poumons (Hansen et al. 1999). Par ailleurs, à l'inverse des patients asthmatiques, les individus non allergiques sont caractérisés par l'absence d'inflammation et de cellules Th1 dans les poumons. Ces résultats suggèrent que d'autres mécanismes régulateurs, distincts de l'orientation des réponses vers le phénotype Th1, sont aussi impliqués dans la suppression de l'inflammation et la protection contre les maladies allergiques.

Pour mieux comprendre et caractériser la nature de ces réponses, trois approches expérimentales ont été mises en place. La première a été d'examiner les modèles animaux de tolérance aux antigènes exogènes. La deuxième a étudié les individus non-allergiques qui ont été exposés aux allergènes et caractérisé les réponses induites. Enfin, la troisième s'est intéressée aux mécanismes immunologiques induits par les immunothérapies avec des allergènes pour traiter les patients. Grâce à ces trois approches, les modèles expérimentaux ont souligné le rôle inhibiteur des lymphocytes T régulateurs dans le développement de l'asthme.

② *Le rôle des lymphocytes T régulateurs*

Différents sous-types de lymphocytes T régulateurs (Treg) ont été décrits, incluant ceux qui se développent dans le thymus, également appelés Treg naturels CD25⁺, et ceux qui se forment en périphérie, les Treg inductibles.

Les Treg dits naturels se développent dans le thymus et constituent 5 à 10% des lymphocytes CD4⁺ de la périphérie. Ces cellules expriment constitutivement la molécule CD25 (récepteur de l'IL-2), la molécule CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4), le GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) et le facteur de transcription Foxp3 (forkhead box protein 3) (Sakaguchi 2005). Néanmoins, le marqueur CD25 n'est pas spécifique de ces cellules car il est aussi largement exprimé par les CD4⁺ activés, tout comme GITR et CTLA-4. Cependant, le marqueur Foxp3 est assez restreint à ce sous-type cellulaire et corrèle avec leur capacité suppressive, au moins chez la souris (Fontenot et al. 2003a). Ces cellules se développent dans le thymus probablement par des mécanismes qui impliquent des interactions TCR-ligand et d'autres signaux additionnels encore peu élucidés, mais distincts de ceux nécessaires pour la sélection des lymphocytes T non-régulateurs (van Santen et al. 2004). Le répertoire TCR et la spécificité des Treg sont communs avec ceux des lymphocytes T non-régulateurs, et une large proportion des TCR des Treg sont auto-réactifs (Hsieh et al.

2004). Le mécanisme de sélection positive des Treg dans le thymus ne semble pas impliquer le gène AIRE (autoimmune regulator) qui serait plutôt impliqué dans la délétion clonale des thymocytes auto-réactifs et non dans la sélection positive des Treg (Anderson et al. 2005). Par contre, un facteur qui peut être important dans ce phénomène est le facteur TSLP (thymic stromal lymphopoietin) fortement exprimé par les corpuscules de Hassall dans la médulla thymique qui induit l'expression de Foxp3 par les thymocytes et l'expansion de ces derniers (Watanabe et al. 2005). Ce mécanisme est valable pour l'émergence des Treg naturels, par contre on ne sait pas comment se développent les Treg inductibles en périphérie.

Dans la régulation de l'allergie chez les modèles murins, les cellules CD4⁺ (CD25⁺ et CD25⁻) sont capables de supprimer la production d'IgE spécifique de l'antigène (Curotto de Lafaille et al. 2001). Par ailleurs, l'éosinophilie pulmonaire et l'hyperréactivité respiratoire sont abrogées chez des souris déficientes pour les lymphocytes T (Gavett et al. 1994). Parmi ces cellules, les Treg ont un rôle bénéfique sur le contrôle de la réponse asthmatique. Ainsi, des études ont montré que des lymphocytes Treg CD4⁺CD25⁺ isolés de patients avec une rhinite présentaient une diminution de leur capacité à supprimer la prolifération et la production d'IL-5 des cellules T comparé à des contrôles sains (Ling et al. 2004). De plus, des travaux chez la souris ont décrit que le transfert adoptif de CD4⁺ de type Th2 après déplétion en CD4⁺CD25⁺, augmentait l'éosinophilie (Jaffar et al. 2004). Plusieurs études ont été réalisées en utilisant la souris double transgénique DO11.10 qui possède des lymphocytes T exprimant un récepteur spécifique de l'OVA qui est ciblée dans l'épithélium pulmonaire (Hadeiba et al. 2003). Cette souris comporte également des infiltrats de cellules CD4⁺CD25⁺ dans les poumons sont capables de prévenir la prolifération des CD4⁺CD25⁻ *in vitro*. Un travail a par la suite montré que le transfert de cellules CD4⁺CD25⁺ provenant de cette souris inhibait l'hyperréactivité respiratoire, l'éosinophilie et les réponses de type Th2, de façon dépendante de l'IL-10 (Kearley et al. 2005). Dans un modèle d'infection chronique par l'helminthe *Heligmosomoides polygyrus*, le nombre de CD25⁺Foxp3⁺ est largement augmenté, ce qui entraîne une réduction de l'inflammation des voies respiratoires (Wilson et al. 2005). Néanmoins, les mécanismes par lesquels ces cellules exercent leur capacité suppressive restent peu connus. En effet, le transfert de ces cellules provenant de souris infectés par *H. polygyrus* de type sauvage ou déficientes pour l'IL-10 confère toujours la protection. Il est cependant possible que l'augmentation de la fréquence des Treg puisse prévenir cette maladie.

A la différence des effets des Treg naturels non spécifiques de l'allergène, les Treg dits « induits » limiteraient les réponses allergiques par des actions spécifiques de l'allergène. Les

mécanismes d'émergence de ces cellules restent cependant peu clairs. On pense que le déclenchement de l'allergie pourrait être dû à un développement insuffisant des Treg induits spécifiques de l'allergène (Umetsu et al. 2002).

③ *L'implication des lymphocytes NKT*

Un autre type cellulaire exprimant CD25 et ayant une activité régulatrice est le lymphocyte NKT (Natural Killer T). Il constitue une sous-population de lymphocytes qui exprime à la fois des marqueurs de T et de NK. Les cellules NKT sont soit CD4⁺, soit CD4⁻ CD8⁻ et une petite population de NKT humains est CD8⁺. Ils expriment un TCR $\alpha\beta$ avec une chaîne α invariante. Chez la souris, le TCR est de type V α 14J α 18 qui s'associe à V β 8.2 alors que chez l'homme, ils expriment la chaîne V α 24J α 18 associée à V β 11 (Park et al. 2000, Bendelac et al. 1997). Les NKT répondent à des antigènes glycolipidiques présentés par la molécule CMH de classe I non polymorphique CD1d, en produisant rapidement de grandes quantités de cytokines telles l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 et l'IFN- γ (Park et al. 2000). Les cellules NKT sont activées par un ligand issu d'éponges marines, l' α -Galactosylcéramide (α -GalCer) présenté par le CD1d et produisent de larges quantités d'IL-4 et d'IFN- γ . La surexpression de la chaîne V α 14J α 18 du TCR chez la souris induit une augmentation de 10 fois de la production d'IL-4 par les cellules CD4⁺ après stimulation par l'anti-CD3 avec un accroissement de la sécrétion des IgE et IgG1 (Bendelac et al. 1996). Ces observations montrent que les NKT peuvent être impliqués dans le développement des réponses Th2. Cependant, les mécanismes précis d'activation des NKT et leurs ligands sont peu connus.

Par la production rapide de cytokines, ces cellules peuvent soit inhiber, soit amplifier les réponses immunes. En effet, il existe de nombreuses situations au cours desquelles les cellules NKT augmentent les réponses comme lors d'infections par *Borrelia burgdorferi*, *Cryptococcus neoformans*, *Plasmodium falciparum* et *Leishmania major*, où ils amplifient la défense de l'hôte (Kumar et al. 2000, Kawakami et al. 2001, Schofield et al. 1999, Duthie et al. 2002, Ishikawa et al. 2000). Ces lymphocytes présentent également des fonctions anti-tumorales (Swann et al. 2004). Néanmoins, ces effets proinflammatoires peuvent contribuer aux inflammations et à des pathologies, comme l'exacerbation de l'asthme. En effet, les souris déficientes pour les cellules NKT peinent à développer un asthme allergique (Akbari et al. 2003, Lisbonne et al. 2003, Bilenki et al. 2004). Ainsi, ils auraient un rôle dans le développement de la pathologie. Néanmoins, une fois activés par l' α -GalCer, ils inhibent le déclenchement de l'asthme (Morishima et al. 2005, Matsuda et al. 2005, Hachem et al. 2005).

Cependant, d'autres études ont montré que chez les souris déficientes pour la β 2-microglobuline, qui n'exprime ni les molécules du CMH I y compris le CD1d, ni les cellules CD8 et NKT, l'hyperréactivité n'est pas affectée (Zhang et al. 1996). Ainsi, le rôle spécifique des lymphocytes NKT dans le développement de l'asthme est complexe. En effet, leur action dans le déclenchement de la réponse asthmatique dépendra de leur statut d'activation mais aussi des collaborations avec les T conventionnelles.

C. MODULATION DANS LE DIABETE DE TYPE 1

Le diabète de type 1, également connu sous le nom de diabète insulino-dépendant, est une maladie autoimmune modulée par les lymphocytes T. Le symptôme majeur est l'hyperglycémie à la suite de la destruction des cellules β du pancréas productrices d'insuline.

a) La cellule β cible de toutes les attaques

Le développement du diabète de type 1 est sous contrôle polygénique, avec un rôle majeur des gènes de CMH de classe II dans la détermination de la résistance ou de la sensibilité à la maladie (Todd 1997). Des études immunohistologiques du pancréas d'animaux diabétiques ont révélé que la maladie était portée par les cellules de type Th1 mais que les $CD8^+$ et les macrophages participaient également à son développement (O'Reilly et al. 1991, Miyazaki et al. 1985). On assiste ainsi à une infiltration rapide et massive du pancréas par ces trois types cellulaires et la cellule β est la cible d'un grand nombre d'attaques (Figure 18).

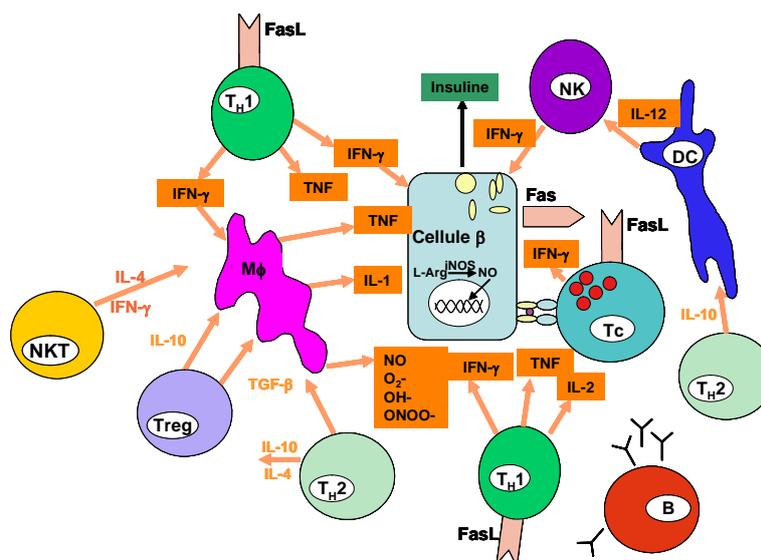


Figure 18 : L'infiltration inflammatoire et son contrôle dans le pancréas diabétique. De nombreux types cellulaires et produits sont retrouvés dans les infiltrats inflammatoires du pancréas diabétique, et de nombreuses cellules peuvent réguler cette réponse. La destruction des cellules β peut se faire *via* des cytokines, des interactions Fas-FasL ou par la perforine et granzymes. Treg, regulatory T cell. D'après A. Cooke, *Nature Immunology* 2001.

Par contre, les modalités de sa destruction, par contact direct avec les lymphocytes T CD8 ou indirectement par les dommages dus aux cytokines, sont encore peu claires. Différentes études ont prouvé que les cellules β étaient très sensibles à l'action des cytokines pro-inflammatoires telles l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 (Campbell et al. 1985, Yang et al. 1994, Mandrup-Poulsen et al. 1987). L'IL-1 inhibe la sécrétion d'insuline, qui entraîne un environnement hyperglycémique qui conduit à une augmentation du stress de la cellule β (Corbett et al. 1993). Ainsi, chaque thérapie empêchant cet influx de cellules inflammatoires dans le pancréas ou la neutralisation des cytokines pro-inflammatoires pourrait soulager la maladie. La présence de cellules Th1, de macrophages, de cellules dendritiques autour de la cellule β contribue à l'inflammation par la sécrétion de cytokines. Par ailleurs, les CD8⁺ et les NK peuvent exercer leur toxicité par contact cellulaire, et les lymphocytes B par la production d'anticorps. En effet, les autoanticorps dirigés contre les antigènes des îlots, incluant l'insuline et la décarboxylase de l'acide glutamique (GAD), peuvent être détectés chez les patients prédiabétiques. Bien qu'il n'y ait pas de preuves de leur relevance physiologique dans le développement du diabète, la présence des trois sous-classes d'auto-anticorps IgG est un marqueur du début de la destruction des îlots de Langerhans. Tout ce petit monde est régulé par les cellules de type Th2 et les Treg, qui par la production de cytokines telles l'IL-10 et l'IL-4 d'une part et de l'IL-10 et du TGF- β d'autre part, contrent l'inflammation.

b) Le modèle de la souris NOD

Dans l'étude du diabète de type 1, nous disposons d'un modèle animal de choix dont la pathologie développée se rapproche fortement du diabète insulino-dépendant humain. Il s'agit de l'un des seuls modèles spontanés de maladies autoimmunes avec une cinétique d'évolution de la pathologie bien décrite.

La NOD a été générée à partir d'une souris femelle atteinte de cataracte. Etant donné que cette affection a été observée chez les patients diabétiques, il a été réalisé des croisements, dont l'un a abouti à une lignée hyperglycémique. Ainsi fut générée la NOD il y a à peu près 25 ans au Japon. Il s'agit d'un modèle particulièrement intéressant puisqu'il partage de nombreuses caractéristiques avec le diabète humain, notamment la prédisposition génétique. La pathogenèse du diabète chez la NOD commence vers 3-4 semaines d'âge avec l'infiltration des cellules dendritiques, macrophages, puis lymphocytes T (CD4⁺ et CD8⁺) et cellules B dans les régions périphériques des îlots de Langerhans (péri-insulite). Cette étape est suivie

d'une destruction lente, progressive et sélective des îlots β producteurs d'insuline par les lymphocytes T à partir de 12 semaines d'âge (Figure 19).

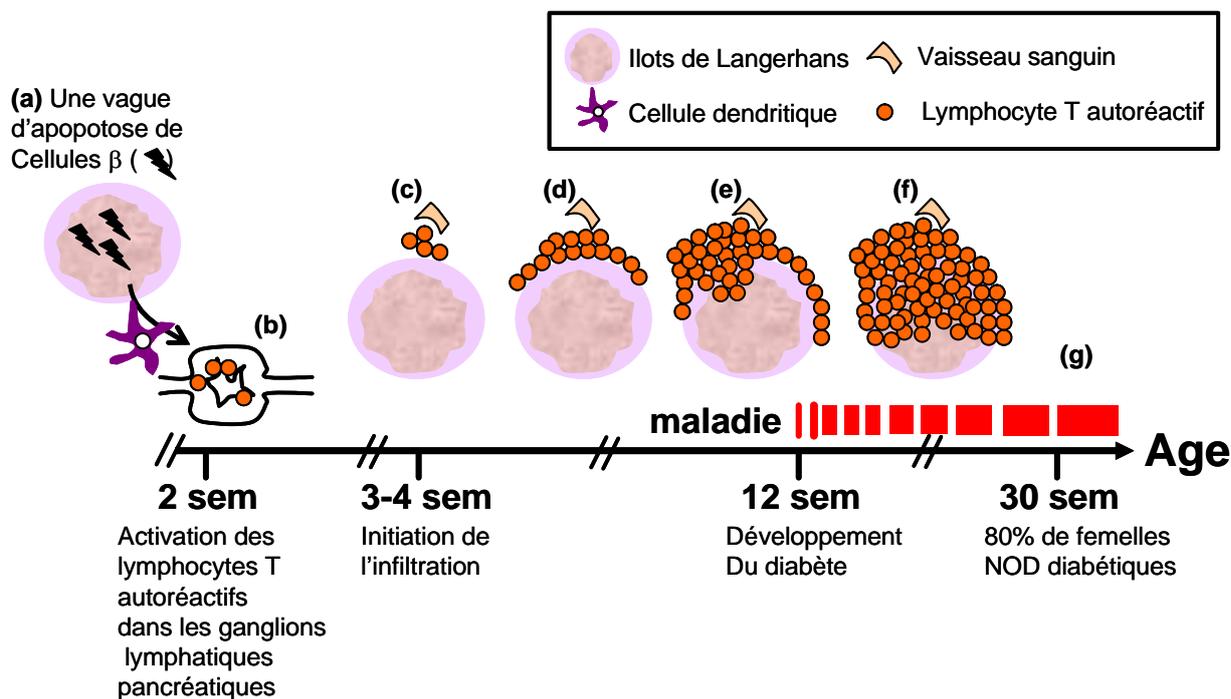


Figure 19 : Développement du diabète autoimmunitaire chez la souris NOD. A deux semaines d'âge environ, une vague d'apoptose sévit parmi les cellules β pancréatiques des îlots de Langerhans, une étape naturelle du développement pancréatique (a). Ceci conduit à la présentation d'antigènes dérivés de cellules β aux cellules dendritiques dans les ganglions lymphatiques pancréatiques et à l'activation des lymphocytes T spécifiques des cellules β (b). A partir de 3 à 4 semaines d'âge, les cellules lymphoïdes commencent à infiltrer le pancréas (c), mais restent au départ en périphérie de l'îlot (d). Avec le temps, l'infiltration devient agressive, et les lymphocytes T infiltrant commencent à détruire les cellules β (e). Quand il ne reste que 10% de la masse de ces cellules, aux environs de 10-12 semaines d'âge (f), la glycémie n'est plus régulée et les souris deviennent diabétiques. A 25-30 semaines d'âge, environ 80% de femelles NOD développent la maladie (g) contre seulement 20 à 30% de mâles. D'après S.L. Cardell, *Clinical and experimental immunology* 2005.

Alors que la péri-insulite non destructrice est observée chez tous les mâles et femelles, ces dernières développent une insulite beaucoup plus importante (80-90%) que leurs homologues masculins (10-40%). Ces pourcentages correspondent également à ceux de l'incidence du diabète chez les deux sexes. Ce dimorphisme sexuel n'est pas retrouvé chez l'homme (Delovitch et al. 1997).

Cette souris est un excellent outil de travail car la pathologie se développe spontanément avec une cinétique bien définie. On peut ainsi plus facilement appliquer des fenêtres de traitements aux différentes phases de la maladie. La phase dite prédiabétique pendant laquelle les symptômes ne se sont pas encore déclarés est le moment de l'intervention de tous les mécanismes régulateurs, portés notamment par les Treg qui contrôlent

l'inflammation jusqu'à ce que le processus pathologique conduise à une destruction des cellules β , aboutissant à une augmentation de la glycémie.

c) Contrôle de l'inflammation pancréatique

Comme nous l'avons précédemment vu, des acteurs cellulaires et moléculaires interviennent dans la pathologie aussi bien que dans la régulation. Les démarches thérapeutiques ont été nombreuses, notamment en ciblant les cytokines délétères, ou en administrant pour contrer leurs effets, mais l'organisme dispose également d'un système de contrôle naturel porté par des cellules dites régulatrices.

① *Déséquilibre de la balance Th1/Th2*

Le diabète de type 1 est souvent classé dans les maladies Th1 à dominante inflammatoire. En effet, les cellules infiltrant les îlots sont majoritairement des cellules T $CD4^+$ ou $CD8^+$ et des macrophages qui expriment de nombreuses cytokines telles l'IFN- γ et l'IL-4 avec une tendance à produire de forts niveaux d'IFN- γ et de faibles niveaux d'IL-4 dans les insulites invasives (Rabinovitch et al. 1995). Ainsi, l'invalidation du facteur de transcription STAT4 qui contrôle le signal IFN- γ diminue fortement le diabète en compromettant la réponse T délétère (Yang et al. 2004b). D'autres études ont montré que les CPA de souris NOD produisent plus de cytokines Th1 que d'autres souches de souris (Marleau et al. 2002, Liu et al. 2003). Ce défaut serait déterminé génétiquement et associé à *Idd4* (Simpson et al. 2003). Ainsi, parmi les inducteurs de réponses Th1, la cytokine IL-12 peut accélérer la maladie (Trembleau et al. 1995). Par contre, l'injection d'IL-4 ou d'autres cytokines Th2 peut protéger (Falcone et al. 1999). Cependant, des données contradictoires existent et l'idée que l'on peut protéger du diabète en diminuant les réponses Th1 et en augmentant les réponses Th2 est un peu simpliste. Néanmoins, tous les facteurs qui favorisent les réponses Th1 par rapport à Th2 peuvent directement affecter la sensibilité au diabète.

② *Les cellules T régulatrices au secours de la cellule β*

Ainsi, les lymphocytes Treg $CD4^+CD25^+$ jouent un rôle dans la pathogenèse du diabète de type 1. En effet, il a été observé chez les souris déficientes pour FoxP3 et les hommes qui présentent une incapacité à générer des cellules régulatrices, une maladie auto-immune qui touche de multiples organes, incluant le diabète insulino-dépendant chez l'homme (Khattari et al. 2003, Fontenot et al. 2003b, Bennett et al. 2001). Par ailleurs, le traitement de souris

déficientes pour FoxP3 avec des lymphocytes Treg syngéniques provenant de donneurs de type sauvage, protège contre les maladies autoimmunes (Fontenot et al. 2003b).

La première preuve de leur rôle direct dans le diabète était l'observation que l'infiltration des cellules β chez la souris NOD se développait pendant des semaines voire des mois avant de causer la maladie. Les données supportant cette idée vinrent d'expériences de transfert qui montrèrent que la souris prédiabétique possédait une population T $CD4^+$ capable de supprimer le développement du diabète quand elle était coinjectée avec des splénocytes syngéniques de donneurs diabétogènes (Hutchings et al. 1990, Boitard et al. 1989). Des études ultérieures ont montré que la délétion d'une population $CD62L^{hi}$ de cette population régulatrice diminuait le potentiel suppresseur (Lepault et al. 2000). Des résultats similaires furent obtenus en utilisant cette fois le marqueur CD25. Ainsi, les cellules $CD4^+CD25^+CD62L^+$ possédaient la plus forte activité régulatrice (Szanya et al. 2002). Ces cellules ont pour origine le thymus, et la thymectomie des souris NOD accélère le développement de la maladie (Dardenne et al. 1989, Herbelin et al. 1998). Plus récemment, il a été montré que la déplétion sélective de cellules régulatrices basée sur les marqueurs CD4, CD25, CD62L et $CD45RB^{low}$ dans un système de transfert adoptif conduit à un contrôle différentiel de l'autoimmunité. La conclusion de ce travail était que les cellules $CD4^+CD62L^+$ contrôlent le diabète, les $CD4^+CD25^+$ la gastrite et le diabète et les $CD4^+CD45RB^{low}$ la colite (Alyanakian et al. 2003).

En termes de réponse effectrice, les Treg exerceraient leur fonction chez la souris NOD par la production d'IL-10, d'IL-4 et de TGF- β . Une étude a observé que l'administration de cette dernière dans les îlots était capable d'induire l'expansion des Treg. Celle-ci était d'ailleurs corrélée à une suppression du diabète et une induction de FoxP3 (Peng et al. 2004, Fantini et al. 2004).

③ *Un défaut en lymphocytes NKT*

Les souris NOD présentent un défaut numérique et fonctionnel en lymphocytes NKT. En effet, ces cellules produisent moins d'IL-4 et d'IFN- γ (Gombert et al. 1996, Falcone et al. 1999, Godfrey et al. 1997, Poulton et al. 2001). Pour étudier l'impact de ces cellules dans la pathologie, des souris dépourvues de cette population ($CD1d^{-/-}$) ont été générées. Ainsi, trois études ont démontré que ces souris présentaient un diabète accéléré et une augmentation de l'incidence de la maladie, alors qu'un autre rapport n'a pu montrer de différences (Shi et al. 2001, Naumov et al. 2001, Wang et al. 2001a, Hong et al. 2001). Par contre, les études analysant la corrélation entre les niveaux de NKT dans le sang périphérique et diabète chez

l'homme donnent des résultats très variés (Wilson et al. 2000, Wilson et al. 1998, Kukreja et al. 2002, Oikawa et al. 2002). Cependant, ces résultats doivent être pris avec la plus grande précaution, car même chez la souris le déficit que l'on observait dans les ganglions n'était pas valable dans le sang périphérique (Berzins et al. 2004).

Suite à ces découvertes, plusieurs stratégies ont été utilisées pour augmenter l'activité des cellules NKT et réduire le diabète chez la souris NOD. En effet, il avait déjà été montré que le transfert adoptif de thymocytes $CD4^+CD8^-TCR\alpha\beta^+$, population enrichie en lymphocytes T restreints au CD1d, chez des jeunes souris NOD prévenait les souris receveuses de l'apparition du diabète (Hammond et al. 1998). De plus, le diabète est également supprimé chez des souris transgéniques avec une population NKT amplifiée, et le co-transfert de ces NKT transgéniques avec des splénocytes de souris NOD diabétiques empêche l'induction de la maladie (Lehuen et al. 1998). Par ailleurs, plusieurs groupes ont montré que l'activation des NKT par leur ligand spécifique α -GalCer retarde et diminue l'incidence du diabète de la NOD (Naumov et al. 2001, Wang et al. 2001a, Hong et al. 2001, Sharif et al. 2001).

Les stratégies régulatrices des NKT dans le diabète sont diverses. Ainsi, ces cellules pourraient agir en supprimant l'autoimmunité *via* les DC qui jouent un rôle important dans l'émergence des lymphocytes T autoréactifs. En effet, il a été montré une accumulation de lymphocytes NKT et de DC myéloïdes dans les ganglions pancréatiques de souris NOD traitées par l' α -GalCer et l'injection de ces cellules protège les souris de l'apparition du diabète (Hammond et al. 1998). Par ailleurs, d'autres expériences ont montré que la régulation de la maladie par les NKT est associée à une orientation de la balance Th1 vers Th2. En effet, plusieurs expériences ont corrélé une protection du diabète avec une augmentation de la production d'IL-4 et d'IL-10 par les cellules NKT (Laloux et al. 2001, Mi et al. 2004).

3. LES TLR, UNE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE ?

Ainsi, quel rôle pourraient jouer les TLR dans ces pathologies ? Nous l'avons vu, peu de données sont disponibles sur le sujet. Néanmoins, nous savons qu'ils peuvent agir sur différents types cellulaires, notamment régulateurs. Quel est donc l'avantage de ce type d'approche par rapport aux thérapies déjà existantes ?

A. APPROCHES THERAPEUTIQUES USUELLES

Comment soigne-t-on les patients atteints par ce type de pathologies actuellement ? Quelles sont les différentes stratégies ? Etant donné que le diabète de type 1 et l'asthme sont des

maladies qui se déclarent souvent tôt chez l'enfant et l'adolescent, il est important de trouver de nouvelles thérapies efficaces et qui n'altèrent pas trop le confort des patients. A l'heure actuelle, pour ces deux pathologies, les seules stratégies disponibles soulagent les symptômes mais ne sont en aucun cas curatives. C'est pourquoi, de nombreuses équipes s'attachent à développer des alternatives à ces traitements lourds.

a) Les traitements contre l'asthme

L'asthme est l'une des maladies chroniques les plus communes dans les pays industrialisés. Il y a 20 ans, elle était considérée comme une maladie due à une bronchoconstriction et était soignée par des bronchodilatateurs. Elle est désormais qualifiée de maladie inflammatoire et est traitée par des corticostéroïdes inhalés. Ceux-ci ont fortement amélioré le traitement de l'asthme, en diminuant les admissions à l'hôpital et la mortalité. Bien que ces thérapies aient des effets secondaires, la prise est relativement facile et est préférée par les patients. Néanmoins, ils ne sont pas curatifs.

① *Nouvelles molécules*

En plus des corticostéroïdes, de nouveaux bronchodilatateurs ayant un effet plus prolongé ont été mis au point. Ainsi, des traitements combinant ces deux classes de molécules sont plus efficaces dans le soulagement des symptômes de l'asthme. Cependant, ces composés absorbés par les poumons ont également des effets systémiques, ce qui a conduit à rechercher de nouvelles molécules plus sûres, avec une action pulmonaire plus ciblée et une dégradation rapide après action.

② *Antagonistes des médiateurs inflammatoires*

Plus de 100 médiateurs sont impliqués dans le processus inflammatoire de l'asthme. Le seul antagoniste actuellement utilisé en thérapie est l'anti-leucotriène qui bloque les récepteurs de ces molécules mais demeure peu efficace. D'autres inhibiteurs de l'histamine, des prostaglandines, du facteur activateur des plaquettes, de la bradykinine sont également inefficaces (Barnes et al. 1998).

Les cytokines ont fait l'objet d'un intérêt particulier à cause de leur rôle dans l'inflammation (Barnes 2003). Ainsi, le blocage par un anticorps dirigé contre l'IL-5 déplete les éosinophiles de la circulation mais n'a pas d'effet sur la réponse aux antigènes inhalés, l'hyperréactivité respiratoire et la fonction pulmonaire des asthmatiques (Leckie et al. 2000, Kips et al. 2003). Une autre cytokine Th2, l'IL-4, a également été inhibée chez les patients

asthmatiques mais n'a pas donné de résultats concluants (Barnes 2003). Une thérapie avec un anticorps soluble anti-TNF- α s'est révélée efficace chez certains patients qui ne répondent pas aux traitements classiques (Berry et al. 2006).

Certaines cytokines régulatrices sont naturellement inhibitrices du processus inflammatoire. Ainsi, l'efficacité de l'IL-10 a déjà été montrée dans quelques modèles animaux d'asthme mais n'a pas encore été prouvée chez l'homme. En plus, le traitement doit être quotidien et présente de nombreux effets secondaires (Barnes 2003). L'IL-12 qui est capable de réguler la balance Th1/Th2 en supprimant les cellules Th2, en réduisant l'inflammation éosinophilique et les niveaux d'IgE, diminue le nombre d'éosinophiles circulants chez les patients asthmatiques mais ne réduit pas la réponse aux antigènes inhalés et l'hyperréactivité respiratoire (Bryan et al. 2000). De plus, cette cytokine comporte des effets secondaires désagréables, comme des malaises et des arrhythmies cardiaques.

Ainsi, les méthodes alternatives aux corticostéroïdes existent mais n'ont pas encore fait leurs preuves. C'est pourquoi les investigations continuent dans ce domaine, notamment pour proposer des traitements curatifs.

b) Immunothérapie du diabète

Actuellement, le traitement le plus utilisé dans le diabète est la prise régulière d'insuline exogène pour compenser le manque d'hormone endogène. Ce traitement contraignant pour les patients doit être pris à vie. De plus, il ne soulage que les symptômes sans traiter la cause. C'est pourquoi, de nombreux groupes s'intéressent à l'immunopathologie du diabète et cherchent à établir de nouvelles stratégies en ciblant les cellules et réponses immunitaires.

① *Thérapie par anticorps monoclonaux*

Un certain nombre d'anticorps monoclonaux anti-cellules T ont été testés comme protégeant la souris NOD du diabète, incluant l'anti-CD3, l'anti-CD4, l'anti-CD8, l'anti-CD45RB, l'anti-CD40L ou l'anti-TCR $\alpha\beta$ (Chatenoud et al. 1994, Phillips et al. 2000, Hutchings et al. 1990, Abu-Hadid et al. 2000, Balasa et al. 1997, Sempe et al. 1991). De manière intéressante, l'anti-CD3 a été utilisé non seulement pour prévenir le diabète mais aussi pour soigner le diabète établi lorsqu'il est administré peu de temps après l'apparition des symptômes. Les mécanismes de tolérance induits par l'anti-CD3 sont de deux types : (1) la déplétion ou l'inactivation par la dérégulation du CD3 des lymphocytes T infiltrant les îlots,

expliquant la correction rapide de l'hyperglycémie et (2) l'induction d'une tolérance active avec de forts niveaux de cellules T régulatrices.

D'un point de vue clinique, deux essais ont été entrepris afin d'adapter les traitements appliqués aux souris à l'homme. Dans les deux cas ont été utilisés des anticorps anti-CD3 non mitogéniques humanisés et les premières données sont prometteuses (Bach 2001).

② *Immunothérapie par les cytokines*

Le diabète de type 1 est une maladie de type Th1 comme le montre sa prévention par un traitement par des anticorps anti-IFN- γ , par la surexpression de cette cytokine dans les îlots au moment du développement de la pathologie et l'accélération de celle-ci suite à une administration d'IL-12 (Debray-Sachs et al. 1991, Trembleau et al. 1995).

Ainsi, une autre stratégie thérapeutique est basée sur l'administration de cytokines régulatrices ou d'anticorps dirigés contre les cytokines de type Th1. Plusieurs approches ont utilisé l'IL-4. Son administration systémique a montré une certaine efficacité (Rapoport et al. 1993). De même, les traitements systémiques par de l'IL-10 et du TGF- β se sont révélés protecteurs (Nitta et al. 1998, Piccirillo et al. 1998). Néanmoins, ces approches sont complexes car elles nécessitent l'utilisation de vecteurs rétroviraux et un contrôle de la durabilité de l'expression génique.

L'autre alternative est le blocage de l'IFN- γ et de l'IL-12. Cependant, les souris déficientes pour l'IFN- γ ou son récepteur ne sont pas complètement protégées (Serreze et al. 2000, Hultgren et al. 1996). Par contre, l'administration d'anticorps anti-IL-12 chez la NOD de 5 à 30 semaines d'âge, induit une protection contre l'insulite et le diabète. Cependant, l'arrêt du traitement à 15 semaines provoque une réapparition du diabète (Fujihira et al. 2000). De plus, les souris IL-12^{-/-} ne sont pas protégées du diabète (Trembleau et al. 1999).

③ *Restauration de la masse de cellules β*

La prévention du diabète de type 1 pourrait être possible si les individus prédisposés pouvaient être identifiés avant la destruction des cellules β . En effet, un patient a déjà 70% de masse de cellules β détruites quand il est diagnostiqué. L'un des objectifs dans ce domaine est de stimuler la restauration des îlots de Langerhans. Quelques études chez la souris apportent un espoir thérapeutique mais on est encore loin de l'application chez l'homme. Néanmoins, la transplantation d'îlots est déjà une technique utilisée mais elle peut entraîner des rejets.

Jusqu'à présent, toutes les approches utilisées ont apporté des espoirs mais on est encore loin d'un traitement curatif. Conformément à l'hypothèse de l'hygiène, les TLR pourraient apporter une autre alternative.

B. LE POTENTIEL TLR

Les TLR commencent à faire leurs preuves dans l'immunothérapie de ces maladies. C'est un champ d'investigation qui s'étoffe de plus en plus, afin de proposer d'autres stratégies. Les TLR représentent-ils un espoir pour la thérapie ? Quelles sont les cibles potentielles ? Quels sont les avantages et les inconvénients de cette approche ?

a) Mécanismes d'action

Quelques rapports font état du rôle protecteur des TLR dans les désordres immunitaires. Néanmoins, peu de données sont disponibles sur leur mode d'action. Ainsi, on connaît peu leurs cibles cellulaires et moléculaires dans ces modèles. Néanmoins, d'autres études ont démontré quelques actions, notamment sur les cellules régulatrices.

① *Une modulation de balance Th1/Th2*

Quelques études réalisées sur l'impact des infections dans les maladies autoimmunes ou allergiques ont apporté des éléments de compréhension sur les cellules et médiateurs impliqués dans les mécanismes protecteurs.

Bien que l'on ne connaisse pas quels types cellulaires portent la protection contre le diabète induite par les infections, quelques rapports ont indiqué que les CD4⁺ et les NKT pouvaient être impliqués. Ainsi, le transfert adoptif de splénocytes provenant de souris NOD infectées par le BCG protège les souris receveuses du diabète. Cet effet est perdu lorsque les cellules transférées sont déplétées en cellules CD4⁺ (Qin et al. 1993). Les lymphocytes T provenant de souris NOD infectées par les schistosomes produisent de l'IL-10 en réponse à leurs antigènes et sont moins efficaces pour induire un diabète chez une souris NOD SCID (severe combined immunodeficiency), comparé aux cellules T de souris non infectées. Par ailleurs, des extraits solubles d'œufs de *Schistosoma mansoni* accroissent le pourcentage de cellules NKT et protègent du diabète de type 1 (Zacone et al. 2003).

L'infection par des mycobactéries, en particulier *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*, induisent de fortes réponses Th1. Ainsi, ces microorganismes exerceraient leurs fonctions anti-allergiques, notamment par l'induction d'IFN- γ (Trujillo et al. 2003). Paradoxalement, l'inhibition de réponses asthmatiques par un lipoglycane

mycobactérien ou *Mycobacterium vaccae* tuée est associée à une production accrue d'IL-10 mais pas d'IFN- γ par les cellules T (Trujillo et al. 2003, Sayers et al. 2004). De plus, l'application d'anticorps anti-IL-10 et anti-TGF- β bloque les effets protecteurs, indiquant un mécanisme indépendant de Th1 (Trujillo et al. 2003). Par contre, les effets anti-allergiques du virus de l'hépatite A sont associés au développement de réponses Th1 (Wohlleben et al. 2003).

Un point de vue un peu simpliste serait de dire que la stimulation TLR oriente la réponse vers Th1 dans une maladie à dominante Th2 et vers Th2 dans une maladie de type Th1. En réalité, le système est beaucoup plus complexe et fait intervenir de nombreuses cellules et molécules, qui en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent vont être modulées différemment.

② *Un ciblage des cellules régulatrices*

Bien que peu d'éléments soient disponibles dans la littérature sur le ciblage de ces cellules par les agonistes des TLR dans ces pathologies, on sait que ces cellules y jouent un rôle modulateur. Par ailleurs, certains travaux commencent à montrer que les TLR peuvent moduler la réponse des cellules régulatrices.

En effet, de manière intéressante, les TLR sont exprimés par les cellules T régulatrices et peuvent donc agir directement sur ces dernières. Peng *et al.* a montré que des ligands synthétiques et naturels de TLR8 peuvent réverser la fonction des Treg. Cet effet est indépendant des cellules mais nécessite un signal TLR8-MyD88-IRAK4 fonctionnel chez les Treg (Peng et al. 2005). Le transfert de Treg stimulés par TLR8 chez des souris porteuses de tumeurs augmente fortement l'immunité anti-tumorale. Par ailleurs, la stimulation de TLR2 sur les Treg augmente leur prolifération *in vitro* et *in vivo* avec une perte temporaire de leur fonction suppressive (Sutmuller et al. 2006). Un autre travail a également mis en évidence une stimulation de ces cellules par le LPS mais il reste controversé (Caramalho et al. 2003). Cette régulation des Treg dépendante des TLR pourrait avoir d'importantes implications dans le développement et la sévérité des désordres immunitaires.

Quelques articles commencent également à faire état d'une stimulation des TLR sur les NKT. Ainsi, un premier travail a montré la réponse de ces lymphocytes aux ODN CpG, un agoniste de TLR9. Le système nécessite plusieurs acteurs pour induire une réponse, la cellule dendritique plasmacytoïde qui exprime fortement TLR9, la cellule dendritique myéloïde qui exprime CD1d et la cellule NKT (Montoya et al. 2006). Récemment, une étude a montré que les NKT répondaient à des DC dérivées de moelle osseuse chargées avec des ODN CpG, en

produisant de l'IFN- γ . De manière intéressante, cet effet nécessitait la synthèse combinée d'IFN de type I et de β -glucosylcéramides présentés par les DC (Paget et al. 2007). Par ailleurs, pendant les réponses contre les bactéries à Gram négatif, comme avec celles LPS-positives du type *Salmonella typhimurium*, la présence d'IL-12, induite par le signal TLR est requise pour la sécrétion d'IFN- γ par les NKT (Mattner et al. 2005, Brigl et al. 2003). En effet, un autre travail a montré que ces cellules produisaient de l'IFN- γ en réponse au LPS en présence de cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse et d'IL-12 (Nagarajan et al. 2007). Ces travaux commencent à se développer et à expliquer le rôle des TLR dans les réponses immunorégulatrices.

b) Immunothérapie par les TLR : un nouvel espoir ?

Ainsi, quelle place pourraient occuper les TLR dans ces nouvelles thérapies ? Quels seraient les avantages et les inconvénients d'un tel traitement ?

Les innovations attendues dans le domaine concernent le développement d'un traitement curatif. Le seul moyen d'y arriver est de comprendre ces dérèglements afin de pouvoir agir au mieux sur les mécanismes délétères. Néanmoins, la situation idéale est d'agir en amont avant le développement de la maladie. C'est pourquoi la génétique travaille actuellement sur le décryptage des gènes de prédisposition, afin de prédire les personnes susceptibles de développer ces pathologies. En effet, le dépistage précoce est essentiel pour apporter au plus vite une immunothérapie efficace au moment où les symptômes sont encore faibles. On pourrait ainsi bloquer les événements initiateurs et éviter la maladie.

Quel pourrait être l'avantage d'une stimulation TLR dans cette histoire complexe ? Nous avons vu que ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans l'orientation de la réponse immune. Ils sont également capables de stimuler des cellules naturellement impliquées dans la tolérance. De plus, en les activant, on joue sur plusieurs cibles potentielles, donc sur des réponses plus globales. Cette approche n'en est qu'à ses balbutiements mais s'avère déjà très prometteuse. En effet, la plupart des agonistes testés se sont révélés protecteurs à l'exception de certaines molécules virales.

Néanmoins, la perspective d'un traitement pour l'homme reste encore lointaine. En effet, les modèles animaux sur lesquels sont développés ces expériences ont une cinétique bien connue qu'il est plus difficile de déterminer chez l'homme. Ainsi, doses et fenêtres de traitement devront être mises au point. Un inconvénient subsiste cependant : l'administration de composés microbiens qui peuvent déclencher des effets secondaires. Par exemple,

l'homme est très sensible au LPS qui entraîne souvent des chocs septiques mortels alors que la souris est peu affectée par ce produit. Le but ne serait bien entendu pas d'administrer ces composés bactériens, mais plutôt de mimer leur effet par exemple en utilisant des produits moins immunogènes.

Le chemin est donc encore long mais la perspective d'un nouveau traitement agissant cette fois sur la cause immunitaire de ces troubles n'est pas exclue. C'est pourquoi nous avons choisi de nous intéresser au rôle de ces agonistes TLR qui ont un effet aussi fort que des infections par des microbes entiers mais qui possèdent une action plus ciblée. Notre objectif a été de comprendre quelles pouvaient être les cibles de ces produits à la fois en situation normale et pathologique afin d'apporter de nouvelles pistes thérapeutiques.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Conformément à l'hypothèse de l'hygiène, les infections peuvent protéger des désordres immunologiques. Bien que ce concept soit bien décrit, les mécanismes moléculaires et cellulaires à la base de ce phénomène sont encore très peu connus. Au cours de ma thèse, j'ai donc orienté mon travail sur l'implication des TLR dans le développement de pathologies immunitaires. Afin d'apporter de nouveaux éléments de compréhension, j'ai étudié l'effet d'une stimulation TLR à la fois dans un modèle Th1, le diabète de type 1 et Th2, l'asthme allergique.

Notre premier objectif a été d'étudier le rôle d'une stimulation TLR dans une pathologie autoimmune et d'identifier les mécanismes à l'origine de la protection observée. Nous avons ainsi évalué l'impact d'un extrait bactérien composé de différentes souches bactériennes à l'origine d'infections du tractus respiratoire, sur le développement du diabète de la souris NOD (article n°1). Ce composé comportant des agonistes de TLR2 et TLR4, nous avons par la suite testé l'effet d'une stimulation de molécules purifiées de pathogènes, agonistes de différents TLR sur le développement de cette pathologie (manuscrits n°2, 3 et 4)

Un agoniste TLR s'est révélé particulièrement intéressant dans la modulation du système immunitaire puisque le resiquimod activant TLR7, a la capacité de cibler directement la population cellulaire régulatrice NKT. Notre deuxième objectif a donc été de décrire cette interaction TLR7/NKT à la fois en situation normale et pathologique dans le diabète autoimmun (manuscrit n°2) et le modèle de l'asthme allergique (manuscrit n°5).

Notre étude nous a donc permis de mettre en évidence certains des mécanismes pouvant expliquer le rôle protecteur des infections dans les désordres immunologiques. Les manuscrits décrivant ces travaux sont présentés ci-après.

RESULTATS PARTIE I :

**Effet de la stimulation des TLR
dans la modulation du diabète de type 1**

Article n°1

Transforming growth factor- β and natural killer T cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes

Alyanakian MA, Grela F, Aumeunier A, Chiavaroli C, Gouarin C, Bardel E, Normier G, Chatenoud L, Thieblemont N, Bach JF. *Diabetes* 2006, **55** : 179-185

Dans le but d'évaluer le rôle protecteur des infections dans les maladies autoimmunes, nous avons administré un extrait (OM-85) contenant différentes souches bactériennes à Gram positif et négatif responsables d'infections respiratoires (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* et *ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *viridans* et *Neisseria catarrhalis*) à des souris NOD développant un diabète de type 1.

Nous avons pu observer qu'un traitement intra-péritonéal protégeait les souris du développement du diabète. Une cinétique de traitement nous a révélé que l'obtention d'un effet protecteur nécessitait une administration précoce avant 10 semaines d'âge.

Nous avons étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pouvaient être à la base de cette protection et nous avons focalisé nos travaux sur l'étude des phénomènes régulateurs naturels (cytokines immunorégulatrices, lymphocytes NKT) présents chez la NOD qui parviennent à ralentir la maladie. Nous avons ainsi testé la dépendance des cytokines immunorégulatrices IL-4, IL-10 et TGF- β dans la protection observée à l'aide d'anticorps bloquants et de souris déficientes pour l'IL-4 et avons pu mettre en évidence que seul le TGF- β était impliqué. Nous avons également étudié le rôle des NKT dans cette protection et avons montré que des souris CD1d^{-/-} déficientes pour la population NKT traitées par l'OM-85 n'étaient plus protégées contre le diabète.

Etant donné que ce composé comportait différentes espèces bactériennes, nous nous sommes demandés s'il pouvait activer les récepteurs Toll-like, responsables de la détection de molécules de pathogènes. Nous avons donc stimulé des cellules dendritiques provenant de souris sauvages ou déficientes en TLR2, TLR4 ou MyD88, protéine de la voie de signalisation TLR et avons pu mettre en évidence que l'OM-85 contenait au moins des agonistes de TLR2 et TLR4. Nous avons par la suite pu mettre en évidence *in vitro* que l'OM-

85 pouvait induire de l'IL-10 et du TGF- β d'une manière dépendante de MyD88 donc *via* la signalisation TLR.

Conformément à l'hypothèse de l'hygiène, ce premier article confirme le potentiel protecteur de microorganismes activant les TLR dans le développement du diabète de type 1. Nous avons de plus pu associer à cet effet protecteur la description de quelques molécules impliquées comme les cytokines immunorégulatrices et dans notre cas précis, le TGF- β mais aussi des populations régulatrices comme les lymphocytes NKT.

Transforming Growth Factor- β and Natural Killer T-Cells Are Involved in the Protective Effect of a Bacterial Extract on Type 1 Diabetes

Marie-Alexandra Alyanakian,¹ Françoise Grela,² Aude Aumeunier,² Carlo Chiavaroli,³ Christine Gouarin,¹ Emilie Bardel,² Gérard Normier,³ Lucienne Chatenoud,¹ Nathalie Thieblemont,² and Jean-François Bach¹

The onset of type 1 diabetes in NOD mice is delayed by oral administration of a bacterial extract (OM-85) and can be completely prevented by its intraperitoneal administration. Optimal prevention is observed when starting treatment at 3 or 6 weeks of age, and some effect is still observed with treatment at 10 weeks of age. Using genetically deficient mice and cytokine-neutralizing monoclonal antibodies, we demonstrate here that the therapeutic effect does not involve T-helper type 2 cytokines (interleukin [IL]-4 and -10) but is tightly dependent on transforming growth factor (TGF)- β . Natural killer T-cells also participate in the therapeutic effect because CD1d^{-/-} NOD mice are partially resistant to the protective effect of OM-85. The question remains of the specificity of the protective effect of OM-85, which may include proinflammatory components. It will thus be important to further characterize the molecular components that afford protection from type 1 diabetes. Lipopolysaccharide is excluded, but other Toll-like receptor (TLR) agonists could be involved because OM-85 stimulated dendritic cells and induced TGF- β production by splenocytes in a TLR-2-, TLR-4-, and MyD88-dependent fashion. *Diabetes* 55:179–185, 2006

The incidence of type 1 diabetes is steadily increasing in Western countries (1). There is a clear parallel trend toward decreased infectious load in these countries linked to improved hygiene and medical care, including extensive usage of vaccinations and antibiotics (2–3). A similar association is observed in animal models of the disease, such as nonobese diabetic (NOD) mice and Bio-Breeding (BB) rats. The causal relationship between the low rate of infections and high disease incidence was directly demonstrated in the

NOD mouse by the increased disease incidence observed after decontamination of mice bred in conventional facilities (2) and by the disease prevention achieved by deliberate infection with a variety of bacteria, viruses, and parasites (4–9). The mechanisms mediating the protective effect of infections on type 1 diabetes are still ill defined.

Here, we present a systematic analysis of the potential mechanisms of diabetes protection in NOD mice afforded by OM-85, an extract manufactured from bacterial species frequently responsible for respiratory tract infections. We took advantage in this study of the availability in the laboratory of several strains of genetically deficient IL4^{-/-} and CD1d^{-/-} NOD mice and of antibodies that neutralize transforming growth factor (TGF)- β and block the interleukin (IL)-10 receptor. The results obtained indicate the multifactorial nature of diabetes protection by OM-85, involving TGF- β and natural killer T (NKT) cells.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Female NOD mice (K^d, I-A^{g7}, and D^b) were bred in our animal facility. Female CD1d^{-/-} NOD mice were originally provided by Dr. L. Van Kaer at backcross 6 and were bred to backcross 12 in our facility. Female IL4^{-/-} NOD mice were kindly provided by Dr. D. Mathis. MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-}, and TLR4^{-/-} lines were kindly provided by Dr. S. Akira and backcrossed to C57BL/6 mice in our animal facility. All mice were bred under specific pathogen-free conditions and fed a standard diet (γ -irradiated R04-10; UAR, Augy, France). **Diabetes monitoring.** Mice were monitored once a week for glycosuria, using colorimetric strips (Glukotest; Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany), until diabetes occurred. Diabetes was confirmed by evaluating fasting glycemia (Hemoglukotest and Reflolux F; Boehringer-Mannheim). All mice were culled when three consecutive glycosuria and hyperglycemia tests were found to be positive.

OM-85 extract. OM-85 (Broncho-Vaxom, OM Pharma, Meyrin/Geneva, Switzerland) is an extract composed of both gram-positive and -negative bacterial species frequently responsible for respiratory tract infections: *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* and *ozaenae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *viridans*, and *Neisseria (Branhamella) catarrhalis*. It mainly consists of acidic proteins, peptides, and amino acids. During the production process, bacteria are submitted to alkaline treatment. This leads to chemical modifications (such as partial hydrolysis of proteins), which shifts the isoelectric points toward low values characteristic of acidic proteins (isoelectric point between 2.8 and 5.2) and generates smears of proteins and peptides ranging from a few hundred to a few hundred thousand daltons, as detected by SDS-PAGE analysis. By gel filtration, the major peak is observed between 7 and 8 kDa. Importantly, OM-85 also includes, though in minor quantities, other components (i.e., detoxified lipopolysaccharides, lipid A molecules and lipoteichoic acids, sugars, and fatty acids). The final OM-85 lyophilizate contains 17.5% active principle (bacterial extract) and 82.5% excipients (mannitol, sodium glutamate, and propyl gallate). Doses administered are referred to as milligrams of active principle. For each experiment, a fresh solution was prepared daily.

From the ¹Université René Descartes Paris 5, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U580, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; the ²Université René Descartes Paris 5, Unité Mixte de Recherche (UMR), National Center for Scientific Research (CNRS) 8147, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; and the ³OM Pharma, Meyrin, Switzerland.

Address correspondence and reprint requests to Jean-François Bach, MD, DSc, INSERM U580, Hôpital Necker-Enfants Malades, 161 Rue de Sévres, 75015 Paris, France. E-mail: bach@necker.fr.

Received for publication 14 February 2005 and accepted in revised form 27 September 2005.

CFA, complete Freund's adjuvant; IFA, incomplete Freund's adjuvant; IFN- γ , γ -interferon; IL, interleukin; MDP, muramyl dipeptide; NKT, natural killer T; TGF, transforming growth factor; TLR, Toll-like receptor.

© 2006 by the American Diabetes Association.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

OM-85 oral administration. Each mouse received 1, 10, or 25 mg/day of OM-85 active principle orally, 5 days a week for 10 or 30 weeks. The bacterial extract was dissolved in drinking water. Control mice received drinking water without OM-85.

OM-85 intraperitoneal administration. For intraperitoneal injection, fresh solutions of OM-85 were dissolved in saline (NaCl 0.9%). Each mouse received 1 mg of OM-85 active principle per injection, 5 days a week for 10 weeks.

Different compounds were used as controls. In some experiments control mice received intraperitoneal injections of saline without OM-85. In addition, two proinflammatory compounds devoid of any bacterial component, namely, incomplete Freund's adjuvant (IFA) and *N*-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (most commonly termed muramyl dipeptide [MDP]) (10–12), served as control treatments. In these experiments each NOD mouse received at 4 or 10 weeks of age a footpad injection of either MDP (25 μ g dissolved in NaCl) emulsified in 50 μ l IFA or saline emulsified in 50 μ l IFA. As a positive control for IFA and MDP+IFA, some NOD mice also received a footpad injection of a complete Freund's adjuvant (CFA) emulsion according to an identical experimental protocol (at 4 or 10 weeks of age), as previously described (13).

Anticytokine treatment. When needed mice were treated with the 2G.7 monoclonal antibody to human TGF- β that cross-reacts and neutralizes *in vivo* murine TGF- β (14) (provided by C.J.M. Melief, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands) or with a rat monoclonal antibody specific to the mouse IL-10 receptor (15) (provided by A. O'Garra, DNAX, Palo Alto, CA). The antibodies were administered at a dose of 1 mg \cdot mouse⁻¹ \cdot injection⁻¹ i.p. three times a week for 4 weeks.

Limulus ameocyte assay. The absence of any significant endotoxin activity in OM-85 preparation was checked by a limulus ameocyte assay (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) following the manufacturer's recommendations.

Preparation and culture of dendritic cells. Primary bone marrow dendritic cells were isolated from femora of wild-type or genetically Toll-like receptor (TLR)- or MyD88-deficient mice. Briefly, bone marrow was flushed out with Hanks balanced salt solution supplemented with 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Cells were cultured at 2×10^6 cells/ml and per well in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 25 mmol/l HEPES, 1% minimum essential medium nonessential amino acid, 1% minimum essential medium sodium pyruvate, 0.5 mmol/l β -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml gentamicin, and 10% supernatant of XR663 cell line-secreting granulocyte macrophage-colony stimulating factor. Fresh medium was added every 3 days. At day 9, immature dendritic cells were collected and stimulated by different concentrations of OM-85 in fresh medium for 24 h. Supernatants were then collected and assayed using a murine IL-12p40 enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Lille, France).

Cell recovery and T-cell assays. For analysis of cytokine production, total splenocytes or purified T-cell subsets were cultured in triplicate in 96-well flat-bottom microtiter plates (Costar, Cambridge, MA) at 2×10^5 cells/well in the presence of OM-85 (at different doses as indicated in figure legends) or medium alone. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mmol/l L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Life Technologies, Cergy Pontoise, France), and 0.5 mmol/l β -mercaptoethanol, and they were stimulated with immobilized anti-CD3 (145 2C11, 5 μ g/ml final concentration; provided by Dr. J.A. Bluestone, University of California at San Francisco, San Francisco, CA). Supernatants were recovered at 24 h (to measure γ -interferon [IFN- γ]), 48 h (to measure IL-4 and -10), and 72 h (to measure TGF- β) and stored at -80°C until tested.

Enzyme-linked immunosorbent assay for cytokine production. For cytokine measurement DuoSet kits quantifying TGF- β , IFN- γ , IL-4, IL-12p40, and IL-10 (R&D Systems) were used. Recombinant cytokines were used as standards. *In vitro* stimulation assays were repeated at least three times. Measurements were performed in duplicate or triplicate. Data are the means \pm SE.

Statistical analysis. Diabetes incidence was plotted using the Kaplan-Meier method, i.e., nonparametric cumulative survival plot. Statistical comparisons between the curves were performed using the log rank (Mantel-Cox) test, which provided the corresponding χ^2 values. When needed, statistical comparison of mean values was performed using Student's *t* test.

RESULTS

Diabetes prevention after intraperitoneal administration of OM-85. In our colony, female NOD mice spontaneously develop overt diabetes starting at 14–16 weeks of age (usually with an incidence of \sim 80% at 35 weeks of age). Female NOD mice were treated with OM-85 starting at 3, 6, 10, or 15 weeks of age. The product was

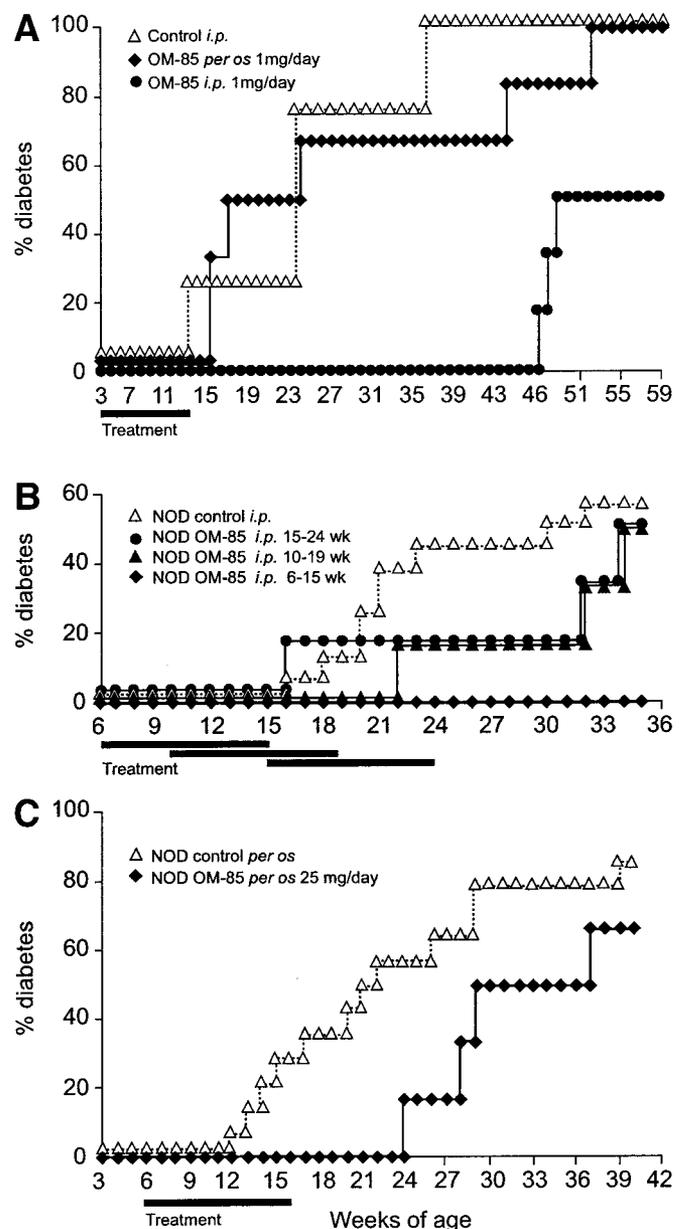


FIG. 1. Protection from diabetes in NOD mice treated with OM-85. *A:* Diabetes prevention in NOD mice treated intraperitoneally with OM-85 (1 mg/day, 5 days a week for 10 weeks). Results are from one representative experiment of three performed (Table 1). No protection was observed after oral administration of the same dose. *B:* Protection from diabetes is observed in the long term only when OM-85 treatment is started at an early disease stage (6 weeks of age, $P = 0.007$). Diabetes onset was only delayed when treatment was started at 10 or 15 weeks of age, but no significant protection was observed ($P = 0.451$ and $P = 0.355$, respectively). Experimental groups treated with OM-85 included six mice each; the control group included five mice. *C:* Results show consistent protection from diabetes in mice treated orally with high-dose OM-85 compared with controls. Experimental groups (OM-85 and controls) included seven mice each.

administered at a dose of 1 mg/day i.p. of active principle, 5 days a week for 10 weeks.

In the group of mice injected with OM-85 from 3 weeks of age, a significant and long-term protection from diabetes was observed (Fig. 1A and Table 1). A similar protection was observed when treatment was started at 6 weeks of age (Fig. 1B) (experimental groups treated with OM-85 included six mice each; the control group included five mice). When treatment was started at 10 or 15 weeks of age, a partial though nonsignificant protection was observed.

TABLE 1
Protection from diabetes in NOD mice treated intraperitoneally (i.p.) with OM-85

	<i>n</i>	% Diabetes				<i>P</i>
		Week 10	Week 20	Week 30	Week 40	
Experiment 1						0.0013
Control	4	0	25	75	100	
OM-85 i.p.	6	0	0	0	0	
Experiment 2						0.0014
Control	4	0	50	75	75	
OM-85 i.p.	5	0	0	20	40	
Experiment 3						0.0075
Control	11	0	64	73	73	
OM-85 i.p.	10	0	10	20	40	

The cumulative analysis of the data from the three independent experiments reported ($n = 22$ NOD treated mice, $n = 19$ controls) showed a highly significant decrease in diabetes incidence ($P = 0.0008$) (see Fig. 1A and RESEARCH DESIGN AND METHODS for dosage and timing schedule).

As additional controls, in parallel to saline, we tested two proinflammatory compounds, namely, IFA and synthetic MDP. MDP is a component of the mycobacterial cell wall, initially characterized by Lederer and Chedid and colleagues (10–11), which is nonimmunogenic per se while expressing proinflammatory adjuvant-like properties. In fact, it acts as a hapten when conjugated with various carriers (10–12,16–18). As a positive control for IFA and MDP+IFA, NOD mice were also treated with a CFA emulsion as previously described (13). Importantly, no protection was observed after parenteral administration of IFA or MDP+IFA in experimental conditions where CFA showed full protective activity (10 mice were included in each experimental group) (Fig. 2). One may also note that CFA, like OM-85, is active when treatment is started at a young age, but it loses most of its activity when given at later disease stages.

Effect of oral administration. Mice were treated orally with different doses of OM-85 (1, 10, or 25 mg/day of active principle), 5 days a week for 10 or 30 weeks. The treatment was started at 3, 6, 10, or 15 weeks of age. Results of several experiments showed some variability. Consistent, though statistically borderline, protection ($P = 0.056$) was obtained after administration of 25 mg OM-85 for 10 weeks, starting treatment at 6 weeks of age (each experimental group—OM-85 and controls—included seven mice) (Fig. 1C). Some protection was also observed with the 10-mg dose, starting treatment at 6 weeks of age. No effect was observed with the 1-mg dose, even when starting treatment at 3 weeks of age ($P = 0.477$), a schedule fully efficacious when using the intraperitoneal route (Fig. 1A).

Diabetes protection by OM-85 does not depend on T-helper type 2 cytokines. IL-4 dependency was studied by comparing the effect of 1 mg OM-85 administered intraperitoneally in IL-4^{-/-} and wild-type NOD mice. A similar protection was observed in the two strains (OM-85-treated NOD IL-4^{-/-}: $n = 9$; control NOD IL-4^{-/-}: $n = 6$; no significant difference, $P = 0.216$) (Fig. 3A), thus suggesting that IL-4 is not implicated in the therapeutic effect of OM-85.

To study the role of IL-10 on the effect of OM-85 in type 1 diabetes, OM-85 was administered intraperitoneally in NOD mice from 3 to 13 weeks of age, followed by administration of a monoclonal antibody directed to the

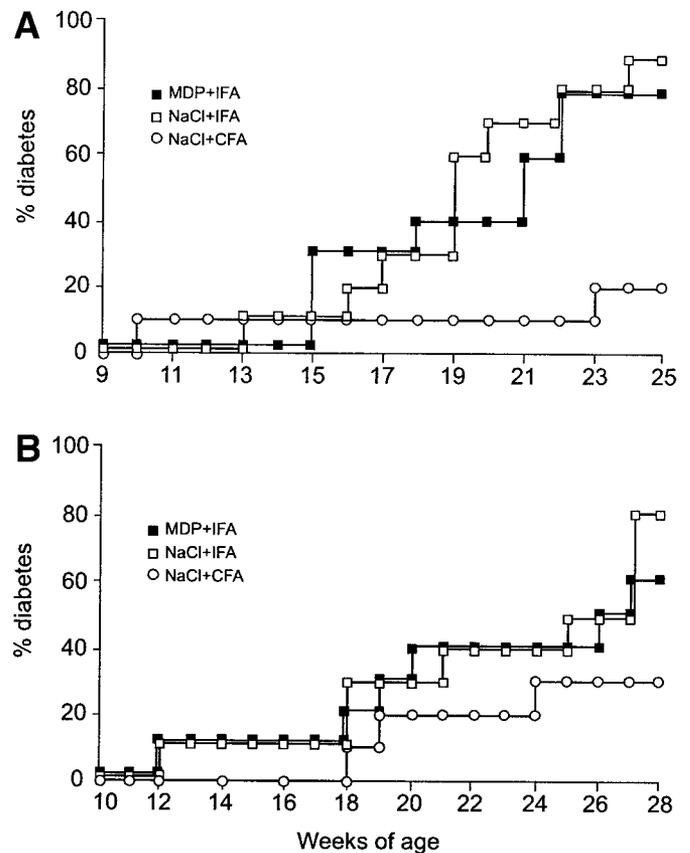


FIG. 2. Protection from diabetes in NOD mice treated with MDP, IFA, or CFA. No protection is observed after parenteral administration of IFA alone or in association with MDP in mice treated at 4 (A) or 10 (B) weeks of age. At 4 weeks of age, mice treated with CFA are protected from diabetes, compared with controls treated with IFA ($P = 0.002$) or IFA and MDP ($P = 0.008$). Protection by CFA is partial when treatment is started at 10 weeks of age (compared with IFA, $P = 0.051$, or with IFA+MDP, $P = 0.220$). Experimental groups (NaCl+CFA, MDP+IFA, and NaCl+IFA) included 10 mice each.

IL-10 receptor. The antibody was given at a dose of 1 mg three times a week, from 13 to 16 weeks of age. As shown in Fig. 3B, the treatment did not abrogate the protective effect of OM-85 (OM-85-treated NOD: $n = 10$; OM-85 + anti-IL-10 receptor-treated NOD: $n = 7$; control NOD: $n = 11$; $P = 0.600$). Similar data were obtained in a second experiment (data not shown).

Contribution of TGF- β to the protective effect of OM-85. To analyze the possible role of TGF- β in the OM-85-mediated protection of diabetes, treatment with OM-85 (1 mg/day i.p. from 3 to 13 weeks of age) was followed by the administration of a neutralizing anti-TGF- β antibody, given at the dose of 1 mg i.p. three times a week, from 13 to 16 weeks of age. Results shown in Fig. 3C clearly indicate that anti-TGF- β abrogated the protective effect of OM-85 (OM-85-treated NOD: $n = 10$; OM-85 + anti-TGF- β -treated NOD: $n = 6$; control NOD: $n = 11$; $P = 0.026$), thus suggesting that OM-85-mediated protection is a TGF- β -dependent active phenomenon. Similar data were obtained in a second experiment (data not shown).

Role of NKT cells in OM-85-mediated protection. CD1d^{-/-} mice are devoid of NKT cells, whose intrathymic selection depends on CD1d (19). CD1d^{-/-} NOD mice were treated with OM-85 (1 mg/day i.p., 5 days a week for 10 weeks, starting treatment at 3 or 4 weeks of age, depending on the experiment). In both experiments shown in Fig.

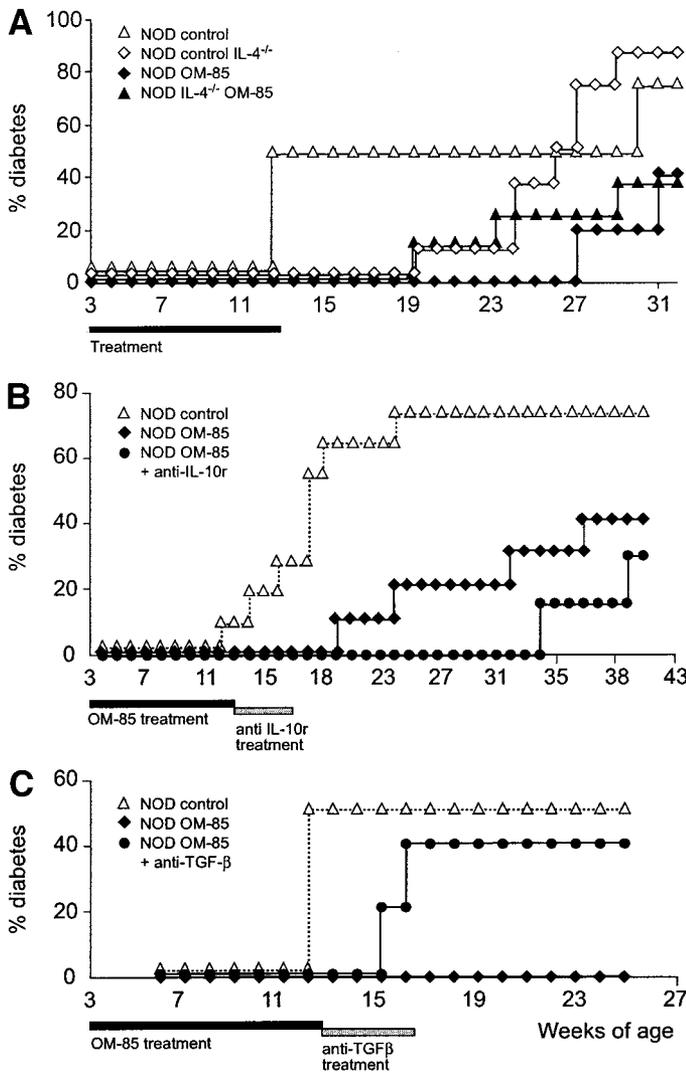


FIG. 3. Major role of TGF-β in the protective effect of OM-85. **A:** Female IL-4^{-/-} and wild-type NOD mice were treated with OM-85 (1 mg i.p./day). A similar diabetes incidence was observed between the two groups (OM-85-treated NOD IL-4^{-/-}: *n* = 9; and control NOD IL-4^{-/-}: *n* = 6). **B:** Treatment with anti-IL-10r antibody (1 mg i.p. three times a week) did not reverse protection induced by OM-85 (1 mg/day i.p.) (OM-85-treated NOD: *n* = 10; OM-85 + anti-IL-10r-treated NOD: *n* = 7; and control NOD: *n* = 11). **C:** Treatment with a neutralizing anti-TGF-β antibody (1 mg i.p. three times a week) effectively reversed protection induced by OM-85 (1 mg/day i.p.). (OM-85-treated NOD: *n* = 10; OM-85 + anti-TGF-β-treated NOD: *n* = 6; and control NOD: *n* = 11).

4, diabetes incidence was similar in CD1d^{-/-} and wild-type NOD mice. The following number of mice were used in each experiment presented: Fig. 4A: *n* = 10 for OM-85-treated NOD CD1d^{-/-}, *n* = 10 for control NOD CD1d^{-/-}, *n* = 10 for OM-85-treated NOD, and *n* = 11 for control NOD; Fig. 4B: *n* = 5 for OM-85-treated NOD CD1d^{-/-}, *n* = 11 for control NOD CD1d^{-/-}, *n* = 5 for OM-85-treated NOD, and *n* = 12 for control NOD. However, it appeared that CD1d^{-/-} NOD mice were less well protected from diabetes by OM-85 than wild-type NOD mice, though not significantly (cumulative analysis *P* = 0.087). This suggests that the OM-85 protective effect may depend, but only in part, on NKT cells.

Search for TLR ligands in OM-85. To test whether OM-85 contains components that might stimulate TLRs and thus potentially contribute to the immunomodulatory effect of the product, its capacity to stimulate cytokine

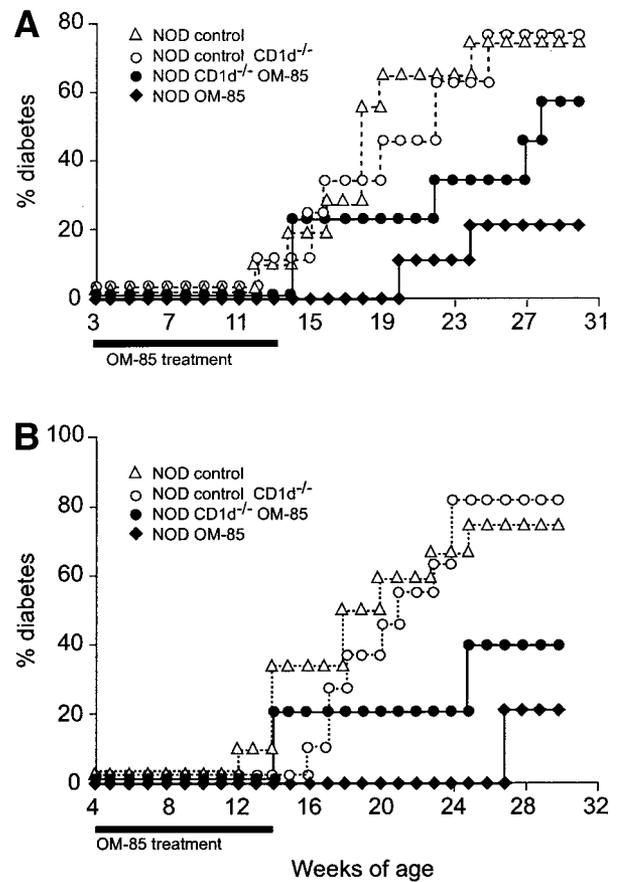


FIG. 4. Involvement of NKT cells in the diabetes protection afforded by OM-85 treatment. Female CD1d^{-/-} or wild-type NOD mice were treated intraperitoneally with OM-85 (1 mg/day, 5 days a week). Results from two independent experiments are detailed in **A** (OM-85-treated NOD CD1d^{-/-}: *n* = 10; control NOD CD1d^{-/-}: *n* = 10; OM-85-treated NOD: *n* = 10; and control NOD: *n* = 11) and **B** (OM-85-treated NOD CD1d^{-/-}: *n* = 5; control NOD CD1d^{-/-}: *n* = 11; OM-85-treated NOD: *n* = 5; and control NOD: *n* = 12). A significantly lower diabetes incidence was observed in OM-85-treated CD1d^{-/-} NOD mice compared with untreated CD1d^{-/-} NOD mice (cumulative analysis *P* = 0.032). A trend toward lower diabetes incidence in OM-85-treated CD1d^{-/-} NOD mice versus OM-85-treated wild-type NOD mice was also observed. Experimental groups included 5–12 mice.

production in a TLR-dependent fashion was examined. The experimental model consisted of incubating primary bone marrow dendritic cells from C57BL/6 or genetically TLR- or MyD88-deficient mice with different concentrations of OM-85. As shown in Fig. 5, OM-85 stimulated the production of IL-12 in vitro. This response was not observed after stimulation of dendritic cells obtained from MyD88^{-/-} mice. When using dendritic cells from TLR-4^{-/-} and TLR-2^{-/-} mice, total or partial inhibition of IL-12 production was observed, respectively (Fig. 5). These results show that in dendritic cells OM-85 signals exclusively via the MyD88 pathway, at least partially by TLR-2 and -4.

OM-85 modulates TGF-β production via the TLR-MyD88 pathway. We next tested the ability of OM-85 to stimulate the in vitro production of IL-4, IL-10, IFN-γ, and TGF-β using murine splenocytes. Importantly, OM-85 stimulation induced very high production of TGF-β (which was maximal already at 1 μg/ml in wild-type mice), high production of IL-10 (from 10 μg/ml), and moderate production of IFN-γ (from 100 μg/ml), whereas IL-4 production was undetectable (Fig. 6). Interestingly, TGF-β and IL-10 production were abolished in MyD88^{-/-} mice (Fig.

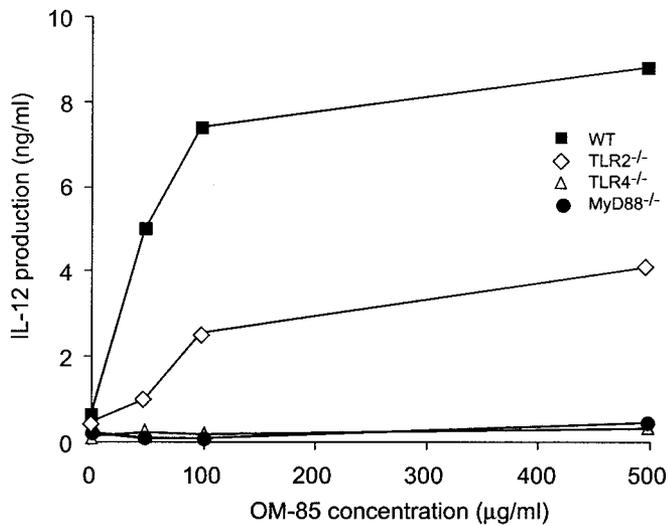


FIG. 5. OM-85 induces IL-12 production by dendritic cells. The response was completely abolished in dendritic cells obtained from MyD88^{-/-} mice and partially inhibited in dendritic cells from TLR-2^{-/-} and TLR-4^{-/-} mice. Results are representative of one experiment of four performed. WT, wild type.

6). TGF- β production was also completely abolished in TLR-4^{-/-} mice and partially in TLR-2^{-/-} mice compared with wild-type mice. The presence of TLR-4 agonists in OM-85, as suggested by these results, prompted us to examine the content of lipopolysaccharide in OM-85, using a limulus amebocyte assay. The level of lipopolysaccharide was found to be lower than that required for stimulating mononuclear phagocytes (<0.1 pg of lipopolysaccharide per milligram of OM-85). One may thus assume that such traces of lipopolysaccharide cannot account for

the observed TLR-4-mediated stimulatory capacity of OM-85.

DISCUSSION

The mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes are still elusive. Limited data are available in models based on infections in autoimmunity-prone mouse strains (2). Simplified approaches using bacterial components or viral proteins are difficult because there is no indication of the nature of the molecules responsible for the protection. It was thus of particular interest to use a bacterial extract that would putatively contain the various components participating in bacteria-mediated protection, whose handling is easier than live infections. In this vein, we selected OM-85, a bacterial extract prepared from eight bacterial species frequently responsible for respiratory tract infections. It has been reported earlier that another bacterial extract, OM-89, can afford protection in animals and/or humans against autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (20–21), lupus erythematosus (22), spondyloarthropathies (23), and diabetes (24–25). The product tested in the present study (OM-85) is of particular pertinence because it has extensively and safely been used in children suffering from repeated upper respiratory tract infections (26–27), thus paving the road to investigate its preventive potential in children prone to developing type 1 diabetes.

Results obtained in this study first show that OM-85 can prevent or delay type 1 diabetes onset when administered intraperitoneally at a low dosage. The product can also afford protection when given orally, but it must then be administered at a higher dosage. Importantly, the effect is optimal when the treatment is started early (3 or 6 weeks of age), but some protection is still achieved when the

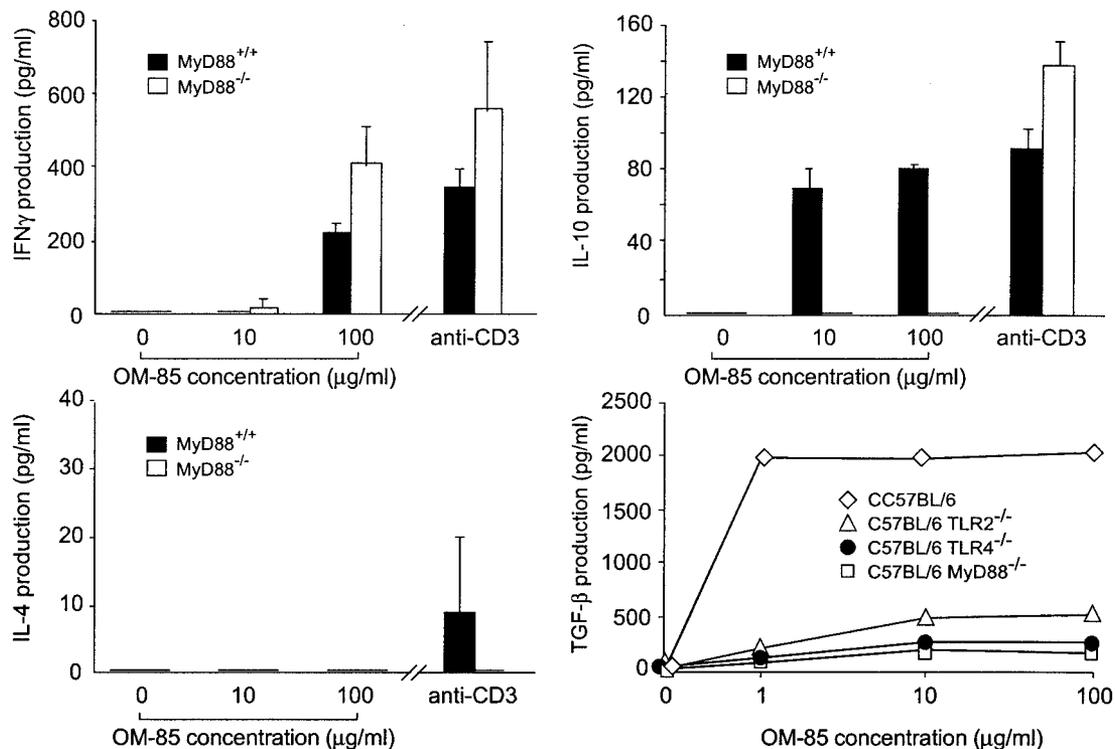


FIG. 6. OM-85 induces IL-10, IFN- γ , and TGF- β production by murine splenocytes. IL-10 and TGF- β production was completely abolished in splenocytes from MyD88^{-/-} mice and partially decreased in splenocytes from TLR-2^{-/-} and TLR-4^{-/-} mice. Results are from one representative experiment of three performed.

treatment is started at 10 weeks of age. Such kinetics are similar to those described for CFA (13). Importantly, two proinflammatory adjuvant-like yet nonimmunogenic compounds, namely, IFA and MDP (10–12,16–18), did not confer protection from diabetes, as opposed to OM-85 bacterial extract. However, currently, one cannot exclude that some proinflammatory compounds included in OM-85 actively participate in its protective effect in this model.

We examined the role of T-helper type 2 cytokines, namely IL-4 and -10, in the protective effect of OM-85. No responsibility of IL-4 or -10 could be evidenced by using genetically deficient mice for IL-4 and a neutralizing monoclonal antibody for IL-10 receptor. It is interesting to note that in the particular setting of newborn rats, OM-85 increased the production of IFN- γ and decreased that of IL-4 by spleen cells (28). When a neutralizing anti-TGF- β antibody was administered immediately after OM-85, a major role was evidenced for TGF- β because the protective effect of the drug was essentially lost. It is not clear, however, which cells produce TGF- β in this context and what its cellular target is. TGF- β could be produced by regulatory T-cells or induce their differentiation, as suggested in other models (29–33). Our *in vitro* studies show that OM-85 stimulates dendritic cells and induces very high levels of TGF- β production in a TLR-dependent fashion by splenocytes (TGF- β production was not observed using splenocytes derived from TLR4^{-/-} or MyD88^{-/-} mice). This TLR-mediated effect of OM-85 may also involve TLR-2, although TLR-2^{-/-} mouse splenocytes are still at least partly sensitive to OM-85. Other cytokines are produced on OM-85 stimulation, such as IL-12 and -10, which could open other perspectives. In any event, it is interesting to mention our unpublished recent results showing that various chemically defined TLR agonists afford type 1 diabetes protection in the same manner as OM-85: Pam₃Cys and P40 for TLR-2, poly(I:C) for TLR-3, and lipopolysaccharide for TLR-4. As far as OM-85 is concerned, lipopolysaccharide is probably not the moiety involved in TLR-4 stimulation because it is not found in the extract, even at a very low concentration.

We recently reported a critical role for CD1d-dependent NKT cells in exacerbated T-helper type 2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness (34) and in autoimmune diabetes-prone NOD mice (35–36). The data presented in this article confirm that NKT cells are implicated in type 1 diabetes. One should mention, however, that in our present study, both mouse strains (CD1d^{-/-} and wild type) showed a similar type 1 diabetes incidence, a finding in clear contrast with another report (37), but in the line of that of Van Kaer (38), who provided us with the mice used here. If NKT cells are indeed involved in the OM-85-mediated protection, it will be important to determine which component within OM-85 stimulates NKT cells and what mechanisms mediate NKT cell involvement. IL-4, as suggested by Oki et al. (39) and Mi et al. (40), and IL-10, as suggested by Mi et al. (41), could be incriminated, even though we have *a priori* excluded these two cytokines as major protagonists in our type 1 diabetes model. In any case, the role of NKT cells in type 1 diabetes protection is only partial because CD1d^{-/-} NOD mice still show some sensitivity to OM-85.

An implication of effector cells is possible though unlikely in our model because treating NOD SCID mice with OM-85 after transfer of diabetogenic T-cells does not delay diabetes onset (data not shown). Note, however, that other mechanisms cannot be excluded. Thus, it has been

shown that Bacille Calmette-Guerin, CFA (42), or the lymphocytic choriomeningitis virus (43) may induce protection through IFN- γ - and TNF- α -mediated T-cell apoptosis.

To conclude, these studies bring new insight into the cellular and molecular mechanisms underlying the type 1 diabetes protection afforded by OM-85. Our data incriminate TGF- β and NKT cells, possibly through TLR stimulation. One possibility linking TGF- β and the antidiabetic effect observed in our model could be that the OM-85-induced secretion of TGF- β (as reported here) would in turn induce the production of regulatory FoxP3⁺ cells from CD4⁺CD25⁺ precursors, as recently suggested (44). Further studies are needed to elucidate this point. Other mechanisms are of course not excluded. One may assume that the complexity of the OM-85 molecular composition contributes to the multifactorial nature of its mode of action. It would be interesting to analyze the action of individual components of the extract. On the other hand, one must take into account the fact that OM-85 is used clinically and that the simultaneous presence of several pharmacologically active components represents an interesting correlation to the overall effect of bacterial infections.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation and the Fondation pour la Recherche Médicale and by a contribution from OM Pharma.

The authors thank L. Van Kaer and A. Herbelin for providing CD1d^{-/-} NOD mice at backcross 6 and 12, respectively. The authors acknowledge S. Akira for providing MyD88^{-/-}, TLR-2^{-/-}, and TLR-4^{-/-} mice and D. Mathis for providing IL-4^{-/-} NOD mice. We are indebted to Anne Esling and Berta Segovia for technical help and to Martine Netter for iconography. We also thank J.A. Bluestone and A. O'Garra for providing the monoclonal antibodies used in the study.

REFERENCES

- Gale EA: The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51:3353–3361, 2002
- Bach JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347:911–920, 2002
- Feillet H, Bach JF: On the mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol* 11:191–194, 2004
- Harada M, Kishimoto Y, Makino S: Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. *Diabetes Res Clin Pract* 8:85–89, 1990
- Bras A, Aguas AP: Diabetes-prone NOD mice are resistant to *Mycobacterium avium* and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* 89:20–25, 1996
- Oldstone MB: Viruses as therapeutic agents. I. Treatment of nonobese insulin-dependent diabetes mice with virus prevents insulin-dependent diabetes mellitus while maintaining general immune competence. *J Exp Med* 171:2077–2089, 1990
- Takei I, Asaba Y, Kasatani T, Maruyama T, Watanabe K, Yanagawa T, Saruta T, Ishii T: Suppression of development of diabetes in NOD mice by lactate dehydrogenase virus infection. *J Autoimmun* 5:665–673, 1992
- Wilberz S, Partke HJ, Dagnaes-Hansen F, Herberg L: Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 34:2–5, 1991
- Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, Dunne DW: Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol* 21:169–176, 1999
- Audibert F, Chedid L, Lefrancier P, Choay J, Lederer E: Relationship between chemical structure and adjuvant activity of some synthetic

- analogues of N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP). *Ann Immunol (Paris)* 128C:653–661, 1977
11. Chedid L, Parant M, Parant F, Audibert F, Lefrancier F, Choay J, Sela M: Enhancement of certain biological activities of muramyl dipeptide derivatives after conjugation to a multi-poly(DL-alanine)-poly(L-lysine) carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6557–6561, 1979
 12. Chang YH, Pearson CM, Chedid L: Adjuvant polyarthritis. V. Induction by N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, the smallest peptide subunit of bacterial peptidoglycan. *J Exp Med* 153:1021–1026, 1981
 13. Shehadeh N, Calcinaro F, Bradley BJ, Bruchlim I, Vardi P, Lafferty KJ: Effect of adjuvant therapy on development of diabetes in mouse and man. *Lancet* 343:706–707, 1994
 14. Lucas C, Bald LN, Fendly BM, Mora-Worms M, Figari IS, Patzer EJ, Palladino MA: The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation: a study with a monoclonal antibody-based ELISA. *J Immunol* 145:1415–1422, 1990
 15. Castro AG, Neighbors M, Hurst SD, Zonin F, Silva RA, Murphy E, Liu YJ, O'Garra A: Anti-interleukin 10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of lipopolysaccharide. *J Exp Med* 192:1529–1534, 2000
 16. Bahr GM, Carelli C, Audibert F, Modabber F, Chedid L: Analysis of the antigenic relationship of various derivatives of n-acetyl-muramyl-l-ala-d-isoglutamine (MDP), using anti-MDP antibodies. *Mol Immunol* 19:737–745, 1982
 17. Specter S, Cimprich R, Friedman H, Chedid L: Stimulation of an enhanced in vitro immune response by a synthetic adjuvant, muramyl dipeptide. *J Immunol* 120:487–491, 1978
 18. Parant MA, Pouillart P, Le Contel C, Parant FJ, Chedid LA, Bahr GM: Selective modulation of lipopolysaccharide-induced death and cytokine production by various muramyl peptides. *Infect Immun* 63:110–115, 1995
 19. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR: CD1 recognition by mouse NK1 + T lymphocytes. *Science* 268:863–865, 1995
 20. Bloemendal A, Van der Zee R, Rutten VP, van Kooten PJ, Farine JC, van Eden W: Experimental immunization with anti-rheumatic bacterial extract OM-89 induces T cell responses to heat shock protein (hsp)60 and hsp70; modulation of peripheral immunological tolerance as its possible mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 110:72–78, 1997
 21. Vischer TL: Subreum (OM-8980): an anti-arthritis *E. coli* extract. *Clin Exp Rheumatol* 11 (Suppl. 8):S121–S123, 1993
 22. Dhaher YY, Khamashta MA, Hartley B, Taub N, Farine JC, Hughes GR: The effect of OM-89 (Subreum) on the murine model of systemic lupus erythematosus MRL-lpr/lpr. *Lupus* 6:436–440, 1997
 23. Keyser FD, Mielants H, Veys EM: Current use of biologicals for the treatment of spondyloarthropathies. *Expert Opin Pharmacother* 2:85–93, 2001
 24. Kolb H, Worz-Pagenstert U, Kleemann R, Rothe H, Rowsell P, Scott FW: Cytokine gene expression in the BB rat pancreas: natural course and impact of bacterial vaccines. *Diabetologia* 39:1448–1454, 1996
 25. Hartmann B, Bellmann K, Ghiea I, Kleemann R, Kolb H: Oral insulin for diabetes prevention in NOD mice: potentiation by enhancing Th2 cytokine expression in the gut through bacterial adjuvant. *Diabetologia* 40:902–909, 1997
 26. Schaad UB, Mutterlein R, Goffin H: Immunostimulation with OM-85 in children with recurrent infections of the upper respiratory tract: a double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Chest* 122:2042–2049, 2002
 27. Del-Rio-Navarro BE, Luis Sienna-Monge JJ, Berber A, Torres-Alcantara S, Avila-Castanon L, Gomez-Barreto D: Use of OM-85 BV in children suffering from recurrent respiratory tract infections and subnormal IgG subclass levels. *Allergol Immunopathol (Madri)* 31:7–13, 2003
 28. Bowman LM, Holt PG: Selective enhancement of systemic Th1 immunity in immunologically immature rats with an orally administered bacterial extract. *Infect Immun* 69:3719–3727, 2001
 29. Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W: Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 198:1179–1188, 2003
 30. Nakamura K, Kitani A, Strober W: Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629–644, 2001
 31. Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, Strober W: TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172:834–842, 2004
 32. Belghith M, Bluestone JA, Barriot S, Megret J, Bach JF, Chatenoud L: TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* 9:1202–1208, 2003
 33. Bach JF, Francois Bach J: Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3:189–198, 2003
 34. Araujo LM, Lefort J, Nahori MA, Diem S, Zhu R, Dy M, Leite-de-Moraes MC, Bach JF, Vargaftig BB, Herbelin A: Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur J Immunol* 34:327–335, 2004
 35. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Mi QS, Sondhi J, Naidenko OV, Kronenberg M, Koezuka Y, Delovitch TL, Gombert JM, Leite-De-Moraes M, Gouarin C, Zhu R, Hameg A, Nakayama T, Taniguchi M, Lepault F, Lehuen A, Bach JF, Herbelin A: Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune type 1 diabetes. *Nat Med* 7:1057–1062, 2001
 36. Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC: Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14-Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 188:1831–1839, 1998
 37. Shi FD, Flodstrom M, Balasa B, Kim SH, Van Gunst K, Strominger JL, Wilson SB, Sarvetnick N: Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6777–6782, 2001
 38. Van Kaer L: Natural killer T cells as targets for immunotherapy of autoimmune diseases. *Immunol Cell Biol* 82:315–322, 2004
 39. Oki S, Chiba A, Yamamura T, Miyake S: The clinical implication and molecular mechanism of preferential IL-4 production by modified glycolipid-stimulated NKT cells. *J Clin Invest* 113:1631–1640, 2004
 40. Mi QS, Ly D, Zucker P, McGarry M, Delovitch TL: Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes* 53:1303–1310, 2004
 41. Mi QS, Meagher C, Delovitch TL: CD1d-restricted NKT regulatory cells: functional genomic analyses provide new insights into the mechanisms of protection against type 1 diabetes. *Novartis Found Symp* 252:146–160 [discussion 160–144, 203–110], 2003
 42. Qin HY, Chaturvedi P, Singh B: In vivo apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN-gamma/TNF-alpha. *Int Immunol* 16:1723–1732, 2004
 43. Christen U, Benke D, Wolfe T, Rodrigo E, Rhode A, Hughes AC, Oldstone MB, von Herrath MG: Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *J Clin Invest* 113:74–84, 2004
 44. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Zhang H, Ding Y, Bromberg JS: TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* 4:1614–1627, 2004

Manuscrit n°2

Immunoregulatory responses induced through TLRs and potential therapeutic implications for autoimmune diseases

Aumeunier A, Grela F, Bardel E, Damotte D, Akira S, Dy M, Thieblemont N, Bach JF.
Manuscrit soumis.

Après avoir mis en évidence les vertus protectrices d'un mélange bactérien, nous nous sommes demandés dans ce deuxième travail si un traitement avec des structures purifiées de pathogènes agonistes des TLR était suffisant pour induire une protection de la souris NOD contre le diabète.

Nous avons ainsi traité des animaux avec la lipoprotéine Pam₃Cys (TLR2), le Poly(I:C), analogue structural des ARNdb (TLR3), le LPS (TLR4) et le R848 (TLR7). Nous avons observé une protection totale chez les animaux traités par Poly(I:C) et LPS et seulement un retard dans le développement de la maladie pour les souris ayant reçu Pam₃Cys et R848. En accord avec ces résultats, nous montrons que le blocage de la voie TLR4 par l'antagoniste phosphatidylinositol annule toute protection et a tendance à accélérer la pathologie. Néanmoins, tous ces traitements ne sont efficaces que lorsqu'ils commencent à être administrés pendant la phase prédiabétique, c'est-à-dire avant 12 semaines d'âge. Par ailleurs, bien que les traitements protecteurs ne bloquent pas complètement l'infiltration des îlots de Langerhans, ils semblent tout de même diminuer l'inflammation et conserver un nombre suffisant d'îlots pour maintenir la fonction pancréatique. En effet, dans les pancréas de souris protégées, on trouve un plus grand nombre d'îlots et de plus grande taille que chez les animaux non traités qui ne possèdent souvent que quelques îlots atrophiques.

Nous avons étudié les mécanismes mis en jeu dans cette protection et avons postulé que la stimulation TLR pendant la phase prédiabétique pouvait cibler les cellules T régulatrices dont le rôle a largement été décrit dans la prévention des maladies autoimmunes. Nous avons ainsi mis en évidence qu'un traitement par du Pam₃Cys, LPS ou R848 induisait le recrutement des cellules CD4⁺CD25⁺ dans le sang. Par ailleurs, ces mêmes agonistes sauf le LPS étaient capables d'induire la production d'IL-10 et de TGF-β dans le sérum. Cette production est activée *via* les TLR puisque nous montrons que des cellules spléniques

stimulées par ces agonistes *in vitro* induisent de l'IL-10 et du TGF- β d'une manière dépendante de MyD88.

Ce deuxième travail a permis de mettre en évidence le fait que le traitement par des structures purifiées de pathogènes suffit à protéger totalement des souris du diabète. Nous avons ainsi pu montrer que la stimulation TLR est primordiale et qu'elle pourrait participer à la protection des maladies autoimmunes par les infections.

Immunoregulatory responses induced through TLRs and potential therapeutic implications for autoimmune diseases

By Aude Aumeunier^{1,5}, Françoise Grela^{1,5}, Emilie Bardel¹, Diane Damotte², Shizuo Akira³, Michel Dy¹, Nathalie Thieblemont^{1,6}, Jean-François Bach^{4,6}

¹ CNRS UMR 8147, Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital, Paris, France

² Anatomopathology service, Hôtel-Dieu Hospital, Paris, France

³ Department of Host Defense, Osaka University, Osaka 565-0871 Japan

⁴ INSERM U580, Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital, Paris, France

⁵ Both authors participated equally.

⁶ Both authors shared leadership.

Running title

TLR stimulation prevents the onset of diabetes

Corresponding author : Nathalie Thieblemont, Ph.D, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres Paris 75015 France. Tel : +33.1.44.49.53.88, Fax : +33.1.44.49.06.76. Email : nathmont@necker.fr.

Keywords

Toll-like receptor; MyD88; autoimmune diabetes; immunoregulatory cytokines

Abbreviations

LPS, lipopolysaccharide; NOD, non-obese diabetic; Pam₃Cys, *S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-*RS*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-Cys-(*S*)-Ser-Lys₄-OH; Poly(I:C), polyinosinic-polycytidylic acid; R848, resiquimod, TLR, Toll-like receptor

Manuscript information: 26 pages, 5 Figures and 1 table

Word Count: Abstract 169 words, Text 3,741 words, captions to all tables and figures 462 words.

ABSTRACT

OBJECTIVE: According to the hygiene hypothesis, infectious agents may inhibit the development of autoimmune and allergic diseases. To explore the mechanisms underlying this phenomenon, we tested the capacity of Toll-like receptors (TLRs) to control the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD).

RESEARCH DESIGN AND METHODS: We analyzed the effect of TLR stimulation on diabetes onset using NOD mice and examined the potential implication of regulatory cells and immunoregulatory cytokines.

RESULTS: Here, we demonstrate that some microbial components described as TLR2, 3, 4 and 7 agonists protect NOD mice from disease. The protection is associated with the capacity of these compounds to induce both DC and CD4⁺CD25⁺ Treg cell expansion and to selectively stimulate the production of the immunosuppressive cytokines such as IL-10 and TGF- β *in vivo*. We further show that TLR stimulation also induces these cytokines *in vitro* in a MyD88-dependent fashion.

CONCLUSIONS: Our results provide a mechanistic insight into the protective effect of infections against autoimmunity suggesting new therapeutic approaches for the prevention of autoimmune diseases.

Epidemiological data show strong evidence for a steady rise in the incidence of allergic and autoimmune diseases in developed countries over the past three decades (1). The best evidence for a causal relationship between the decline of endemic infections and the increase in these immune disorders is derived from animal models in which a whole array of bacterial, viral and parasitic infections have been shown to be protective (2-6).

Infections and more precisely pathogen-derived molecular patterns are recognized by Toll-like receptors (TLRs) expressed by immune cells and in particular antigen-presenting cells, such as dendritic cells (DCs). TLR2 is essential for the signaling of bacterial lipoprotein/lipopeptides (7). TLR3 and 7 are selectively activated by double- or single-stranded ribonucleic acids (dsRNA or ssRNA) which are associated with viral infection (8-10). TLR4 recognizes lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria (11). Upon stimulation, TLRs recruit IL-1R-associated protein kinases via adaptor MyD88, which in turn induces the activation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases (12;13).

Type 1 diabetes is a Th1-driven autoimmune disease in which lymphocytes infiltrate and destroy pancreatic β cells producing insulin, leading to hyperglycemia. It is regulated by both Th2 and regulatory cells ($CD4^+CD25^+$ Treg, NKT, ...) (14;15) and immunoregulatory cytokines including IL-10, IL-4 or TGF- β (16-18). Indeed, FoxP3-deficient mice lacking $CD4^+CD25^+$ Treg cells have been demonstrated to develop a multiple-organ autoimmune disease including type 1 diabetes (19-21). One may assume that Treg cells ensure their function *via* immunoregulatory cytokine production.

We previously demonstrated that a bacterial extract containing both TLR2 and TLR4 agonists was able to protect non-obese diabetic (NOD) mice, which develop a spontaneous diabetes from 12 weeks of age up to 80% of incidence in female (22). We addressed the question whether purified molecules stimulating the specific TLR pathways could also inhibit diabetes development. We show here that treatment of NOD mice with TLR2, 3, 4 and 7 agonists protects them from diabetes onset. As these molecules induce Treg expansion and immunoregulatory cytokines production such as IL-10 and TGF- β , we postulate that protection could account for these mechanisms.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Mice. Wild-type C57BL/6 (purchased from Janvier) and female mice of the NOD (K^d, I-A^{g7}, D^b) strain were maintained in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. TLR2-, TLR3-, TLR4- and MyD88-deficient mice (C57BL/6 genetic background) have been described previously (12). All mice were bred in our animal facility, in agreement with current European legislation on animal care, housing and scientific experimentation as assessed by inspectors of the Veterinary Services of Paris and the French Research Ministry.

Reagents. The lipopeptide *S*-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-*RS*)-propyl]-*N*-palmitoyl-(*R*)-Cys-(*S*)-Ser-Lys4-OH, trihydrochloride or Pam₃Cys, purified LPS from *S. minnesota* and R848 were commercially obtained by Alexis Biochemicals. Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I:C)) and Phosphatidylinositol (PtdIns) were purchased from Sigma-Aldrich.

T cell assays. 2.10⁵ splenocytes were cultured in duplicate in a final volume of 200 µl/well in 96-well flat-bottom microtiter plates (BD) in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 5 × 10⁻⁵ M 2 β-mercaptoethanol (Invitrogen). Splenocytes were exposed to agonists of TLRs at varying doses as indicated in figure legends for 48 (IL-10) or 72 (TGF-β) hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. For TGF-β, responses to TLR agonists were compared to control cultures performed in the presence of medium alone. Supernatants were harvested and stored at -20°C until further analysis.

Flow Cytometry. Fluorochrom-labeled antibodies to CD11b, CD11c, Ly6C, CD4 and CD25 were from BD Pharmingen. Cells were stained in PBS plus 5% heat-inactivated FCS (Invitrogen) plus 0.01% sodium azide and fixed by using PBS plus 1.0 % formaldehyde (Sigma Aldrich). Control staining was performed by using isotype-matched biotin-labeled irrelevant antibodies. CellQuest software (BD) was used for acquisition and analysis.

Cell preparation and culture of DCs. Bone marrow-derived myeloid dendritic cells were isolated from the femurs of mice. Briefly, the bone marrow was flushed out with

HBSS medium supplemented with 100U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, pH 7.4. Then cells were plated at a density of 2×10^6 cell per petri dish (BD) and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 25mM HEPES, 1% MEM non-essential amino-acid 100X, 1% MEM sodium pyruvate 100X, 5×10^{-5} M 2 β -mercaptoethanol, 0.1 mg/ml gentamycin and 10% supernatant of J558 cell line transfected with granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) gene. The medium was partially removed and fresh medium was added every three days (23). At day 9, immature DCs were collected and stimulated by a TLR agonist in a fresh medium for 24 hours. Supernatants were then collected and stored at -20°C until tested for IL-12 p40.

ELISA assays for cytokine production. DuoSet kits for IL-12 p40, TGF- β and IL-10 (R&D Systems) were used. The concentrations of cytokines are shown as the mean nanograms or picograms per milliliter derived from calibration curves using recombinant cytokines as standards.

Monitoring for development of diabetes. Mice were treated with several TLR agonists from the age of 3 to 4 weeks and were monitored weekly for clinical signs of diabetes using Gluko-Test reagent sticks, detecting the presence of glucose in the urine (Boehringer Mannheim). On some occasions, blood glucose levels were determined using Haemo-Glukotest 1-44R reagent sticks and a Reflolux S glucometer (Boehringer Mannheim). Mice were considered diabetic when urine glucose levels exceeded 55 mmol/l or when plasma glucose levels exceeded 11 mmol/L on 3 different days within 1 wk.

Histological analysis. Pancreas from NOD mice were fixed in 4% formaldehyde, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin and eosin. Pancreatic sections were microscopically examined for the presence of insulinitis.

Statistical analysis. Diabetes incidence was plotted using the Kaplan-Meier method, i.e. a non-parametric cumulative survival plot. Statistical comparison between curves was

performed using the logrank (Mantel-Cox) test that provided the corresponding χ^2 values. Mean values were compared using the Mann-Whitney test.

RESULTS

Stimulation of the TLR pathways differentially modulates onset of spontaneous diabetes in female NOD mice. To determine whether stimulation of the TLR2, TLR3, TLR4 or TLR7 signaling pathways affects type 1 diabetes (T1D) onset, NOD mice were treated with selective ligands of each of these TLRs. It was previously verified that each agonist tested *in vivo* stimulated IL-12 production *in vitro* in bone marrow-derived dendritic cells (DC) from wild-type mice but not in cells from the corresponding TLR- or MyD88-deficient mice (Table 1). Cohorts of 3- to 4-week-old female NOD mice were treated orally with the TLR2 agonist, Pam₃Cys. Results show that Pam₃Cys treatment decreased the incidence of the disease (up to 50%) (Fig. 1A). NOD mice intraperitoneally treated with the TLR3 agonist Poly(I:C) and the TLR4 agonist LPS were even more efficiently protected from diabetes onset: 100% of poly(I:C)- or LPS-treated mice remained normoglycemic for 30 weeks, whereas in control mice diabetes started at 12 or 14 weeks of age. Similarly, treatment of NOD mice with the TLR7 agonist, R848, significantly delayed diabetes onset. It is of note that not all TLR agonists confer protection as lipid A, which signals through TLR4, failed to inhibit the disease (data not shown). Treatment of NOD mice with phosphatidylinositol (PtdIns), a TLR4 antagonist, has no incidence or accelerated diabetes onset. TLR agonists were more protective when given at an early age since the efficiency of both TLR2 and TLR3 agonists declined after 10 weeks of age (data not shown and Fig. 1B). No significant effect was observed when the treatment was started at 16 weeks, when control mice started to develop diabetes.

Protective TLR agonists delay insulinitis

Histological analysis of pancreas of mice treated with TLR agonists, which were efficiently protected from diabetes, revealed differential infiltration of islets. Indeed, the subgroup of protected mice treated with Pam₃Cys (Fig 2B) exhibits 45.8% of non-infiltrated islets and 22.9% of peri-insulinitis as compared to the 85.6% of insulinitis observed in PBS-treated mice (Fig 2A). In mice administered with LPS, most of the islets were non-infiltrated (32.2%) or showed peri-insulinitis (49.9%) (Fig 2D). A similar observation applied to the subgroup of mice treated with Poly(I:C) (Fig 2C) or R848 (Fig 2E), which displayed a high percentage of insulinitis (68.4% and 78.1% respectively).

Although highly infiltrated, the number and size of islets was superior to that of non-treated mice which exhibited atrophic islets. These observations suggest that infiltration of the pancreas does not necessarily results in disease progression.

TLR agonists induce regulatory cell recruitment. Both CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and dendritic cells delay diabetes development in NOD mice (14;24-27). To understand which mechanisms account for this protection, we tested the involvement of DCs by examining how their activity was modulated by TLR stimulation. We observed that TLR agonists induced recruitment of both myeloid (CD11b⁺CD11c⁺) and plasmacytoid (CD11c⁺Ly6C⁺) dendritic cells and myeloid suppressive CD11b⁺Ly6C⁺ cells (data not shown). Next we tested whether Tregs could also be modulated after TLR stimulation. Interestingly, Pam₃Cys, LPS and R848 injections increased the proportion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in blood (Fig 3) significantly, while Poly(I:C) failed to do so (data not shown).

TLR agonists modulate the level of immunoregulatory cytokines *in vivo*. As Treg population was modulated, we then tested whether TLR agonists treatment may modulate the level of immunoregulatory cytokines *in vivo* in NOD mice. Interestingly, we found that treatment with Pam₃Cys increased the level of IL-10 in sera tenfold (Fig. 4). The TLR3 and TLR7 agonists Poly(I:C) and R848 were also strong inducers of IL-10. Nevertheless, only Poly(I:C) and R848 were able to activate TGF-β production. It is to note that treatment with LPS induced neither IL-10 nor TGF-β in sera. This result is of particular interest as the protective role of IL-10 and TGF-β has been largely described in pathophysiological conditions (16;17;21;28).

Stimulation with TLR agonists induces immunoregulatory cytokine production *in vitro* in a MyD88-dependent manner. To better understand how these compounds induced immunoregulatory cytokines, we then tested on murine splenocytes their ability to produce them *in vitro*. As shown in Fig. 5, IL-10 production was induced by the different compounds in a MyD88-dependent way, with a very strong upregulation when using R848. TGF-β production was also increased, especially when cells were stimulated with Pam₃Cys but the dependency of the MyD88 pathway was less defined. It

is to note that levels of cytokine production in the control mice with a genetic B6 background were comparable to those observed in NOD (data not shown). Collectively, these data show that various TLR agonists differentially induce production of immunoregulatory cytokines.

DISCUSSION

In this study, we present evidence that treatment of NOD mice with TLR2 (Pam₃Cys), TLR3 (poly(I:C)), TLR4 (LPS) or TLR7 (R848) agonists, which are known to promote a dominant Th1 environment, can prevent the onset of spontaneous T1D. This is a paradoxical result since T1D in NOD mice is mediated by Th1 cells (29).

Our data show the first evidence of diabetes protection by a TLR2 and a TLR7 agonist. Since bacterial lipopeptides may form heterodimers with TLR1, we could not exclude the possible participation of this latter molecule in the signaling induced by Pam₃Cys. The protective effects of poly(I:C) and LPS in relation to diabetes have been previously investigated in the BB rat and NOD mice (30-33). In some experimental models, treatment with TLR agonists such as poly(I:C), LPS or R848 was inefficient or even accelerated diabetes onset as might have been expected from its capacity to stimulate Th1 cells (34;35). It should be realized, however, that at variance with the NOD mouse, which presents spontaneous disease, the two models of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)-glycoprotein-derived peptide for R848 (35) or insulin B: 9-23 peptide for Poly(I:C) (34) in which acceleration of the disease is induced, are antigen-driven. Similarly, acceleration of diabetes incidence was induced by LPS in a T cell antigen receptor transgenic (BDC2.5) model which also do not develop spontaneous diabetes (36).

Among protective mechanisms, Treg cells have been shown to be implicated in the control of the disease. The strongest evidence in favor of a control of self-reactivity by regulatory T cells mainly derives from experiments showing that selective cell depletion of normal T cells may lead to autoimmune disease. In the NOD mouse, diabetes onset is accelerated by thymectomy at 3 weeks of age or by cyclophosphamide. Our studies indicate that TLR-induced diabetes protection was correlated to the induction of immunoregulatory CD4⁺CD25⁺ T cells. These results are in agreement with studies describing an induction of CD4⁺CD25⁺ T cells by TLR2 (37;38) and TLR8 (39) ligands in non-autoimmune models.

Here we provide direct evidence that Pam₃Cys, Poly(I:C) and R848 stimulate a

significant increase of IL-10 and TGF- β in serum *in vivo*. Importantly, the production of immunoregulatory cytokines that was observed *in vitro* in splenocyte cultures by diabetes-protective TLR agonists, was abrogated by blockade of the MyD88 pathway. One may assume that these cytokines are involved for the *in vivo* protective effect of the TLR agonists under study. Nevertheless, protective mechanisms are distinct for each agonist as LPS induces a protection but fails to induce either IL-10 or TGF- β . This interpretation is reminiscent of the control of diabetes progression in NOD mice brought about by IL-10 and TGF- β in various models, whatever the still ill-defined nature of the cells producing these cytokines (monocytes, macrophages, DC, Th2, CD25⁺ cells...) may be. It may be important to mention the importance of TGF- β in T cell-mediated regulation of T1D (14;18). In the same line of evidence, hsp60 and OM-85 (described as TLR2 and TLR4 agonists) and CpG oligonucleotides (potential TLR9 agonist), have been shown to protect NOD mice from spontaneous diabetes (22;40). Furthermore, OM-85 and hsp60 have the capacity to induce both immunoregulatory cytokines such as IL-10 for the former and TGF- β for the latter in a MyD88-dependent fashion (22;41).

To conclude, our data show evidence that TLR stimulation may protect from Th1-mediated autoimmune diseases and this protection might be mediated by the production of regulatory cytokines and induction of regulatory cell subsets. These results provide an explanation for the protective role of infections on the development of autoimmune diseases. They also open up the possibility of investigating TLR agonists as potential therapeutic tools for the prevention of autoimmune diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

Aude Aumeunier is a fellow of the Association Française des Diabétiques. Françoise Grela is a fellow of the Fondation pour la Recherche Médicale. The authors thank Mireille Dardenne and Elke Schneider for critical reading. This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation, by ALFEDIAM and by the Day-Solvay Foundation.

REFERENCES

1. Bach,JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347:911-920, 2002
2. Bras,A, Aguas,AP: Diabetes-prone NOD mice are resistant to Mycobacterium avium and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* 89:20-25, 1996
3. Cooke,A, Tonks,P, Jones,FM, O'Shea,H, Hutchings,P, Fulford,AJ, Dunne,DW: Infection with Schistosoma mansoni prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* 21:169-176, 1999
4. Wilberz,S, Partke,HJ, Dagnaes-Hansen,F, Herberg,L: Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 34:2-5, 1991
5. Zaccane,P, Fehervari,Z, Jones,FM, Sidobre,S, Kronenberg,M, Dunne,DW, Cooke,A: Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur.J.Immunol.* 33:1439-1449, 2003
6. Oldstone,MB: Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239:500-502, 1988
7. Brightbill,HD, Libraty,DH, Krutzik,SR, Yang,RB, Belisle,JT, Bleharski,JR, Maitland,M, Norgard,MV, Plevy,SE, Smale,ST, Brennan,PJ, Bloom,BR, Godowski,PJ, Modlin,RL: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285:732-736, 1999

8. Alexopoulou,L, Holt,AC, Medzhitov,R, Flavell,RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738, 2001
9. Hemmi,H, Kaisho,T, Takeuchi,O, Sato,S, Sanjo,H, Hoshino,K, Horiuchi,T, Tomizawa,H, Takeda,K, Akira,S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat.Immunol.* 3:196-200, 2002
10. Heil,F, Hemmi,H, Hochrein,H, Ampenberger,F, Kirschning,C, Akira,S, Lipford,G, Wagner,H, Bauer,S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529, 2004
11. Poltorak,A, He,X, Smirnova,I, Liu,MY, Van Huffel,C, Du,X, Birdwell,D, Alejos,E, Silva,M, Galanos,C, Freudenberg,M, Ricciardi-Castagnoli,P, Layton,B, Beutler,B: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088, 1998
12. Adachi,O, Kawai,T, Takeda,K, Matsumoto,M, Tsutsui,H, Sakagami,M, Nakanishi,K, Akira,S: Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 9:143-150, 1998
13. Takeuchi,O, Akira,S: MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 270:155-167, 2002
14. Green,EA, Gorelik,L, McGregor,CM, Tran,EH, Flavell,RA: CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:10878-10883, 2003

15. Cooke,A, Phillips,JM, Parish,NM: Tolerogenic strategies to halt or prevent type 1 diabetes. *Nat.Immunol.* 2:810-815, 2001
16. Yang,Z, Chen,M, Wu,R, Fialkow,LB, Bromberg,JS, McDuffie,M, Naji,A, Nadler,JL: Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J.Immunol.* 168:6479-6485, 2002
17. Nitta,Y, Tashiro,F, Tokui,M, Shimada,A, Takei,I, Tabayashi,K, Miyazaki,J: Systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum.Gene Ther.* 9:1701-1707, 1998
18. You,S, Thieblemont,N, Alyanakian,MA, Bach,JF, Chatenoud,L: Transforming growth factor-beta and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunol.Rev.* 212:185-202, 2006
19. Khattri,R, Cox,T, Yasayko,SA, Ramsdell,F: An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat.Immunol.* 4:337-342, 2003
20. Fontenot,JD, Gavin,MA, Rudensky,AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330-336, 2003
21. Peng,Y, Laouar,Y, Li,MO, Green,EA, Flavell,RA: TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:4572-4577, 2004
22. Alyanakian,MA, Grela,F, Aumeunier,A, Chiavaroli,C, Gouarin,C, Bardel,E, Normier,G, Chatenoud,L, Thieblemont,N, Bach,JF: Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *diabetes* 55:179-185, 2006

23. Lutz,MB, Kukutsch,N, Ogilvie,AL, Rossner,S, Koch,F, Romani,N, Schuler,G: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J.Immunol.Methods* 223:77-92, 1999
24. Morin,J, Faideau,B, Gagnerault,MC, Lepault,F, Boitard,C, Boudaly,S: Passive transfer of flt-3L-derived dendritic cells delays diabetes development in NOD mice and associates with early production of interleukin (IL)-4 and IL-10 in the spleen of recipient mice. *Clin.Exp.Immunol.* 134:388-395, 2003
25. Gaudreau,S, Guindi,C, Menard,M, Besin,G, Dupuis,G, Amrani,A: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor prevents diabetes development in NOD mice by inducing tolerogenic dendritic cells that sustain the suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 179:3638-3647, 2007
26. Shinomiya,M, Fazle Akbar,SM, Shinomiya,H, Onji,M: Transfer of dendritic cells (DC) ex vivo stimulated with interferon-gamma (IFN-gamma) down-modulates autoimmune diabetes in non-obese diabetic (NOD) mice. *Clin.Exp.Immunol.* 117:38-43, 1999
27. Clare-Salzler,MJ, Brooks,J, Chai,A, Van Herle,K, Anderson,C: Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J.Clin.Invest* 90:741-748, 1992
28. Luo,X, Yang,H, Kim,IS, Saint-Hilaire,F, Thomas,DA, De,BP, Ozkaynak,E, Muthukumar,T, Hancock,WW, Crystal,RG, Suthanthiran,M: Systemic transforming growth factor-beta1 gene therapy induces Foxp3+ regulatory cells, restores self-tolerance, and facilitates regeneration of beta cell function in overtly diabetic nonobese diabetic mice. *Transplantation* 79:1091-1096, 2005

29. Bach,JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr.Rev.* 15:516-542, 1994
30. Tian,J, Zekzer,D, Hanssen,L, Lu,Y, Olcott,A, Kaufman,DL: Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 167:1081-1089, 2001
31. Seino,H, Takahashi,K, Satoh,J, Zhu,XP, Sagara,M, Masuda,T, Nobunaga,T, Funahashi,I, Kajikawa,T, Toyota,T: Prevention of autoimmune diabetes with lymphotoxin in NOD mice. *diabetes* 42:398-404, 1993
32. Takahashi,K, Satoh,J, Seino,H, Zhu,XP, Sagara,M, Masuda,T, Toyota,T: Prevention of type I diabetes with lymphotoxin in BB rats. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 69:318-323, 1993
33. Sobel,DO, Goyal,D, Ahvazi,B, Yoon,JW, Chung,YH, Bagg,A, Harlan,DM: Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. *J.Autoimmun.* 11:343-352, 1998
34. Moriyama,H, Wen,L, Abiru,N, Liu,E, Yu,L, Miao,D, Gianani,R, Wong,FS, Eisenbarth,GS: Induction and acceleration of insulitis/diabetes in mice with a viral mimic (polyinosinic-polycytidylic acid) and an insulin self-peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:5539-5544, 2002
35. Lang,KS, Recher,M, Junt,T, Navarini,AA, Harris,NL, Freigang,S, Odermatt,B, Conrad,C, Ittner,LM, Bauer,S, Luther,SA, Uematsu,S, Akira,S, Hengartner,H, Zinkernagel,RM: Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat.Med.* 11:138-145, 2005

-
36. Balasa,B, Van Gunst,K, Sarvetnick,N: The microbial product lipopolysaccharide confers diabetogenic potential on the T cell repertoire of BDC2.5/NOD mice: implications for the etiology of autoimmune diabetes. *Clin.Immunol.* 95:93-98, 2000
 37. Liu,H, Komai-Koma,M, Xu,D, Liew,FY: Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103:7048-7053, 2006
 38. Suttmuller,RP, den Brok,MH, Kramer,M, Bennink,EJ, Toonen,LW, Kullberg,BJ, Joosten,LA, Akira,S, Netea,MG, Adema,GJ: Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest* 116:485-494, 2006
 39. Peng,G, Guo,Z, Kiniwa,Y, Voo,KS, Peng,W, Fu,T, Wang,DY, Li,Y, Wang,HY, Wang,RF: Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 309:1380-1384, 2005
 40. Quintana,FJ, Rotem,A, Carmi,P, Cohen,IR: Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J.Immunol.* 165:6148-6155, 2000
 41. Cohen-Sfady,M, Nussbaum,G, Pevsner-Fischer,M, Mor,F, Carmi,P, Zanin-Zhorov,A, Lider,O, Cohen,IR: Heat shock protein 60 activates B cells via the TLR4-MyD88 pathway. *J.Immunol.* 175:3594-3602, 2005

TABLE 1. TLR agonists induce IL-12 production by DCs via the MyD88 pathway.

DC derived from C57BL/6 WT, TLR2^{-/-}, TLR3^{-/-}, TLR4^{-/-}, TLR7^{-/-} or MyD88^{-/-} mice were stimulated with Pam₃Cys (10 µg/ml), Poly(I:C) (1 µg/ml), LPS (0.1 ng/ml) or R848 (1µg/ml) and tested for IL-12 p40 production. Results expressed as mean cytokine level (pg/ml) ± SD of one representative of three experiments. Results are shown as mean cytokine level ± SD.

	WT	TLR2 ^{-/-}	TLR3 ^{-/-}	TLR4 ^{-/-}	TLR7 ^{-/-}	MyD88 ^{-/-}
none	134	309	178	123	202	164
Pam ₃ Cys	2326	230	not tested	3460	not tested	122
Poly(I:C)	1198	1752	182	344	478	488
LPS	1070	1426	254	98	876	254
R848	482	not tested	533	316	128	120

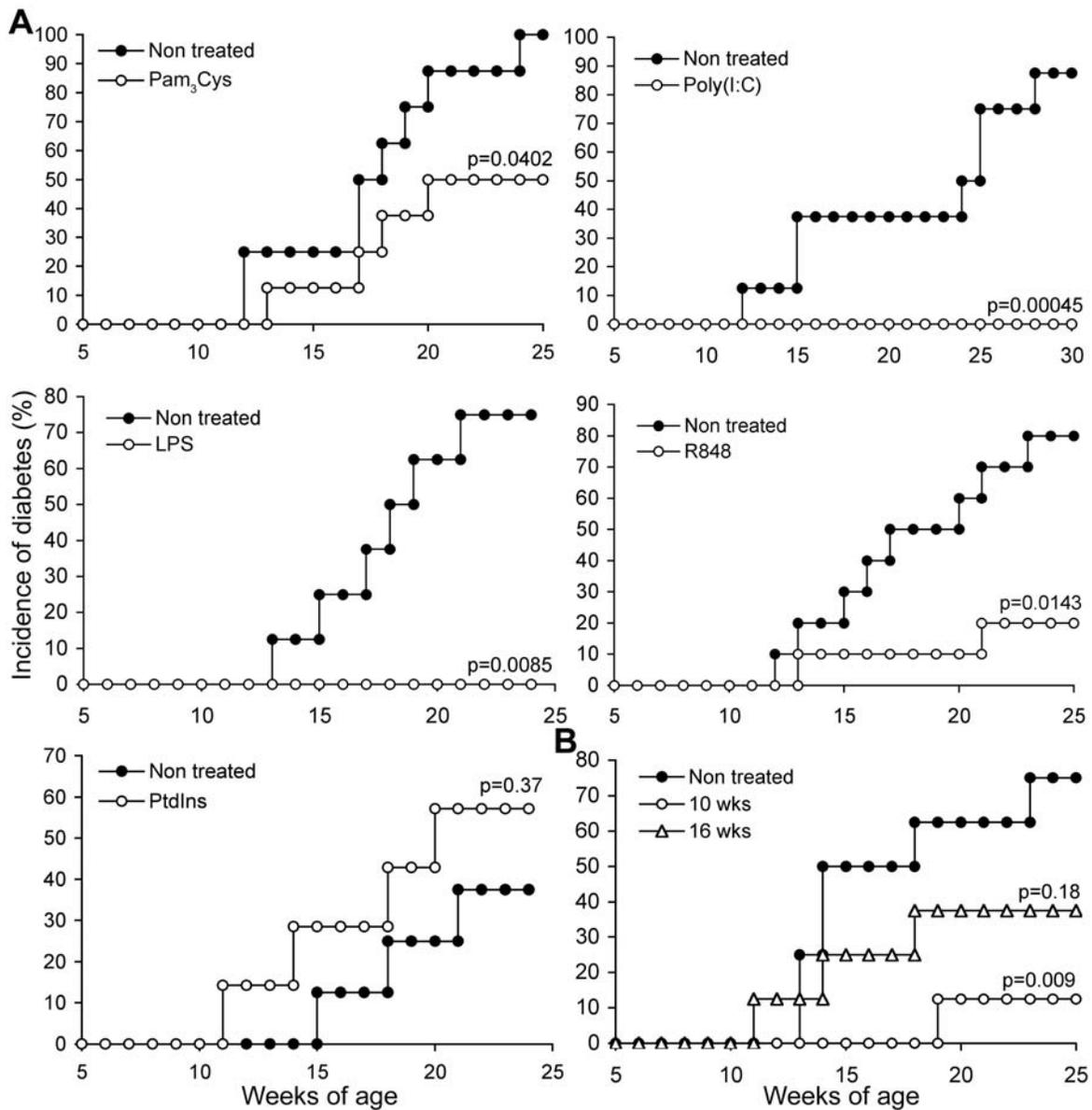


FIGURE 1. Stimulation of the TLR pathways differentially modulates onset of spontaneous diabetes in female NOD mice. (A) Female NOD mice were treated *per os* with Pam₃Cys or injected intraperitoneally with 100 μg Poly(I:C), 5 μg LPS from *S. Minnesota*, 10 μg R848 or 20 μg PtdIns (n=8 per group) once a week starting at 3 week of age until the end of the experiment. Control mice were treated with PBS. All mice were monitored weekly for diabetes. One representative experiment of at least two independent experiments is shown. (B) Onset of Poly(I:C) treatment. Injections were started either at 10 weeks or 16 weeks of age. One representative experiment of two independent experiments is shown.

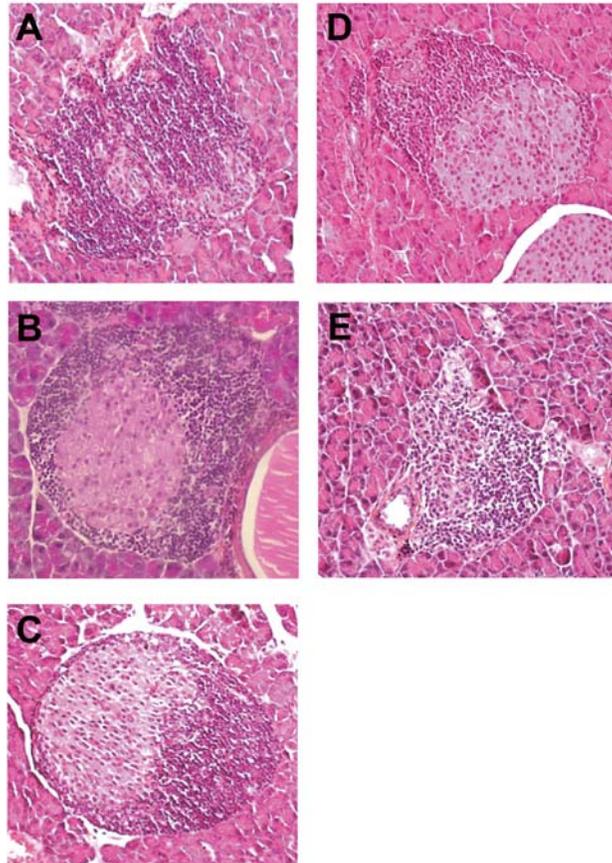


FIGURE 2. Decreased insulitis and islets destruction in pancreas of NOD mice treated with protective TLR agonists. Female NOD mice were treated with PBS (A), Pam₃Cys (B), Poly(I:C) (C), LPS (D) or R848 (E) (n=8 per group). Pancreatic sections were microscopically examined and islets inflammation was evaluated as percentage of non-infiltrated islets, peri-insulitis (B and D) and insulitis (A, C and E).

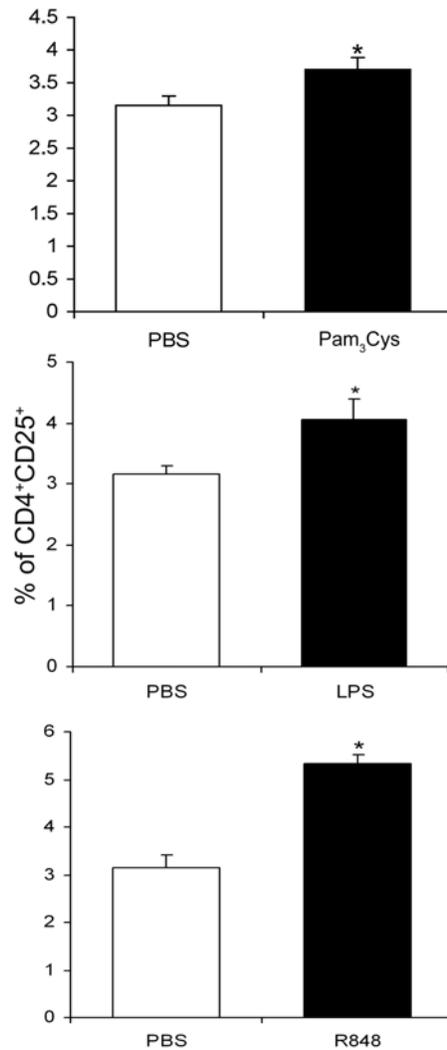


FIGURE 3. TLR agonists induce T regulatory cell recruitment to peripheral blood.

Female NOD mice were injected with 20 μ g Pam₃Cys, 5 μ g LPS or 10 μ g R848 (n=6 per group). The percentage of CD4⁺CD25⁺ lymphocytes was evaluated after 24 hours in peripheral blood by flow cytometry. Results are representative of at least two independent experiments.

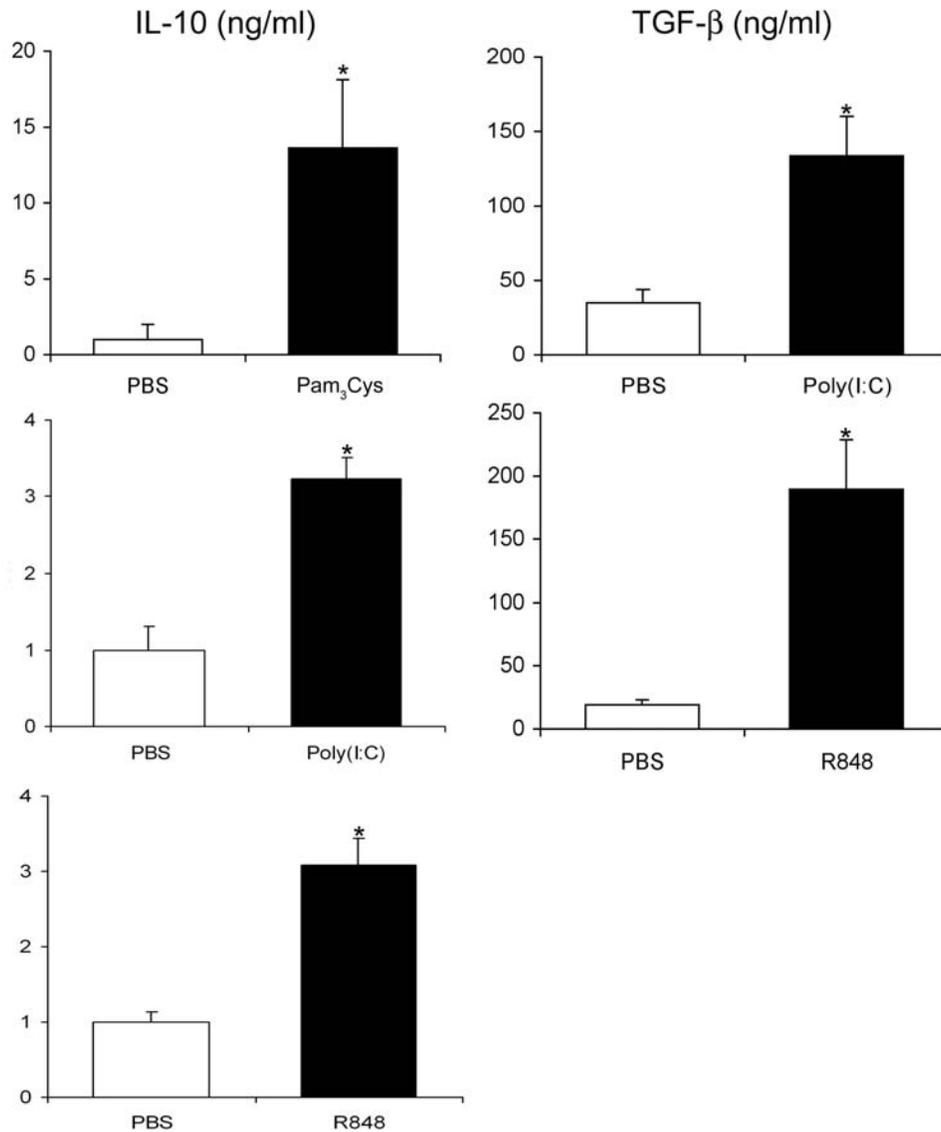


FIGURE 4. TLR agonists induce immunoregulatory cytokines in sera. Female NOD mice were injected intraperitoneally with 20 μ g Pam₃Cys, 100 μ g Poly(I:C), 5 μ g LPS or 10 μ g R848 (n=8 per group). Control mice were injected with PBS. The production of IL-10 and TGF- β was measured by ELISA in the collected sera.

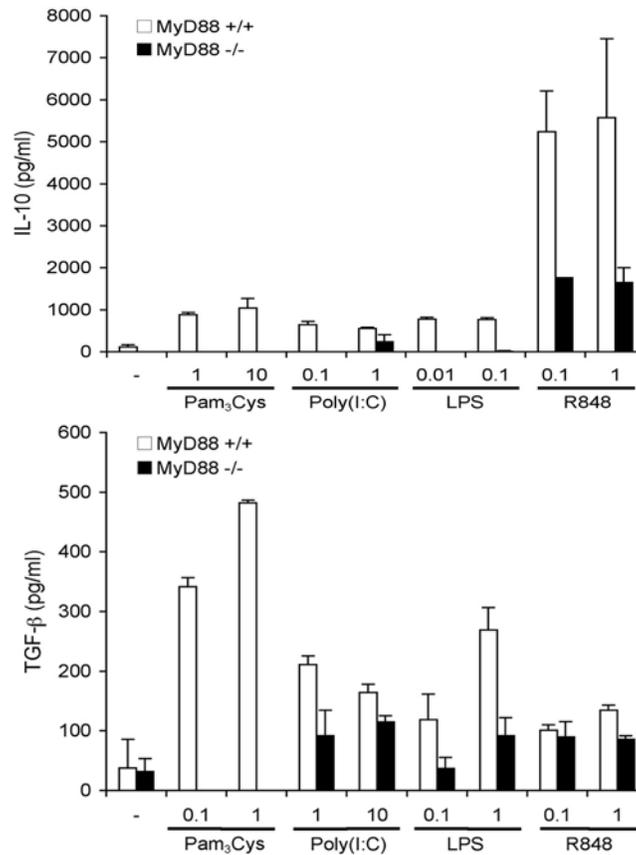


FIGURE 5. Stimulation with TLR agonists induces immunoregulatory cytokine production via the MyD88 pathway. Splenocytes from C57BL/6 MyD88^{+/+} or C57BL/6 MyD88^{-/-} mice were stimulated *in vitro* with various doses of Pam₃Cys, Poly(I:C), LPS and R848 (μg/ml) and tested for IL-10 and TGF-β production. Results are shown as mean cytokine level ± SD. Results are representative of at least three independent experiments.

Manuscrit n°3

TLR2 prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells

Grela F, Aumeunier A, Bardel E, N'Guyen T, Jeannin P, Dy M, Bach J.F, Thieblemont N.
Manuscrit soumis.

Le travail précédent nous a permis de mettre en évidence quelques mécanismes à l'origine des effets protecteurs des agonistes TLR et au cours de ce troisième travail, nous avons défini plus précisément pour la P40, une molécule de surface de *Klebsiella pneumoniae* activant TLR2, les phénomènes impliqués dans la protection.

Par rapport aux précédents agonistes, nous avons démontré que la P40 non seulement protégeait fortement du diabète mais continuait à le faire lorsque la durée du traitement était raccourcie. Par ailleurs, à l'opposé des molécules testées dans le précédent article, la P40 était capable de diminuer fortement l'insulite. En effet, la plupart des îlots des souris traitées n'étaient pas infiltrés.

Nous avons par la suite mis en évidence qu'à l'instar des agonistes des TLR2, 3, 4 et 7, la P40 induisait de grandes quantités de cytokines immunorégulatrices telles l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- β à la fois *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, aucune corrélation n'a pu être établie entre la production de ces cytokines et la protection observée. En effet, la neutralisation de ces médiateurs soit à l'aide de souris déficientes pour l'IL-4 ou d'anticorps bloquants pour le récepteur de l'IL-10 ou le TGF- β est insuffisante pour lever la protection induite par la P40.

Etant donné que nous avons précédemment démontré que la protection induite par un extrait bactérien contenant des agonistes de TLR2 et TLR4 dépendait des cellules NKT (article n°1), nous avons évalué l'implication des cellules dans ce modèle. Nous avons ainsi observé que des souris CD1d^{-/-} dépourvues de NKT et traitées par la P40 n'étaient plus protégées du diabète.

Ainsi, en complément du manuscrit n°2 qui décrivait le concept du traitement protecteur par des agonistes des TLR, ce travail apporte une réponse mécanistique de leur implication. En effet, nous montrons ici que la population régulatrice des NKT intervient dans les mécanismes protecteurs induits par cet agoniste de TLR2.

TLR2 prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells

F. Grela*, A. Aumeunier*, E. Bardel, T. N’Guyen, P. Jeannin, M. Dy, J. F. Bach, N. Thieblemont

F. Grela, A. Aumeunier, E. Bardel, M. Dy, N. Thieblemont
CNRS UMR 8147 and Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital,
Paris, France

T. N’Guyen
Microbiotechnology, Pierre Fabre Research Institute, Toulouse, France

P. Jeannin
INSERM U564, CHU, Angers, France

J. F. Bach
INSERM U580 and Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital,
Paris, France

Running title

TLR2 stimulation prevents the onset of diabetes

* These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to Dr. Nathalie Thieblemont, CNRS UMR 8147, Hôpital
Necker, 161 rue de Sèvres Paris 75015 France, Tel 33 1 44 49 53 88, Fax: 33 1 44 49 06
76, nathmont@necker.fr.

Manuscript information: 24 pages, 5 Figures

Word Count: Abstract 207 words, Text 3,888 words.

ABSTRACT

Aims/hypothesis It is well established that infections can prevent from immune disorders. We postulated that TLR stimulation could have such protective potential. We thus explored the capacity of a microbial ligand of TLR2, the P40 protein from *Klebsiella pneumoniae* membrane, to protect non-obese diabetic (NOD) mice from spontaneous autoimmune diabetes.

Methods The effect of a treatment with P40 on diabetes onset was analyzed using NOD mice. The implication of regulatory cells and cytokines known to be implicated in diabetes control was further investigated.

Results We observed that P40 protects mice from type 1 diabetes (T1D) by strongly inhibiting islet infiltration in pancreas. We next validated that the TLR2 agonist induced the production of immunoregulatory cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- β . However, inhibition of each of these molecules was not sufficient to abrogate T1D protection. Concerning the role of Natural killer T (NKT) cells, we observed that the P40-mediated prevention was lost in CD1d-deficient mice.

Conclusions/interpretation Our work indicates that P40 modulates several immunoregulatory pathways and NKT cells are critically involved in the P40-induced protective effect in T1D.

Keywords

Toll-like receptor; MyD88; autoimmune diabetes; NKT cells; immunoregulatory cytokines

Abbreviations

NOD: non-obese diabetic

TLR2: Toll-like receptor 2

NKT cells: Natural killer T cells.

INTRODUCTION

According to the hygiene hypothesis, the exposition to pathogens especially in early life can have been shown to decrease the risk of developing immune disorders such as allergic and autoimmune diseases [1,2]. Further results obtained in animal models confirmed these observations [3-6]. For example, a single injection with CFA (Complete Freund Adjuvant) can durably protect NOD mice and BB rats, two models of spontaneous diabetes, from T1D [7-10]. This protective effect has been attributed to the mycobacterial extract contained in CFA. Other studies have also revealed that infections with mycobacteria or administration of mycobacterial components such as heat shock protein (hsp) 65 could prevent from T1D [11-13].

Infections and more precisely pathogen-derived molecular patterns (PAMPs) are recognized by Toll-like receptors (TLRs) expressed both on immune and non-immune cells. Among these, TLR2 is the receptor recognizing the larger number of structures including peptidoglycan, bacterial lipoprotein/lipopeptides, hsp, the membrane protein P40 from *Klebsiella pneumoniae*, GPI lipids from trypanosomes or yeast zymosan [14,15]. This large pattern of recognition could be explained by its capacity to heterodimerize with TLR1 and TLR6 [16,17]. Indeed, the couple TLR2/TLR6 detects preferentially diacetylated proteins whereas TLR1/TLR6 rather sensed triacetylated proteins [17,18]. Upon stimulation, TLR2 recruits protein kinases via adaptor molecules such as MyD88, which activates the nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinases [19,20].

As mycobacterial extracts, supposed to activate TLR2, have been shown to strongly inhibit T1D onset [4,11,12] and as we have described that a bacterial extract containing both TLR2 and TLR4 was also protective [21,22], we postulated that a purified TLR2 agonist could have such protective potential. To test the hypothesis, we have examined the effect of P40 in the NOD mouse that spontaneously develops T1D that closely resembles to the human disease.

Data shown in this paper indicate that P40 protects from T1D by strongly inhibiting islet infiltration in pancreas. We also provide evidence that this molecule induces both *in vitro* and *in vivo*, large amounts of immunoregulatory cytokines like IL-4,

IL-10 and TGF- β . Nevertheless, no implication of these mediators has been observed in T1D. We investigated the role of Natural killer T (NKT) cells in the P40-induced protection. Our results validate that activation of NKT cells by the TLR2 agonist accounts for T1D onset prevention.

METHODS

Mice. Wild-type C57BL/6 and female mice of the NOD (K^d , $I-A^{g7}$, D^b) strain were maintained in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. MyD88-, CD1d- and IL-4-deficient mice (C57BL/6 or NOD background) have been described previously [21]. All mice were bred in our animal facility, in agreement with current European legislation on animal care, housing and scientific experimentation as assessed by inspectors of the Veterinary Services of Paris and the French Research Ministry.

Reagents. The P40 membrane protein of *Klebsellia pneumoniae* was purified as previously described [15]. Rat monoclonal antibody specific to the mouse IL-10 receptor (1B1 2.1C4 clone) was gently provided by A. O'Garra (DNAX, Palo Alto, CA) and monoclonal antibody to human TGF- β that cross-reacts and neutralizes murine TGF- β (2G7 clone) by C.J.M. Melief (Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands). A rat monoclonal anti-IgG antibody was used as negative control.

In vivo treatment. Female NOD mice were injected intraperitoneally (i.p.) with P40 or buffer and sera were collected 2 hours after. Samples were harvested and stored at -20°C until further analysis.

T cell assays. For induction of cytokines, 2×10^5 splenocytes were cultured in duplicate in a final volume of 100 μl /well in 96-well flat-bottom microtiter plates (BD). In all assays, cells were cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (Invitrogen), and 5×10^{-5} M 2 β -mercaptoethanol. Splenocytes were tested to TLR2 agonist at varying doses as indicated in figure legends. Cultures were incubated for 72 (TGF- β), 48 (IL-4, IL-10) hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . For TGF- β , responses to the TLR2 agonist was compared to responses in cultures performed in the presence of medium alone. From parallel cytokine cultures, supernatants were harvested and stored at -20°C until further analysis.

ELISA assays for cytokine production. DuoSet kits for TGF- β , IL-4, and IL-10 (R&D Systems) were used. The concentrations of cytokines are shown as the mean nanograms or picograms per milliliter derived from calibration curves using recombinant cytokines as standards.

Monitoring for development of diabetes. Mice were injected i.p. with 200 μ g of P40 per week from the age of 3 to 4 weeks and monitored weekly for clinical signs of diabetes using Gluko-Test reagent sticks, detecting the presence of glucose in the urine (Boehringer Mannheim). On some occasions, blood glucose levels were determined using Haemo-Glukotest 1-44R reagent sticks and a Reflolux S glucometer (Boehringer Mannheim). Mice were considered diabetic when urine glucose levels exceeded 55 mmol/l or when plasma glucose levels exceeded 11 mmol/L on 3 different days within 1 wk.

Histological analysis. Pancreas from NOD mice were fixed in 4% formaldehyde, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin and eosin. Pancreatic sections were microscopically examined for the presence of insulinitis.

Statistical analysis. Diabetes incidence was plotted using the Kaplan-Meier method, i.e. a non-parametric cumulative survival plot. Statistical comparison between curves was performed using the logrank (Mantel-Cox) test that provided the corresponding χ^2 values. Mean values were compared using the Mann-Whitney's test.

RESULTS

Stimulation of the TLR2 inhibits onset of spontaneous diabetes in female NOD mice by preventing insulinitis To determine whether stimulation of the TLR2 signalling pathway prevents diabetes onset, cohorts of 4- to 5-week-old female NOD mice were intraperitoneally treated with the *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A (P40), a TLR2 agonist once a week starting at 3 week of age until the end of the experiment. Results show that the treatment significantly delayed diabetes onset (Fig. 1a, $p = 0.027$). Treatment with this molecule was more efficient when mice were treated at an early age (data not shown). Since the treatment was highly protective, we next tested the efficiency of a shorter treatment with this TLR2 agonist. Interestingly, decreased length of the P40 treatment from 20 weeks to 10 weeks was sufficient to protect NOD mice from diabetes (Fig. 1b, $p = 0.0064$). Histological analysis of the pancreas of P40-treated NOD mice (Fig 1d) showed numerous and healthy islets (62.43%) with a low percentage of insulinitis (28.14%) compared to non-treated mice (Fig. 1c, 12.28% and 85.57% of healthy islets and insulinitis respectively). Moreover, number of islets was greater and size was larger than non-treated mice which exhibited atrophic islets.

P40 modulates the production of immunoregulatory cytokines via the MyD88 pathway We tested whether diabetes-protective P40 could stimulate the production of selected cytokines, particularly regulatory/suppressor cytokines. We first studied the effect of P40 on production of cytokines by spleen cells *in vitro*. We indeed observed that P40 induced the production of IL-4, IL-10 and TGF- β in C57BL/6 mice (Fig. 2). Similar results were obtained using spleen cells from NOD mice (data not shown). We further analyzed the MyD88-dependency of the capacity of P40 to stimulate the production of these molecules. P40 failed to induce a significant level of either IL-4, IL-10 or TGF- β in splenocytes from MyD88^{-/-} C57BL/6 mice (Fig. 2), demonstrating a critical role of the TLR2/MyD88 signalling pathway.

Since regulatory cytokines were stimulated *in vitro* by P40, we tested whether the TLR2 agonist treatment modulated the level of these cytokines in NOD mice *in vivo*. We found

that a single dose of P40 increased at least fivefold the sera level of IL-4, IL-10 and TGF- β (Fig. 3). These increases peaked at 6 hours and had disappeared at 24 hours.

Diabetes protection by P40 does not depend on IL-4, IL-10 or TGF- β To analyze the possible role of IL-4 in the P40-mediated protection of diabetes, we compared the effect of P40 administered intraperitoneally in IL-4^{-/-} and wild-type NOD mice. Results shown in Fig. 4 clearly indicate that the protective effect of P40 was not abrogated in IL-4^{-/-} NOD mice (control NOD vs P40-treated NOD, $p = 0.0064$; control IL-4^{-/-}NOD vs P40-treated IL-4^{-/-}NOD, $p = 0.0343$) (Fig. 4a), thus suggesting that P40-diabetes protection is a IL-4-independent active phenomenon. The protective role of IL-10 and TGF- β which has been largely described in type 1 diabetes [23,24], was evaluated in our protocol. To study the role of IL-10 and TGF- β on the diabetes protection afforded by P40, the compound was administered intraperitoneally in NOD mice starting at week 4 until week 16 of age, under the cover of either a monoclonal antibody directed to the IL-10 receptor or a monoclonal antibody directed against TGF- β . The antibodies were given at a dose of 1 mg three times a week, from 13 to 16 weeks of age. However, none of the two treatments abrogated the protective effect of P40 (P40-treated NOD vs P40 + anti-IL-10 receptor-treated NOD: $p = 0.06$; P40-treated NOD vs P40 + anti-TGF- β -treated NOD: $p = 0.085$) (Fig. 4b).

Collectively, these data show that P40 induces production of immunoregulatory cytokines *in vitro* and *in vivo* but in the experimental conditions used, inhibition of each one of these cytokines did not abrogate the diabetes protective effect of P40.

Role of NKT cells in p40-mediated protection CD1d^{-/-} mice are devoid of TCR invariant Natural Killer T (NKT) cells, whose intrathymic selection depends on CD1d [25]. CD1d^{-/-} NOD mice were treated with p40 (once a week starting treatment at 3 or 4 weeks of age, depending on the experiment). As shown in Fig.5, diabetes incidence was similar in untreated CD1d^{-/-} and wild-type NOD mice. Interestingly, it appears that P40-treated CD1d^{-/-} NOD mice were not protected from diabetes compared to wild-type NOD mice (control NOD vs P40-treated NOD: $p = 0.0103$; control CD1d^{-/-}NOD vs P40-treated

CD1d^{-/-}NOD: $p = 0.1515$). These data suggest that the p40 protective effect may depend on CD1d-restricted NKT cells.

DISCUSSION

Our results have revealed that the TLR2 agonist P40 derived from *Klebsiella pneumoniae* protects from diabetes onset in the NOD mouse, an observation in keeping with the most general protective effect of numerous bacteria viruses and parasites on spontaneous and autoimmune diseases [3-6]. Moreover, a previous report has demonstrated that a glycoprotein extracted from *Klebsiella pneumoniae* (GEKP) was efficiently protecting NOD mice from T1D [26]. Our results show that a strong protection can be induced with only 10 weeks of treatment (from the age of 4 to 14 weeks). Nevertheless, concerning the timing of the protective effect, it is important to note that there is no curative effect when the treatment is given just before the appearance of clinical diabetes while insulinitis becomes firmly established (data not shown). The effect was essentially a preventive one. Besides, we have observed that respectfully to other TLR agonists (unpublished data), P40 treatment strongly protected pancreatic islets. Indeed a large number of islets remain non-infiltrated at 25 weeks, age in which we detect more than 80% of insulinitis in non-treated NOD mice. One may assume that P40 could inhibit autoreactive T cell infiltration of islets.

The first mechanism which could explain the effect of P40 is the production of cytokines which is the most obvious biological consequence of TLR signalling, even if other effects are possible such as the expression of several molecules notably involved in antigen recognition with the difficulty in the latter case to exclude the indirect role of cytokines. We first looked at the immunoregulatory cytokines already known to inhibit spontaneous diabetes onset in NOD mice: IL-4, IL-10, and TGF- β [23,27-30]. We have effectively shown that the production of these cytokines was increased *in vitro* and *in vivo* by P40. In agreement, the molecule hsp60 derived from Mycobacteria has been demonstrated to activate suppressive function of Tregs both by cell-to-cell contact and by secretion of TGF- β and IL-10 in a TLR2-dependent way [31]. We could not conclude however for the responsibility of these cytokines in the P40-mediated diabetes protection since the problem is that suppression or neutralization of these cytokines did not abrogate the protective effect of P40. This latter observation is however not absolute since genetically deficient mice (as we used for IL-4) may show gene redundancy as illustrated

for mice genetically deficient in other cytokines such IFN- γ [32]. The same observation applies to neutralizing monoclonal antibodies against cytokines that have been administered, for logistic reasons, only from 13 to 16 weeks of age, and with this timing, protection was still complete. Nevertheless, one cannot exclude that the timing of administration used in our experiment was not appropriate to reveal an implication of these cytokines.

Concerning NKT cells, results obtained indicate clearly that their presence is mandatory for the protective effect of P40. Interestingly, similar observations were made for the TLR3 agonist poly(I:C) and a bacterial extract containing both TLR2 and TLR4 agonists (unpublished data and [21]). The mode of action of NKT cells is complex and the production of IL-4 is the first hypothesis which comes to cross one's mind. Indeed, P40 stimulates the production of IL-4, but IL-4-deficient mice are still sensitive to P40. We cannot therefore exclude other mechanisms such as the production of IFN- γ . Indeed, we have previously demonstrated *in vitro* that P40 increased the production of IFN- γ by CD56⁺CD3⁻ NK cells and CD56⁺CD3⁺ NKT cells [33]. It is critical to remember that the protective effect of CFA, which includes TLR2 and TLR4 agonists, was abolished in IFN- γ -deficient NOD mice and not in IL-10-deficient mice [34]. It is also worth noting that treatment with α -galactosylceramide protects NOD mice without the clear proof of a precise mechanism, in particular IL-4, because of contradictory results [35,36]. Finally, it is not clear whether NKT cells downregulate immune responses directly or indirectly after interaction with other populations of regulatory T cells including CD25⁺ natural regulatory cells [37]. To conclude, our results provide a possible although not exclusive explanation for the protective role of microbial infections on autoimmune diseases. They also open up the possibility of investigating TLR agonists as potential therapeutic tools for the prevention of autoimmune diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Herbelin for providing CD1d^{-/-} NOD mice and D. Mathis for providing IL-4^{-/-} NOD mice. The authors acknowledge D. Damotte for help in histological analyses. We are indebted to Christine Gouarin, Anne Esling and Corinne Cordier-Garcia for technical help. We also thank J.A. Bluestone and A. O'Garra for providing the monoclonal antibodies used in the study. This work was supported by grants from the Juvenile Diabetes Research Foundation, Fondation Day-Solvay and ALFEDIAM. Françoise Grela is a fellow of the Fondation pour la Recherche Médicale. Aude Aumeunier is a fellow of the Association Française des Diabétiques.

REFERENCES

1. Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299: 1259-1260
2. Bach JF (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347: 911-920
3. Wilberz S, Partke HJ, Dagnaes-Hansen F, Herberg L (1991) Persistent MHV (mouse hepatitis virus) infection reduces the incidence of diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 34: 2-5
4. Bras A, Aguas AP (1996) Diabetes-prone NOD mice are resistant to *Mycobacterium avium* and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* 89: 20-25
5. Cooke A, Tonks P, Jones FM et al (1999) Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* 21: 169-176
6. Zacccone P, Fehervari Z, Jones FM et al (2003) *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur.J.Immunol.* 33: 1439-1449
7. Sadelain MW, Qin HY, Lauzon J, Singh B (1990) Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes* 39: 583-589
8. Qin HY, Sadelain MW, Hitchon C, Lauzon J, Singh B (1993) Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 150: 2072-2080
9. Sadelain MW, Qin HY, Sumoski W, Parfrey N, Singh B, Rabinovitch A (1990) Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund's adjuvant. *J.Autoimmun.* 3: 671-680

10. Qin HY, Suarez WL, Parfrey N, Power RF, Rabinovitch A (1992) Mechanisms of complete Freund's adjuvant protection against diabetes in BB rats: induction of non-specific suppressor cells. *Autoimmunity* 12: 193-199
11. Harada M, Kishimoto Y, Makino S (1990) Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. *Diabetes Res.Clin.Pract.* 8: 85-89
12. Martins TC, Aguas AP (1999) Mechanisms of Mycobacterium avium-induced resistance against insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic (NOD) mice: role of Fas and Th1 cells. *Clin.Exp.Immunol.* 115: 248-254
13. Elias D, Reshef T, Birk OS, van der ZR, Walker MD, Cohen IR (1991) Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88: 3088-3091
14. Padovan E, Landmann RM, De Libero G (2007) How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends Immunol.* 28: 308-314
15. Jeannin P, Magistrelli G, Goetsch L et al (2002) Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine* 20 Suppl 4: A23-A27
16. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD et al (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 13766-13771
17. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF et al (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 13: 933-940
18. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T et al (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 169: 10-14
19. Takeuchi O, Akira S (2002) MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 270: 155-167

20. Feng CG, Scanga CA, Collazo-Custodio CM et al (2003) Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to *Mycobacterium avium* infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J.Immunol.* 171: 4758-4764
21. Alyanakian MA, Grela F, Aumeunier A et al (2006) Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *Diabetes* 55: 179-185
22. Quintana FJ, Carmi P, Cohen IR (2002) DNA vaccination with heat shock protein 60 inhibits cyclophosphamide-accelerated diabetes. *J.Immunol.* 169: 6030-6035
23. Nitta Y, Tashiro F, Tokui M et al (1998) Systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum.Gene Ther.* 9: 1701-1707
24. Piccirillo CA, Chang Y, Prud'homme GJ (1998) TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* 161: 3950-3956
25. Bendelac A, Savage PB, Teyton L (2007) The biology of NKT cells. *Annu.Rev.Immunol.* 25: 297-336
26. Sai P, Rivereau AS (1996) Prevention of diabetes in the nonobese diabetic mouse by oral immunological treatments. Comparative efficiency of human insulin and two bacterial antigens, lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and glycoprotein extract from *Klebsiella pneumoniae*. *Diabetes Metab* 22: 341-348
27. Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D et al (1993) Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* 178: 87-99
28. Yang Z, Chen M, Wu R et al (2002) Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J.Immunol.* 168: 6479-6485

29. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA (2003) CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 10878-10883
30. You S, Thieblemont N, Alyanakian MA, Bach JF, Chatenoud L (2006) Transforming growth factor-beta and T-cell-mediated immunoregulation in the control of autoimmune diabetes. *Immunol.Rev.* 212: 185-202
31. Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR (2006) Heat shock protein 60 enhances CD4+CD25+ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. *J.Clin.Invest.* 116: 2022-2032
32. Serreze DV, Post CM, Chapman HD, Johnson EA, Lu B, Rothman PB (2000) Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 49: 2007-2011
33. Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF et al (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* 104: 1778-1783
34. Serreze DV, Chapman HD, Post CM, Johnson EA, Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A (2001) Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J.Immunol.* 166: 1352-1359
35. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P et al (2001) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat.Med.* 7: 1057-1062
36. Hong S, Wilson MT, Serizawa I et al (2001) The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat.Med.* 7: 1052-1056

37. Ly D, Mi QS, Hussain S, Delovitch TL (2006) Protection from type 1 diabetes by invariant NK T cells requires the activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 177: 3695-3704

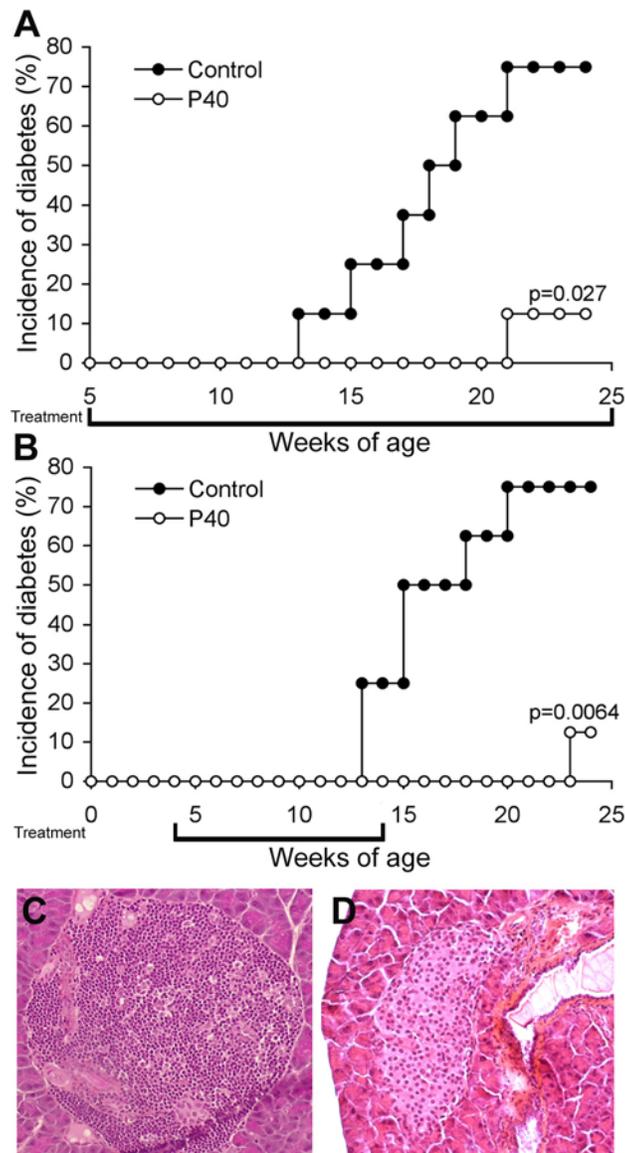


Figure 1. Stimulation of the TLR2 pathway modulates onset of spontaneous diabetes in female NOD mice by decreasing insulinitis in pancreas. Female NOD mice were injected intraperitoneally with 200 µg/week/mouse of P40 (n=8 per group) from 4 to 25 weeks of age (A) or from 4 to 14 weeks of age (B). Control mice were injected with Tris buffer. All mice were weekly monitored for diabetes. Degree of insulinitis was evaluated in pancreatic sections from Tris- (C) or P40-injected (D) mice. One representative experiment of at least two independent experiments is shown.

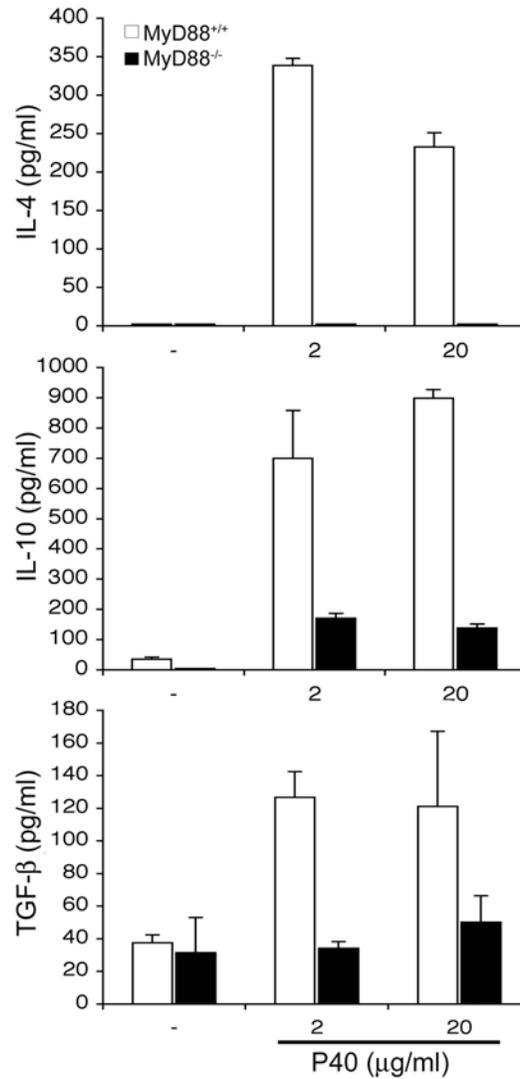


Figure 2. Stimulation with P40 induces IL-4, IL-10 and TGF-β production *in vitro*. Splenocytes from C57BL/6 MyD88^{+/+} or C57BL/6 MyD88^{-/-} mice were stimulated *in vitro* with P40 or medium alone. Supernatants were collected from parallel cultures and tested for IL-4, IL-10 and TGF-β. Results are shown as mean cytokine levels ± SD. Results are representative of at least three independent experiments.

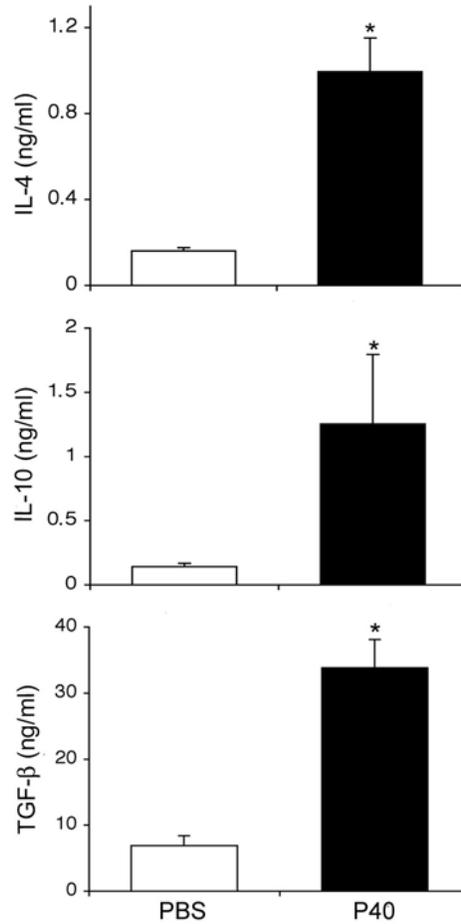


Figure 3. Stimulation with P40 induces IL-4, IL-10 and TGF- β production *in vivo*
Female NOD mice were injected intraperitoneally with 200 μ g P40 or buffer (n=8 per group). Sera were collected 2 or 6 h after stimulation and frozen. IL-4, IL-10 and TGF- β production was measured by ELISA.

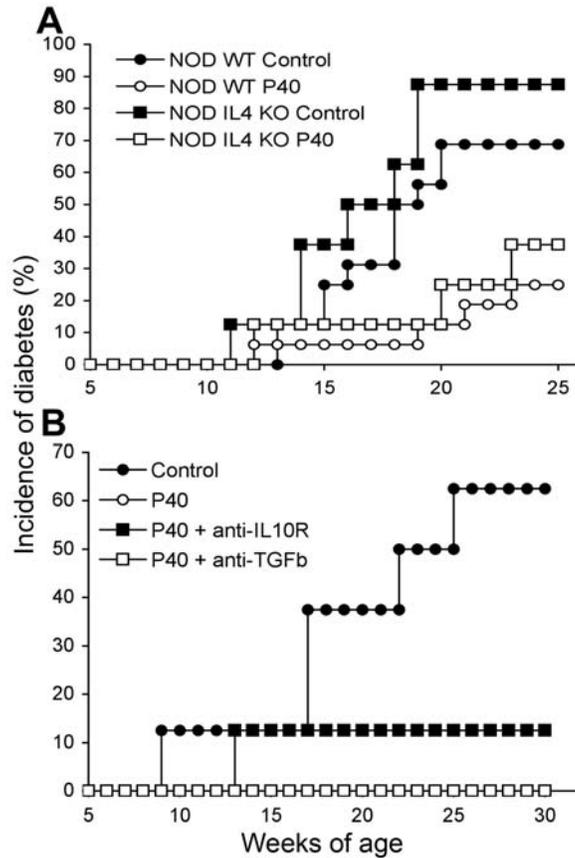


Figure 4. Protective responses induced by P40 are independent of IL-4, IL-10 and TGF- β . (A) Female IL-4^{-/-} and wild-type NOD mice were treated with P40 (200 μ g i.p./week). (B) Treatment with anti-IL-10R antibody (1 mg i.p. three times a week) or with a neutralizing anti-TGF- β antibody (1 mg i.p. three times a week) did not reverse protection induced by P40 (200 μ g/week i.p), (n = 8 per group).

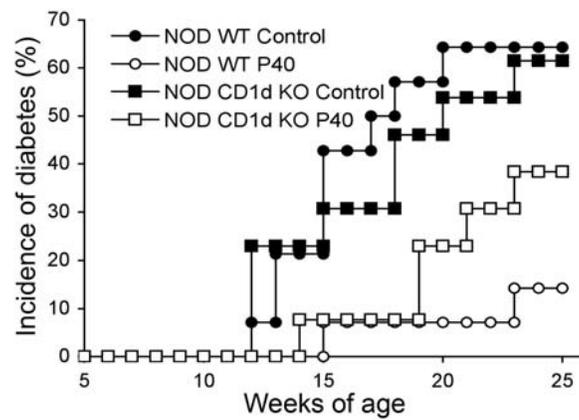


Figure 5. Involvement of NKT cells in the diabetes protection afforded by P40 treatment. Female CD1d^{-/-} or wild-type NOD mice were treated intraperitoneally with P40 (200 µg) or Tris buffer (n=8 per group). Results from two independent experiments are detailed.

Manuscrit n°4

The TLR3 agonist poly(I)poly(C) prevents autoimmune diabetes through activation of NKT cells and IL-4 production

Grela F, Aumeunier A, Bardel E, Ryffel B, Akira S, Bach JF, Thieblemont N. *Manuscrit soumis.*

A l'instar du travail précédent qui nous a permis de mettre en évidence un mécanisme protecteur induit par un traitement par des agonistes TLR, nous avons étudié l'effet d'un agoniste de TLR3 sur le développement du diabète.

Nous avons préalablement défini que le poly(I)poly(C) impliquait les voies TLR3/TRIF en stimulant des macrophages péritonéaux isolés à partir de souris de type sauvage ou déficientes pour TLR3 et TRIF. Etant donné que ce composé est un mélange de poly(I) et de poly(C), nous avons parallèlement testé ces deux molécules et avons pu observer qu'elles partageaient les mêmes voies mais étaient moins puissantes pour induire la production de cytokines.

Nous avons ensuite traité des souris NOD par ce composé et avons pu mettre en évidence une protection. Même s'il est constitué d'un mélange de deux ARNs^b, ces deux molécules injectées seules sont incapables de produire le même effet. C'est bien le mélange des deux qui confère la protection, suggérant les propriétés immunomodulatrices des structures ARN^d activant TLR3.

Dans un second temps, nous avons cherché à définir les mécanismes impliqués dans cette protection et avons observé que des souris CD1d^{-/-} dépourvues de NKT et traitées par cet agoniste de TLR3 n'étaient plus protégées du diabète. Par l'utilisation de souris déficientes pour l'IL-4, nous avons pu montrer que cette cytokine jouait un rôle dans la protection observée. Etant donné que les NKT produisent de grandes quantités d'IL-4, ces résultats suggèrent fortement que cet agoniste exerce ses effets protecteurs au travers des NKT produisant l'IL-4.

Ainsi, ce travail permet de démontrer que le traitement par des molécules purifiées de pathogènes agonistes des TLR protège du diabète de type 1 et met en jeu, dans ce cas précis, la population régulatrice NKT au travers de sa production d'IL-4.

The TLR3 agonist poly(I)poly(C) prevents autoimmune diabetes through activation of Natural Killer T cells and IL-4 production¹

By Françoise Grela¹, Aude Aumeunier¹, Emilie Bardel¹, Bernhard Ryffel², Jean-François Bach³, Nathalie Thieblemont¹

¹CNRS UMR 8147, Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital, Paris, France

²CNRS UMR 6218, 3B rue de la Ferrollerie, 45071 Orléans Cedex 2, France

³INSERM U580, Paris Descartes University, Faculty of Medecine, Necker Hospital, Paris, France

Running title

TLR3 stimulation prevents the onset of diabetes

Corresponding author: Nathalie Thieblemont, Ph.D, CNRS UMR 8147, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres Paris 75015 France, Tel : +33.1.44.49.53.88, Fax : +33.1.44.49.06.76.
Email: nathmont@necker.fr.

Keywords

Toll-like receptor 3; autoimmune diabetes; NKT cells; immunoregulatory cytokines

Abbreviations

NOD, non-obese diabetic; poly(I)poly(C), polyinosinic-polycytidylic acid; TLR, Toll-like receptor

Manuscript information: 20 pages, 4 Figures

Word Count: Abstract 170 words, Main Text 2,042 words.

ABSTRACT

OBJECTIVE: Epidemiological studies suggest that infections can prevent immune disorders, such as autoimmune diseases. We postulated that pathogen-sensors Toll-like receptor (TLR) could modulate the development of autoimmune diabetes.

RESEARCH DESIGN AND METHODS: We have investigated the impact of a treatment with the polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I)poly(C)) on the development of non-obese diabetic (NOD) mice diabetes and explored potential mechanisms implicated in the observed effect.

RESULTS: Here, we show that poly(I)poly(C), which signals through TLR3 and TRIF, prevents spontaneous diabetes onset in the NOD mice model. Since Natural Killer T (NKT) cells have been shown to be critically involved in type 1 diabetes (T1D) *via* IL-4 production in NOD mice, we have tested whether this mechanism was involved in our settings. Indeed, the protective autoimmune response induced by the TLR3 agonist was lost in IL-4- and CD1d-deficient mice.

CONCLUSIONS: Our results reveal that pathogen-induced TLR3 triggering contributes to diabetes protection *via* stimulation of NKT cells and IL-4 production and underlines the fact that viral infections can also be protective in autoimmune diseases.

Microorganisms, such as bacteria, fungi, protozoa, and viruses, are detected by Toll-like receptors (TLRs) and trigger innate immune responses. A subset of TLRs recognizes viral components and induces antiviral responses. Whereas TLR4 recognizes viral components at the cell surface, TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 recognize viral nucleic acids on endosomal membrane. TLR3 recognizes viral double-stranded RNAs (dsRNAs) derived from dsRNA viruses such as reovirus or parasitic dsRNA such as *Schistosoma mansoni* or simple-stranded RNA (ssRNAs) viruses such as West Nile virus, respiratory syncytial virus, and encephalomyocarditis virus (1;2). The TLR3-signaling pathway involves the adaptor molecule, Toll/IL-1 receptor (TIR)-domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) and activates type I interferon (IFN) and proinflammatory cytokine expression (3;4). TRIF was established as the adaptor controlling both TLR3- and TLR4-mediated IFN production, through the activation of IRF3 (5). It is to note that a synthetic analog of dsRNA, polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)), which activates the TLR3-TRIF signaling pathway, has been described and similarly to TLR3 agonist, activates immune cells and induces type I interferons (IFN- α/β) (6;7).

Microbial signaling can inhibit autoimmune diseases (8). Bacteria, parasites and viruses were efficiently protecting NOD mice from diabetes (9-11). The mechanisms of the protective effect of infections on type 1 diabetes induced by microbial components are difficult to interpret because there is no indication of the nature of the molecules responsible for the protection. It was thus of particular interest to use chemically defined components that would putatively mediate protection. We chose NOD mice that spontaneously develop an autoimmune insulin-dependent diabetes closely resembling the human disease, as a study model. TLR agonists such as hsp60 and CpG oligonucleotides may protect NOD mice from spontaneous diabetes (12;13). The protective effects of poly(I:C) in relation to diabetes have been previously investigated in the NOD mice (14). However, there is still no clear indication of a defined mechanism involved in this protection. We have recently observed that TLR stimulation plays a critical role in the biological effects of pathogens, not only in their capacity to cause disease through stimulation of proinflammatory cytokines, but also in their potential to promote disease

protection through production of immunoregulatory cytokines and NKT cell activation (15). We have thus explored whether these immunoregulatory mechanisms may be involved in the TLR3-induced protective responses of T1D.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Wild-type C57BL/6 and female mice of the NOD (K^d, I-A^{g7}, D^b) strain were maintained in our animal facilities under specific pathogen-free conditions. TLR3-, TRIF-, CD1d- and IL-4-deficient mice (C57BL/6 or NOD background) have been described previously (15). All mice were bred in our animal facility, in agreement with current European legislation on animal care, housing and scientific experimentation as assessed by inspectors of the Veterinary Services of Paris and the French Research Ministry.

Reagents. Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I)poly(C)), polyinosinic acid (poly(I)) and polycytidylic acid (Poly(C)) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* was purchased from Alexis Biochemicals (Paris, France).

Macrophage recovery and stimulation. Macrophages from wild-type C57BL/6 mice were recruited by thioglycolate injection. Cells were recovered by peritoneal lavage and cultured in RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) in the presence of TLR agonists. Cultures were incubated for 24 hours at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Supernatants were then collected and stored at -20°C until tested for TNF-α.

ELISA assays for cytokine production. DuoSet kit for TNF-α (R&D Systems, Lille, France) was used. The concentrations of cytokine are shown as the mean nanograms or picograms per milliliter derived from calibration curves using recombinant cytokines as standards.

Monitoring for development of diabetes. Mice were monitored weekly for clinical signs of diabetes using Gluko-Test reagent sticks, detecting the presence of glucose in the urine (Boehringer Mannheim, Germany). On some occasions, blood glucose levels were determined using Haemo-Glukotest 1-44R reagent sticks and a Reflolux S glucometer (Boehringer Mannheim, Germany). Mice were considered diabetic when urine glucose

levels exceeded 55 mmol/l or when plasma glucose levels exceeded 11 mmol/L on 3 different days within 1 wk.

Histological analysis. Pancreas from NOD mice were fixed in 4% formaldehyde, paraffin-embedded, and stained with hematoxylin and eosin. Pancreatic sections were microscopically examined for the presence of insulinitis.

Statistical analysis. Diabetes incidence was plotted using the Kaplan-Meier method, i.e. a non-parametric cumulative survival plot. Statistical comparison between curves was performed using the logrank (Mantel-Cox) test that provided the corresponding χ^2 values. Mean values were compared using the Mann-Whitney's *t* test.

RESULTS

Poly(I)poly(C) signals through TLR3 and the adaptor molecule TRIF. We have tested the ability of the poly(I)poly(C) to activate immune cells using TLR3 signaling pathway. Using thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from C57Bl/6 mice, we observed a strong TNF- α production after stimulation by this compound. The biological response was twice as high as the response induced with the described TLR3 agonist poly(I) or poly(C) and as high as the response induced by LPS, a strong inducer of inflammation on macrophages (Fig. 1). To verify whether poly(I)poly(C) signaling was specific of the adaptor molecule TRIF, we have compared the response observed using cells from WT or TRIF^{-/-} mice. As expected the cytokine production induced by the TLR3 agonist was lost in cells purified from TRIF^{-/-} mice and partially decreased after LPS stimulation.

Poly(I)poly(C) treatment prevents onset of spontaneous diabetes in female NOD mice. To determine whether stimulation of TLR3 signaling pathway prevents diabetes onset, NOD mice were treated with poly(I)poly(C). Cohorts of 3- to 4-week-old female NOD mice were intraperitoneally treated with this agonist. Results show that the treatment significantly delayed diabetes onset (Fig. 2A). More than 80% of poly(I)poly(C)-treated mice remained normoglycemic for 30 weeks, whereas in control mice diabetes started at 11 weeks of age. This result is in agreement with previous reports using a distinct TLR3 agonist (14). It is to note that the treatment required continuous stimulation to be efficient. Decreased length of the treatment with poly(I)poly(C) from 20 weeks to 10 weeks was no longer efficient to protect NOD mice from diabetes (data not shown). As poly(I)poly(C) is a mix of the two ssRNA poly(I) and poly(C), we next treated mice with each component and showed that either poly(I) or poly(C) failed to induce protection (Fig. 2A) suggesting that dsRNA are more efficient in delaying diabetes onset.

Even if mice were protected by poly(I)poly(C) administration, histological analysis of the pancreas (Fig. 2C) revealed a strong percentage of insulinitis (56.13%). Nevertheless, this group exhibited a decrease in insulinitis proportion as compared to non-treated groups (Fig. 2B, 78.34%) correlated to an increase of peri-insulinitis (20.81%). And although islets were

highly infiltrated, their number and their size were greater than non-protected mice which had atrophic islets. Besides, poly(I)- and poly(C)-treated mice (Fig. 2D,E) developed a similar insulinitis as non-treated control (85.86% and 86.11% respectively).

Role of CD1d-restricted T cells in poly(I)poly(C)-mediated protection. As NKT cells have been demonstrated to be implicated in diabetes onset (16-18) and since we previously described that the protection induced by a bacterial extract was dependent on these cells (15), we treated CD1d^{-/-} NOD mice, which are devoid of NKT cells, with poly(I)poly(C). As shown in Fig. 3, diabetes incidence was similar in CD1d^{-/-} and wild-type NOD mice. Interestingly, by contrast to poly(I)poly(C)-treated wild-type NOD mice, it appears that poly(I)poly(C)-treated CD1d^{-/-} NOD mice were no longer protected from diabetes. These data suggest that the poly(I)poly(C) protective effect may depend on CD1d-restricted NKT cells (control NOD vs poly(I)poly(C)-treated NOD: $p = 0.0042$; poly(I)poly(C)-treated NOD vs poly(I)poly(C)-treated CD1d^{-/-} NOD, $p = 0.2332$).

IL-4 is required in poly(I)poly(C)-mediated protection. It has been shown that stimulation of NKT by α -galactosylceramide was protective in diabetes through an IL-4-dependent production (16). To analyze the possible role of IL-4 in the poly(I)poly(C)-mediated protection of diabetes, we have compared the effect of the TLR3 agonist administered intraperitoneally in IL-4^{-/-} and wild-type NOD mice. Results shown in Fig. 4 clearly indicate that the protective effect of poly(I)poly(C) was abrogated in IL-4^{-/-} NOD mice (control NOD vs poly(I)poly(C)-treated NOD: $p = 0.0422$; poly(I)poly(C)-treated NOD vs poly(I)poly(C)-treated IL-4^{-/-} NOD, $p = 0.0678$) (Fig. 4), thus suggesting that poly(I)poly(C)-mediated protection is an IL-4-dependent active phenomenon. Collectively, these data show that protection induced by the TLR3 agonist poly(I)poly(C) requires NKT cell stimulation and production of IL-4.

From our results, the ability of compound to stimulate NKT cells was further investigated. Activation of iNKT cells was evaluated after poly(I)poly(C) *i.p.* injection to mice; sera were collected 2 h later and cytokine level was quantified in samples by ELISA. In these settings, IL-4 level is upregulated by injection of the CD1d ligand α Gal-

Cer. However, poly(I)poly(C) treatment failed to modulate IL-4 level *in vivo* (data not shown).

DISCUSSION

Our data present evidence that the TLR3 agonist, which is known to promote a dominant Th1 environment, can prevent autoimmune diabetes *in vivo*. In agreement, the protective effects of the TLR3 agonist in relation to diabetes have been previously investigated in the BB rat and NOD mice. In some experimental models, poly(I:C) was inefficient or even accelerated diabetes onset as might have been expected from its capacity to stimulate Th1 cells. It has been demonstrated in two antigen-driven models (LCMV or insulin B9-23 peptide) that Poly(I:C) induced disease acceleration (19). However, our model is quite different, as a spontaneous one, whereas previous were induced. In this work, we have defined poly(I)poly(C) as a TLR3 agonist through activation of TRIF in agreement with a recent report that has described that single-stranded homopolymeric poly(I) activates immune cells *via* TLR3 and TRIF (7). We can postulate that the protection induced by this agonist could depend on TLR3 and TRIF. Interestingly, whereas poly(I)poly(C) induced a strong protection, ssRNAs poly(I) and poly(C) failed to protect mice from diabetes. One may assume that the double-stranded structure of poly(I)poly(C) could confer to this molecule the ability to activate some signals leading to the establishment of protective mechanisms.

In this manuscript, we show evidence of diabetes protection with direct demonstration of the CD1d dependency of the TLR3 agonist used *in vivo*. A possible protective mechanism for this latter agonist could be the activation of iNKT cells, which have been shown to be implicated in T1D protection (16-18;20). Moreover, we previously described that iNKT cells were implicated in the protection induced by a bacterial extract (15). This targeting is not surprising as some recent works have demonstrated that this cell subset can sense TLR signals. Indeed, both CpG DNA and LPS, that respectively activate TLR9 and 4, have been shown to activate NKT cells in the presence of dendritic cells and proinflammatory cytokines such as IL-12 (21-23). Meanwhile, the response to these agonists requires CD1d molecule. We next show that diabetes protection depends of the T-helper type 2 cytokine IL-4 since IL-4-deficient NOD mice abrogated the protective effect of TLR3 agonist. This interpretation is reminiscent of the control of diabetes progression in NOD mice brought about by IL-4

production after NKT stimulation (16-18;20). We can postulate that IL-4 produced by TLR3-activated NKT cells could play a role in the protection. In agreement with our results, it has been shown that the parasite *Schistosoma mansoni*, which contains TLR3 agonists (1), on one hand, inhibits the development of type 1 diabetes in NOD mice (10), and on the other hand, activates iNKT cells to produce IFN- γ and IL-4 (24).

To conclude, our data show evidence that TLR3 stimulation may protect from Th1-mediated autoimmune diseases and that this protection is mediated by IL-4 production and requires NKT cell activation. These results provide an explanation for the protective role of infections on the development of autoimmune diseases. They also open up the possibility of investigating TLR agonists as potential therapeutic tools for the prevention of autoimmune diseases.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Herbelin for providing CD1d^{-/-} NOD mice and D. Mathis for providing IL-4^{-/-} NOD mice. The authors acknowledge D. Damotte for help in histological analyses. Françoise Grela is a fellow of the Fondation pour la Recherche Médicale. Aude Aumeunier is a fellow of the Association Française des Diabétiques. The authors thank Mireille Dardenne and Elke Schneider for critical reading. This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation, by ALFEDIAM and by the Day-Solvay Foundation.

REFERENCES

1. Aksoy,E, Zouain,CS, Vanhoutte,F, Fontaine,J, Pavelka,N, Thieblemont,N, Willems,F, Ricciardi-Castagnoli,P, Goldman,M, Capron,M, Ryffel,B, Trottein,F: Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J.Biol.Chem.* 280:277-283, 2005
2. Akira,S, Uematsu,S, Takeuchi,O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801, 2006
3. Yamamoto,M, Sato,S, Hemmi,H, Hoshino,K, Kaisho,T, Sanjo,H, Takeuchi,O, Sugiyama,M, Okabe,M, Takeda,K, Akira,S: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-643, 2003
4. Hoebe,K, Du,X, Georgel,P, Janssen,E, Tabeta,K, Kim,SO, Goode,J, Lin,P, Mann,N, Mudd,S, Crozat,K, Sovath,S, Han,J, Beutler,B: Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424:743-748, 2003
5. O'Neill,LA, Bowie,AG: The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 7:353-364, 2007
6. Alexopoulou,L, Holt,AC, Medzhitov,R, Flavell,RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738, 2001
7. Marshall-Clarke,S, Downes,JE, Haga,IR, Bowie,AG, Borrow,P, Pennock,JL, Grecnis,RK, Rothwell,P: Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J.Biol.Chem.* 282:24759-24766, 2007

8. Bach,JF: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* 347:911-920, 2002
9. Bras,A, Aguas,AP: Diabetes-prone NOD mice are resistant to *Mycobacterium avium* and the infection prevents autoimmune disease. *Immunology* 89:20-25, 1996
10. Cooke,A, Tonks,P, Jones,FM, O'Shea,H, Hutchings,P, Fulford,AJ, Dunne,DW: Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* 21:169-176, 1999
11. Oldstone,MB: Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239:500-502, 1988
12. Quintana,FJ, Rotem,A, Carmi,P, Cohen,IR: Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J.Immunol.* 165:6148-6155, 2000
13. Serreze,DV, Hamaguchi,K, Leiter,EH: Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J.Autoimmun.* 2:759-776, 1989
14. Sobel,DO, Goyal,D, Ahvazi,B, Yoon,JW, Chung,YH, Bagg,A, Harlan,DM: Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. *J.Autoimmun.* 11:343-352, 1998
15. Alyanakian,MA, Grela,F, Aumeunier,A, Chiavaroli,C, Gouarin,C, Bardel,E, Normier,G, Chatenoud,L, Thieblemont,N, Bach,JF: Transforming growth factor-beta and natural killer T-cells are involved in the protective effect of a bacterial extract on type 1 diabetes. *Diabetes* 55:179-185, 2006

16. Sharif,S, Arreaza,GA, Zucker,P, Mi,QS, Sondhi,J, Naidenko,OV, Kronenberg,M, Koezuka,Y, Delovitch,TL, Gombert,JM, Leite-De-Moraes,M, Gouarin,C, Zhu,R, Hameg,A, Nakayama,T, Taniguchi,M, Lepault,F, Lehuen,A, Bach,JF, Herbelin,A: Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat.Med.* 7:1057-1062, 2001

17. Hong,S, Wilson,MT, Serizawa,I, Wu,L, Singh,N, Naidenko,OV, Miura,T, Haba,T, Scherer,DC, Wei,J, Kronenberg,M, Koezuka,Y, Van Kaer,L: The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat.Med.* 7:1052-1056, 2001

18. Wang,B, Geng,YB, Wang,CR: CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J.Exp.Med.* 194:313-320, 2001

19. van der,WN, Kroese,FG, Rozing,J, Hillebrands,JL: Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res.Rev.* 23:169-183, 2007

20. Baxter,AG, Kinder,SJ, Hammond,KJ, Scollay,R, Godfrey,DI: Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46:572-582, 1997

21. Montoya,CJ, Jie,HB, Al Harthi,L, Mulder,C, Patino,PJ, Rugeles,MT, Krieg,AM, Landay,AL, Wilson,SB: Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J.Immunol.* 177:1028-1039, 2006

22. Paget,C, Mallevaey,T, Speak,AO, Torres,D, Fontaine,J, Sheehan,KC, Capron,M, Ryffel,B, Faveeuw,C, Leite,dM, Platt,F, Trottein,F: Activation of Invariant NKT

- Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity*. 27:597-609, 2007
23. Nagarajan,NA, Kronenberg,M: Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J.Immunol*. 178:2706-2713, 2007
24. Mallevaey,T, Zanetta,JP, Faveeuw,C, Fontaine,J, Maes,E, Platt,F, Capron,M, de Moraes,ML, Trottein,F: Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni. *J.Immunol*. 176:2476-2485, 2006

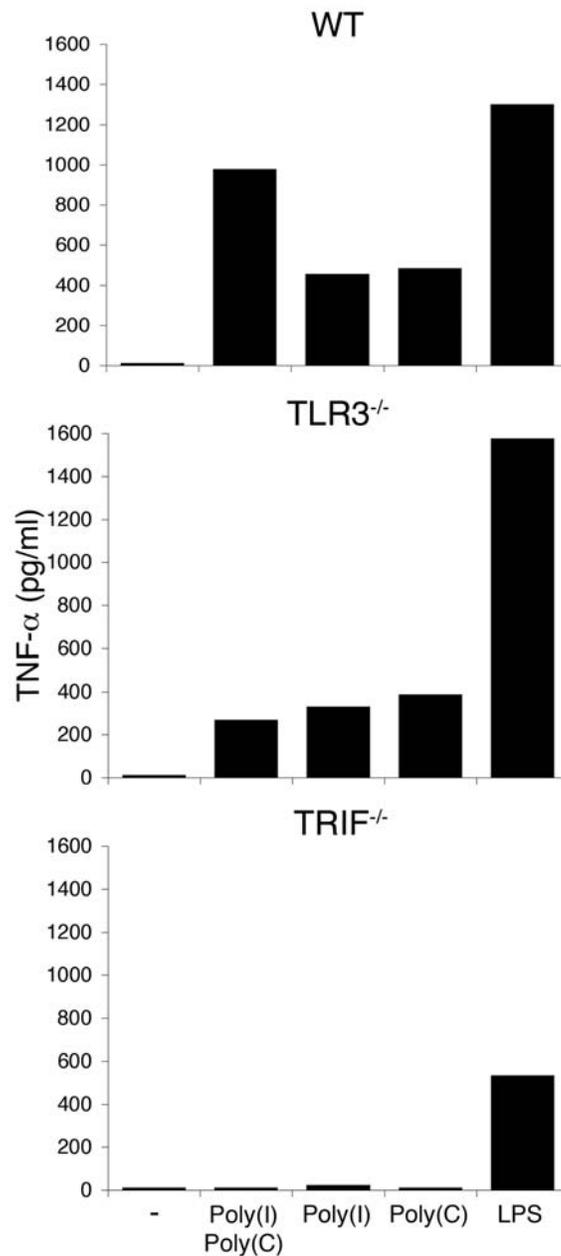


Figure 1 : Poly(I)poly(C) induces TNF- α production in TLR3- and TRIF-dependent way. Thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from WT, TLR3^{-/-} or TRIF^{-/-} C57BL/6 mice were stimulated with 10 μ g/ml poly(I)poly(C), poly(I) or poly(C) or 1ng/ml LPS. TNF- α production was measured in supernatants after 24h of stimulation by ELISA. Results are representative of one experiment out of three.

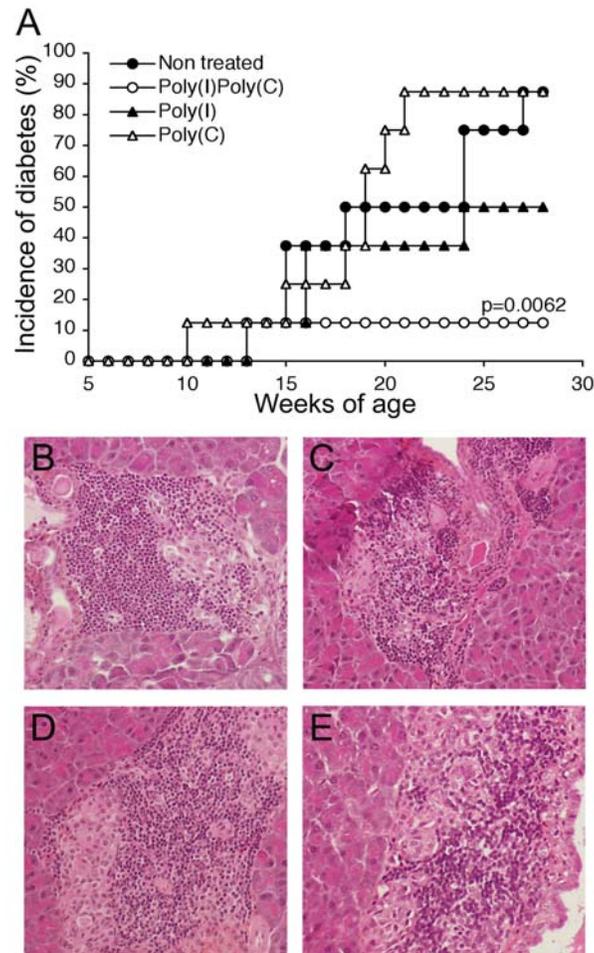


Figure 2 : Treatment with TLR3 agonist poly(I)poly(C) prevents diabetes onset but does not preserve pancreas. (A) Female NOD mice were injected intraperitoneally with 100 µg/week/mouse of poly(I)poly(C), poly(I) or poly(C). Control mice were injected with PBS. All mice were weekly monitored for diabetes. Pancreatic sections from mice treated with PBS (B), poly(I)poly(C) (C), poly(I) (D) or poly(C) (E) were microscopically examined and islets inflammation was evaluated as percentage of non-infiltrated islets, peri-insulitis and insulitis. One representative experiment of at least two independent experiments is shown.

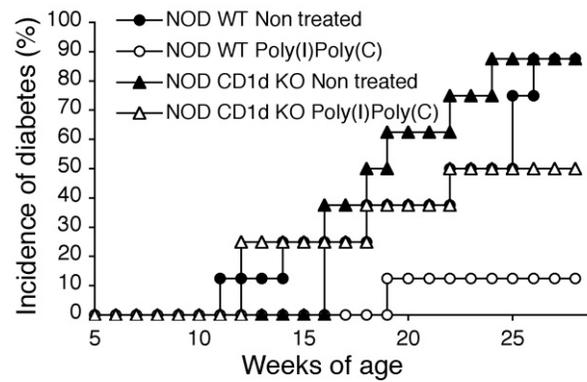


Figure 3 : Poly(I)poly(C)-induced diabetes protection is dependent on CD1d-restricted NKT cells. WT and CD1d^{-/-} female NOD mice were injected intraperitoneally with 100 µg/week/mouse of poly(I)poly(C) or PBS. All mice were weekly monitored for diabetes. One representative experiment of at least two independent experiments is shown.

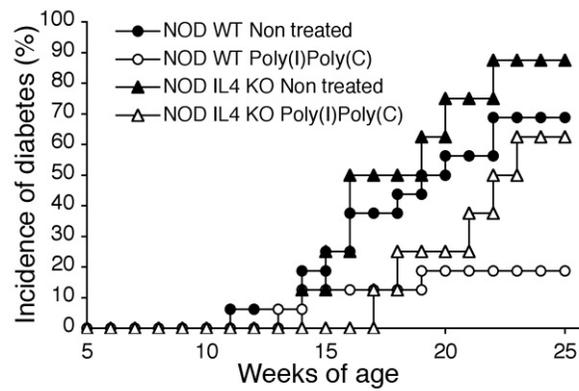


Figure 4 : TLR3 stimulation delayed diabetes onset in an IL-4-dependent way. WT and IL-4^{-/-} female NOD mice were treated with poly(I)poly(C) or PBS and weekly monitored for diabetes. One representative experiment of at least two independent experiments is shown.

RESULTATS PARTIE II :

**Effet de la modulation d'une
stimulation TLR7 dans l'asthme allergique**

Manuscrit n°5

Toll-like receptor 7 stimulation activates directly Natural Killer T cells

Grela F, Bardel E, Aumeunier A, Dy M, Herbelin A, Thieblemont N. *Manuscrit soumis*.

Au cours de nos travaux sur la modulation du diabète par les TLR, nous démontré que les agonistes TLR pouvaient cibler des cellules régulatrices. Au fil de ces travaux, nous avons observé que certains d'entre eux, notamment d'origine virale, étaient plus propices à cibler la population de lymphocytes NKT. C'est ainsi que nous avons eu l'idée pour l'agoniste TLR7 R848, un composé anti-viral, de rechercher s'il n'était pas capable d'activer ces cellules.

Ainsi, des études *in vivo* ont confirmé que les cellules NKT peuvent être ciblées par TLR7 puisqu'un traitement de 2 heures avec du R848 induit une production significative d'IFN- γ qui est perdue lorsque les souris sont déficientes pour la population des NKT. Nous avons également pu montrer que le R848 active directement ces cellules comme l'atteste l'augmentation de l'expression du marqueur d'activation CD69.

A la vue de ces résultats, nous avons cherché à comprendre leur relevance physiologique et avons étudié ce ciblage dans un modèle où TLR7 et NKT sont impliqués, à savoir l'asthme allergique. En effet, les lymphocytes NKT sont connus pour y jouer un rôle effecteur mais qui peut se révéler protecteur lorsqu'ils sont activés. Par ailleurs, le R848 a déjà été montré comme protecteur dans cette pathologie. Nous avons ainsi mis au point un modèle de transfert adoptif pour vérifier cette question et avons alors pu observer que le transfert de cellules NKT triées prétraitées par du R848 chez des receveurs immunisés inhibait l'asthme allergique, et lorsque les lymphocytes NKT provenaient de souris déficientes pour l'IFN- γ , cet effet était perdu. Ces résultats nous ont donc permis de démontrer que l'IFN- γ produit par les NKT était responsable de la protection induite par le R848.

Nous avons alors voulu comprendre comment les cellules NKT étaient activées par TLR7 et avons déterminé que le R848 était le seul agoniste à induire une réponse directe des NKT en termes de production d'IFN- γ , et ce, en absence de cellules présentatrices d'antigène. Ces lymphocytes peuvent donc se comporter comme des cellules innées répondant directement à une stimulation de TLR7 quand ils sont placés dans un environnement cytokinique approprié et notamment en présence d'IL-12. Nous avons pu par la suite définir que cette réponse n'engageait pas leur TCR mais nécessitait la présence de TLR7 sur les

cellules NKT et que la co-incubation avec des cellules dendritiques permettait d'augmenter la réponse. Néanmoins, ces dernières ne sont pas requises dans le système, puisque les lymphocytes NKT expriment la protéine TLR7 les rendant sensibles au R848.

Ce travail nous a donc permis de démontrer que les lymphocytes NKT peuvent participer à l'immunité innée reconnaissant directement des composés viraux par l'intermédiaire des TLR. Ces résultats apportent quelques explications quant à l'implication de ces cellules dans les infections virales.

Toll-like receptor 7 stimulation activates directly Natural Killer T cells

By Françoise Grela¹, Emilie Bardel¹, Aude Aumeunier¹, Michel Dy¹, André Herbelin¹, Nathalie Thieblemont^{1,*}

¹CNRS UMR-8147 and Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, Paris, France

* Address correspondence and reprint requests to Dr. Nathalie Thieblemont, UMR-CNRS-8147, Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Hôpital Necker-Enfants Malades, 161 rue de Sèvres 75015 Paris, France. Tel: +33 1 44 49 53 88; Fax: +33 1 44 49 06 76; Email address: nathmont@necker.fr.

Running title: TLR7-activated iNKT cells promote asthma protection

Keywords: Toll-like receptor 7; iNKT cells; IFN- γ ; IL-12; asthma

Abbreviations used in paper: R848, resiquimod; TLR, Toll-like receptor; iNKT cells, invariant Natural Killer T cells; AHR, Airway Hyperreactivity; BALF, Bronchoalveolar Lavage Fluid; Penh, Enhanced Pause.

SUMMARY

We show here that viral triggering of invariant Natural Killer T (iNKT) cells using the TLR7 agonist R848 induces secretion of IFN- γ *in vivo*. Since both infectious agents and iNKT cells are implicated in asthma protection, we further demonstrate that the IFN- γ response released by R848-activated iNKT cells is sufficient to mediate experimental asthma protection. Mechanistically, we provide evidence that iNKT cells, which express TLR7, can directly respond to R848 *in vitro*, without TCR engagement, by producing high levels of IFN- γ . This work provides the demonstration of a new mechanism of activation of iNKT cells in response to a TLR agonist.

INTRODUCTION

Epidemiological studies show in industrialized countries a reduction in the incidence of infectious disease and an increase in the incidence of allergic diseases such as asthma (Bach, 2002). According to some studies, exposure to infectious agents appears to protect against the development of asthma (Wills-Karp et al., 2001; Erb et al., 1998). Infections and more precisely pathogen-derived molecular patterns (PAMPs) are detected by Toll-like receptors (TLR) which signaling initiates and orientates immune response. Among these, TLR7 acts as a sensor of simple-stranded RNAs and imidazoquinolins family compounds such as R848, also called resiquimod (Jurk et al., 2002; Heil et al., 2004). This latter molecule has already been shown to protect C57BL/6 and BALB/c mice from asthma, by decreasing AHR, inhibiting cell recruitment, especially eosinophils, in lungs and abrogating Th2 responses (Quarcoo et al., 2004; Moisan et al., 2006).

Protective mechanisms in asthma have been investigated in several murine models and Th2-type effector responses have been shown to be modulated by CD4⁺ CD25⁺ T regulatory (Treg) cells, regulatory Th1 cells or invariant Natural Killer T (iNKT) cells (Umetsu and DeKruyff, 2006; Akbari et al., 2003; Lisbonne et al., 2003; Araujo et al., 2004). iNKT cells have been demonstrated to play a key role in the development of asthma. These cells are a distinct subset of lymphocytes with NK markers and an invariant V α 14-J α 18 TCR chain, that regulate immune responses in several models of autoimmunity, infection and cancer (Bendelac et al., 2007). They are selected and restricted by the nonpolymorphic MHC class I-like molecules, CD1d. They can be stimulated by an exogenous glycolipid, α -galactosylceramide (α -GalCer) presented in the context of CD1d molecules and promptly induce the production of high levels of IL-4 and IFN- γ (Mendiratta et al., 1997). iNKT cells can act as effectors in asthma by participating in the development of airway eosinophilia, hyperresponsiveness, Th2 cytokine production, and elevated levels of IgE antibodies (Lisbonne et al., 2003). But a treatment with their specific activator α -GalCer activates them to confer protection as an other study has shown the abolishment of airway eosinophilia and AHR by a single injection of α -GalCer (Morishima et al., 2005; Matsuda et al., 2005; Hachem et al., 2005) and could be a target to prevent asthma. We have then investigated if the protective effect by R848 treatment could be explained by the stimulation of iNKT cells.

Our results have revealed that IFN- γ -producer iNKT cells account for the R848-induced protection. *In vivo* analyses have demonstrated that R848 activates this subset, as shown by the increase of cell surface expression of CD69 and their IFN- γ production. Further

in vitro experiments have then assessed that iNKT cells can be directly stimulated by a TLR7 agonist without TCR engagement and in the absence of other cellular partners. These results provide the first demonstration of iNKT cell direct targeting by a TLR agonist.

RESULTS

R848 treatment activates iNKT cells to produce IFN- γ

We first investigated whether iNKT cells are stimulated following a treatment with R848 *in vivo*. Activation of iNKT cells was evaluated after R848 *i.p.* injection to C57BL/6 mice; sera were collected 2 h later and cytokine level was quantified in samples by ELISA. A strong upregulation of IFN- γ production was detected in R848-treated mice as compared to PBS-administered mice (Figure 1A). It is to note that we also detected an increase in IL-4 production in this assay (data not shown). Both responses were iNKT-dependent since $J\alpha 18^{-/-}$ mice, which lack iNKT cells, failed to respond to the TLR7 agonist. To evaluate the phenotype of iNKT cells after TLR7 stimulation, splenocytes from R848- or PBS-injected mice were stained with both fluorescently labeled CD1d/ α -GalCer-tetramer and $\alpha\beta$ -TCR. No difference was observed in the proportion of double positive cells between the two groups in spleen. However, a strong upregulation of the mean fluorescence intensity (MFI) of the early activation marker CD69 was observed in cells from R848-treated mice as compared to control mice (Figure 1B). Taken together, our results validate the targeting of iNKT cells by TLR7 stimulation to produce rapidly IFN- γ . We then hypothesized that iNKT cell triggering by TLR7 could explain the protective effect of R848 in asthma.

R848-induced asthma protection can be transferred to immunized recipient mice

We firstly confirmed the ability of R848 to protect against asthma onset using a slightly modified asthma protocol as compared to previous works (Quarcoo et al., 2004; Moisan et al., 2006) (Figure 2). Indeed, R848 treatment inhibited airway hyperreactivity (AHR) development, total cell and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) and Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 (Figure 2A and data not shown). We then devised an adoptive transfer model for evaluating the potential role of iNKT cells. In our protocol, recipient mice were immunized with OVA and transferred with splenocytes from R848-treated non-immunized donor mice 1 h prior the first challenge. Mice transferred with splenocytes from R848-treated mice (OVA-WT R848) exhibited a significant decrease in AHR, total cell and eosinophil recruitment as compared to mice injected with splenocytes from PBS-treated mice (OVA-WT) (Figure 2B) validating the experimental approach.

IFN- γ from iNKT cells is responsible of R848-induced asthma protection

Taking advantage of the ability of splenocytes to transfer protection, we next evaluated the implication of iNKT cells in R848-induced asthma protection. As shown in Figure 3, mice transferred with iNKT cells from R848-treated donors (OVA-NKT R848) failed to develop an AHR and to recruit cells in BALFs as compared to control mice injected with naive iNKT cells (OVA-NKT). These results confirm the critical implication of these lymphocytes in R848-induced asthma protection. Since R848 induces large amounts of IFN- γ (Figure 3A), we then tested the dependence of the production of this cytokine by iNKT cells. We thus observed that the protective responses against asthma observed in the OVA-NKT R848 group were lost in the group of mice transferred with sorted iNKT cells from IFN- γ ^{-/-} mice pretreated with R848 (OVA-NKT IFN- γ ^{-/-} R848). These results demonstrate that R848-activated iNKT cells promote asthma protection through their IFN- γ production.

iNKT cells directly respond to TLR7 stimulation

In order to study the cellular and molecular mechanisms of the iNKT cell activation following TLR7 triggering, we next performed *in vitro* experiments. Sorted CD5⁺NK1.1⁺ iNKT cells were incubated with several TLR agonists: P40 (TLR2), Poly(I:C) (TLR3), LPS (TLR4) and R848 (TLR7). Whereas the positive control PMA + Iono induced IFN- γ production, no cytokine was detected in the presence of any of the TLR agonists tested. Since proinflammatory cytokines promote IFN- γ production by iNKT cells (Leite-De-Moraes et al., 1998), the response to TLR agonists was next evaluated in the presence of IL-12. From the different agonists tested, only R848 induced a significant level of IFN- γ production. (Figure 4A). Since IL-12 was required to reveal the TLR7 response, its role was tested by adding increasing doses in the medium. Low concentrations of IL-12 such as 0.05 ng/ml already induced IFN- γ after R848 stimulation and increasing its concentration further improved the iNKT cell response (Figure 4B). We thus used 10 ng/ml of IL-12 in the following experiments. It is to note that IL-4 production was undetectable in this assay. We postulated that the iNKT cell response to the TLR7 agonist revealed in the presence of IL-12 may be substituted or even emphasized with different proinflammatory conditions. For testing this concept, we compared the effect of proinflammatory cytokines such as IL-12 and IL-18. We then observed that IL-18 was also able to induce a response even it was less effective than IL-12 (Figure 4C). Taken together, our *in vitro* results demonstrate that an « appropriate

inflammatory environment » facilitates a direct and rapid IFN- γ production of iNKT lymphocytes through a TLR7-specific antigen recognition.

iNKT cells express TLR7

As iNKT cells were able to directly respond to TLR7 stimulation, we then explored whether they express this receptor. We first examined TLR mRNA expression by RT-PCR on sorted CD5⁺NK1.1⁺ iNKT cells from spleens. Isolated CD5⁺NK1.1⁺ NK cells were used as a positive control (Figure 5A). We found that iNKT cells express almost all TLRs described in mouse and especially TLR7 mRNA. Next, we analyzed TLR7 expression in iNKT lymphocytes by flow cytometry. We observed that iNKT cells express the intracellular TLR7 protein which is biologically significant since the mean fluorescence intensity is similar to the level detected on TLR7⁺ NK cells (Figure 5B). Since the expression of this receptor correlates with the biological response to its agonist described in Figure 4, it further supports our results describing a direct response of iNKT cells to R848 stimulation.

iNKT cells act as innate cells responding to TLR7 stimulation

In order to test the implication of TLR7 signaling in the response to R848, we next sorted iNKT from WT or TLR7^{-/-} mice. As shown in Figure 6A, iNKT cells deficient for TLR7 were unable to respond to R848 stimulation, demonstrating its role. A critical concern in the response to microbial ligands driven by iNKT cells is the potential TCR engagement and the role of CD1d presentation by APCs. To reproduce the immunological synapse and to confirm the direct triggering of TLR7, we added DCs in the media. When WT DCs were incubated in the presence of WT iNKT cells, they increased by two-fold the response. Nevertheless, both interactions TLR7^{-/-} DCs/WT iNKT cells and WT DCs/ TLR7^{-/-} iNKT cells failed to upregulate IFN- γ production, indicating that both TLR7 signals in DCs and in iNKT cells are required to have a full response. In agreement, when both cells lack TLR7, no response was observed. To confirm that TCR engagement was not required, we added a blocking anti-CD1d to the media. After TLR7 stimulation, iNKT cell response was unchanged in the presence of a blocking anti-CD1d antibody both in the presence and absence of MDCs, in contrast to the positive control α -Galcer (Figure 6B). Taken together, our results suggest that iNKT cells act as innate cells responding to viral ligands through their TLR7 and independently of TCR engagement. It is worth noting that TLR7 signaling in DCs upregulates the response but that APCs are dispensable to the system as iNKT cells can directly be activated by R848.

DISCUSSION

Our work provides the first demonstration of a direct triggering of iNKT cells by a TLR agonist. Indeed, we have showed that TLR7-stimulated iNKT cells are activated and produce large amounts of IFN- γ *in vivo*. We have then demonstrated by adoptive transfer that this subset induces asthma protection through this mechanism. This activity may account for explaining the protective role of infections in allergy. We have further provided evidence that, in contrast to other TLRs, activation of iNKT cells by R848 can occur without TCR engagement and in the absence of DCs.

The protective role of infections and TLR2, 4, 7 and 9 signaling in allergic asthma has been well documented although we still do not understand the cellular and molecular phenomena involved. R848 signaling through TLR7 and MyD88 have been reported to be protective in asthma model without any mechanistic explanation (Quarcoo et al., 2004; Moisan et al., 2006). But R848 had previously been demonstrated to shift human allergen-specific CD4⁺ Th2 lymphocytes into IFN- γ producing cells and that this effect was associated with an increase in the production of IL-12, IFN- α , IL-18, TNF- α , IL-10 and IL-15 by CD14⁺ cells, as well as an increase in the proportions of IFN- γ -producing CD3⁻CD16⁺ Natural Killer cells (Brugnolo et al., 2003). We demonstrate in our transfer model, that IFN- γ produced by R848-activated iNKT cells prevents asthma onset. This result is reminiscent of α -GalCer mechanism of protection (Morishima et al., 2005; Matsuda et al., 2005; Hachem et al., 2005). Indeed, a single administration of α -GalCer at the time of OVA challenge completely prevented AHR, eosinophil infiltration and Th2 cytokines in an IFN- γ -dependent way. One may assume that IFN- γ production triggered by ligand-activated iNKT cells could inhibit effector cells promoting the disease. However, R848 triggered iNKT cells to diminish AHR and airway eosinophilia but we failed to modulate Th2 cytokines. In agreement, several reports, investigating the role of iNKT cells in asthma onset have demonstrated that they were essentially implicated in AHR development but not in Th2 cytokine modulation (Lisbonne et al., 2003; Akbari et al., 2003). Indeed, despite the loss of AHR observed in CD1d- and J α 18-deficient mice, allergen-specific Th2-driven responses develop normally in these mice. Taken together, our results bring a new piece in the understanding of the protective mechanisms induced by infections in allergy.

Our work reveals the innate facete of iNKT cells. We show that R848 stimulates iNKT cells to produce IFN- γ in a pro-inflammatory environment. This response does not require TCR engagement. This concept differs from previous studies which have shown the

requirement of DCs in response to TLR agonists (Montoya et al., 2006; Nagarajan and Kronenberg, 2007). Indeed CpG oligodeoxyribonucleotides (ODNs) were demonstrated to stimulate iNKT cells in the presence of plasmacytoid and myeloid dendritic cells, the first bringing TLR9 and soluble factors (in particular type I IFNs) and the latter expressing CD1d activating iNKT TCR. The three partners were indispensable to have a response (Montoya et al., 2006). In the work of Nagarajan and Kronenberg, activation of iNKT cells by LPS in the presence of IL-12 and IL-18 produced by DCs induced IFN- γ production. It is to note that, in contrast to our results with the TLR7 agonist, iNKT failed to respond to the TLR4 agonist in the absence of DCs (Nagarajan and Kronenberg, 2007). As previously mentioned, our results also differ from the study of Paget *et al.* since the iNKT cell response to TLR9 agonist is CD1d-dependent and involves IFN- α/β (Paget et al., 2007).

Our results provide the first demonstration of a TLR agonist activating iNKT cells to produce IFN- γ . Whereas several works have described activation of iNKT cells by TLR agonists to produce IFN- γ , we describe that the TLR/MyD88 pathway can also stimulate the IL-4 production *in vivo*. Published data using the TLR4 agonist LPS have reported that iNKT cell stimulation leading to IFN- γ production required at least three hours of LPS stimulation (Nagarajan and Kronenberg, 2007). In contrast, we show that iNKT cells respond in cytokines only two hours after stimulation by R848 resembling to the kinetics of stimulation with α GalCer. We propose that iNKT cell response to R848 involves both a CD1d-independent and -dependent stimulation. In favor of a CD1d-dependency, it has been described *in vitro* that TLR7 or TLR9 agonists can stimulate iNKT cells to produce IFN- γ in the presence of APCs through induction of an endogenous ligand (Paget et al., 2007). Concerning the CD1d-independency, we show in our study that sorted iNKT cells cultured with IL-12 can respond to R848 even in the presence of blocking anti-CD1d.

Our work provides new insights in the mechanism of iNKT cell activation after viral infections. Indeed, activation of iNKT cells has the potential to control viral replication and in particular with virus-induced Toll-like receptor (TLR) 7 stimulation. For example, iNKT cells are rapidly activated and selectively depleted in human immunodeficiency virus (HIV)-1 or hepatitis C virus (HCV) infected individuals (Sandberg et al., 2002; Motsinger et al., 2002; Thoren et al., 2004; Kanto and Hayashi, 2007; van der Vliet et al., 2002; Lucas et al., 2003). Direct stimulation of these cells by α -GalCer and secondarily NK cells to secrete antiviral cytokines prevents hepatitis B virus (HBV) replication (Kakimi et al., 2000; Kakimi et al., 2001; Baron et al., 2002). It is to note that the antiviral immune response to HBV can also be

induced by injection of a single cytokine (IL-12 or IL-18), through their ability to induce IFN- γ and IFN- α/β (Cavanaugh et al., 1997; Kimura et al., 2002). Similar results have been validated in other viral models such as lymphocytic cytomegalovirus (CMV) infection (Hobbs et al., 2001; Van Dommelen et al., 2003) or Coxsackievirus B (Potvin et al., 2003; Huber et al., 2003). Consequently, mice lacking iNKT cells have been described as defective in viral clearance. This has been documented after Herpes simplex virus (HSV)-1 and-2 infection (Grubor-Bauk et al., 2003; Ashkar and Rosenthal, 2003). At the light of our results, one may assume that iNKT cells respond to these viruses through TLR7 stimulation. The ability of iNKT cells to be promptly activated by a viral product through both their TCR and TLR signaling pathway emphasizes the versatility of this population in innate response to viral infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Female C57BL/6 wild type (WT) mice at 8 week of age were purchased from Janvier. Eight-week old female MyD88^{-/-}, TLR7^{-/-} (kindly provided by Dr. Shizuo Akira, J α 18^{-/-} (kindly provided by Dr. T. Taniguchi, Japan) or IFN- γ ^{-/-} (Jackson Laboratories) mice and littermates were bred in our animal facilities under specific pathogen-free conditions.

Reagents

R848 and purified LPS from *Escherichia coli* were purchased from Alexis Biochemicals. Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly(I :C)) was obtained from Invivogen. The P40 membrane protein of *Klebsiella pneumoniae* was purified as previously described (Jeannin et al., 2002). α -GalCer was provided by the Pharmaceutical Research Laboratory of Kirin Brewery. Phorbolmyristylacetate (PMA) and ionomycin (Iono) were purchased from Sigma-Aldrich. Murine recombinant IL-12 and IL-18 were commercially obtained by R&D Systems. Fluorochrome-conjugated anti-CD5 (clone 55-7.3), anti-NK1.1 (clone PK136), anti-TCR β (clone H57-597), anti-CD69 (clone H1.2F3) and anti-CD4 (clone L3T4) were from BD Pharmingen. Allophycocyanin-conjugated tetramer was prepared in our laboratory from the murine CD1d/ β 2-microglobulin expression vector constructed by Sidobre and Kronenberg (Sidobre and Kronenberg, 2002), loaded with α -GalCer.

Ex vivo iNKT cell analysis

WT and J α 18^{-/-} mice were injected i.p. with 10 μ g R848; sera or spleens were collected 2 h after. Total splenocytes were pre-incubated with monoclonal antibodies against Fc γ receptor (2.4G2 culture supernatant) and then incubated with CD1d/ α -GalCer tetramer-APC, anti-TCR β -FITC and anti-CD69-PE with appropriate dilutions. The cells were analysed on a FACSCalibur (BD) using CellQuest software. IFN- γ and IL-4 production in sera were quantified by ELISA (R&D systems). The cytokine concentrations were expressed as pg/ml based on a regression curve established for each assay with recombinant murine cytokines.

Immunization and challenge protocol

WT mice were immunized by an i.p. injection of 100 μ g OVA (Sigma-Aldrich) adsorbed onto 1.6 mg alum adjuvant (Merck) in 0.4 ml saline solution. 7 days after, mice were challenged on 3 consecutive days (D7, D8, D9) by aerosol exposure to either an OVA solution (5% in

saline) or a saline solution alone for 20 min. 24 h after the last challenge, airway function was measured and samples were collected for further analyses.

Adoptive transfer

5.10^6 splenocytes from WT mice administered with either PBS or 150 μ g R848 were isolated and injected i.v. into WT recipient mice previously immunized with OVA, 1 h before the first challenge on D7. For some experiments, splenocytes from WT and IFN- $\gamma^{-/-}$ mice were depleted of CD8⁺, CD62L⁺, Mac1⁺ and CD19⁺ cells as described above and negatively enriched cells were stained with anti-NK1.1-PE and anti-CD5-APC antibodies. 5.10^4 sorted CD5⁺ NK1.1⁺ iNKT cells were then injected i.v. in recipient mice using the same protocol as previously described.

Measurement of airway hyperreactivity

AHR was assessed 24 h after the last challenge by delivering an aerosol of metacholine (Sigma-Aldrich) for 1 min at 150 mM to unrestrained, conscious mice placed in a plethysmographic chamber (EMKA technologies). The index of airflow obstruction was expressed as enhanced pause (Penh), calculated as: $Penh = Te [(expiratory\ time) - Tr (relaxation\ time)] / Tr \times [Pef (peak\ expiratory\ flow) / Pif (peak\ inspiratory\ flow)]$. The values of Penh were expressed per minute and are the average of three determinations recorded every 20s. In order to simplify the interpretations, the area under the curve (A.U.C.) was calculated for 10 min after metacholine inhalation. The resulting A.U.C. values are indicated in graphs and represent the quantitative expression of AHR.

Bronchoalveolar-lavage fluids and lung homogenates

Immediately after evaluating AHR, mice were anesthetized by an i.p. injection of urethane (2 g/kg body mass, Sigma Aldrich). Airways were washed with sterile PBS and lungs were removed. Differential cell counts were determined in BALFs after May-Grünwald/Giemsa (Merck) staining of cells on cytopsin slides and IL-5 levels were measured in lung homogenates by ELISA (R&D Systems).

***In vitro* assays**

Splenocytes were depleted of CD8⁺, CD62L⁺, Mac1⁺ and CD19⁺ cells after labeling with the corresponding antibodies (clone 53.67, Mel14, M1/70, 1D3, respectively) using anti-rat Ig-

coated magnetic beads (Invitrogen Dynal®). The enriched negatively population was stained with anti-NK1.1-PE and anti-CD5-APC antibodies. CD5⁺NK1.1⁺ or alternatively CD5^{int}TCR^{int}CD44⁺ iNKT cells were sorted using a FACSVantage (BD) and 2.10⁴ purified cells (purity > 99%) were cocultured or not with 5.10³ MDCs in RPMI supplemented with 10% inactivated FCS, 1% Penicillin-Streptomycin and 5.10⁻⁵ M 2β-Mercaptoethanol. Cells were then stimulated with different concentrations of recombinant IL-12, IL-18, IL-2, TLR agonists, α-GalCer, PMA+Iono or anti-CD1d (clone 20H2), anti-IFNβ and anti-IFNAR antibodies. IFN-γ levels were measured by ELISA (R&D Systems) after 48h of stimulation.

Culture of myeloid dendritic cells

Bone marrow was extracted from the femurs of WT or TLR7^{-/-} mice and cells cultured at a density of 2.10⁶ cell per petri dish (BD) and cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 25 mM HEPES, 1% MEM non-essential amino-acid 100X, 1% MEM sodium pyruvate 100X, 5.10⁻⁵ M 2β-Mercaptoethanol, 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) and 1% supernatant of J558 cell line secreting granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). The medium was partially removed and fresh medium was added every three days. At day 8, immature DCs were collected and stimulated with iNKT cells.

RNA expression analysis

RNA from splenocytes or sorted CD5⁺ NK1.1⁺ NKT cells and CD5⁻ NK1.1⁺ NK cells were extracted with TRIzol reagent (Invitrogen). Ten µg of transfer RNA was added prior to RNA extraction and reverse transcription was performed on total RNA. TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 11 expression was determined by PCR analysis performed on a MWG AG Biotech Primus 96 apparatus using sense and antisense primers (Sigma Genosys, Table I) under the following cycling conditions: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 60°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Double-amplification of 35 cycles each was performed.

Flow cytometry

Splenocyte samples were first labeled using anti-CD5 and anti-NK1.1 antibodies. Intracellular TLR7 staining was done after fixation and permeabilization with a Cytofix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions (BD) using a rabbit polyclonal anti-TLR7 antibody (Alexis Biochemicals) and goat PE-labeled anti-rabbit IgG (). Normal rabbit

polyclonal IgG was used as negative control. Flow cytometric data were collected on a FACSCantoII flow cytometer (BD). Data were gated on lymphocytes with forward- and side-scatter properties using the FACSDiva Software.

Statistical analysis. Results are presented as mean values \pm SEM and were compared using Mann-Whitney's test. P-values < 0.05 were regarded as significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

REFERENCES

- 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.
- Araujo,L.M., Lefort,J., Nahori,M.A., Diem,S., Zhu,R., Dy,M., Leite-De-Moraes,M.C., Bach,J.F., Vargaftig,B.B., and Herbelin,A. (2004). Exacerbated Th2-mediated airway inflammation and hyperresponsiveness in autoimmune diabetes-prone NOD mice: a critical role for CD1d-dependent NKT cells. *Eur. J. Immunol.* *34*, 327-335.
- Ashkar,A.A. and Rosenthal,K.L. (2003). Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J. Virol.* *77*, 10168-10171.
- Bach,J.F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N. Engl. J. Med.* *347*, 911-920.
- Baron,J.L., Gardiner,L., Nishimura,S., Shinkai,K., Locksley,R., and Ganem,D. (2002). Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity.* *16*, 583-594.
- Bendelac,A., Savage,P.B., and Teyton,L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 297-336.
- Brugnolo,F., Sampognaro,S., Liotta,F., Cosmi,L., Annunziato,F., Manuelli,C., Campi,P., Maggi,E., Romagnani,S., and Parronchi,P. (2003). The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* *111*, 380-388.
- Cavanaugh,V.J., Guidotti,L.G., and Chisari,F.V. (1997). Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* *71*, 3236-3243.
- Erb,K.J., Holloway,J.W., Sobeck,A., Moll,H., and Le Gros,G. (1998). Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-Bacillus Calmette-Guerin (BCG) suppresses allergen-induced airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* *187*, 561-569.

- Grubor-Bauk,B., Simmons,A., Mayrhofer,G., and Speck,P.G. (2003). Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J. Immunol.* *170*, 1430-1434.
- Hachem,P., Lisbonne,M., Michel,M.L., Diem,S., Roongapinun,S., Lefort,J., Marchal,G., Herbelin,A., Askenase,P.W., Dy,M., and Leite-De-Moraes,M.C. (2005). Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2793-2802.
- Heil,F., Hemmi,H., Hochrein,H., Ampenberger,F., Kirschning,C., Akira,S., Lipford,G., Wagner,H., and Bauer,S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.
- Hobbs,J.A., Cho,S., Roberts,T.J., Sriram,V., Zhang,J., Xu,M., and Brutkiewicz,R.R. (2001). Selective loss of natural killer T cells by apoptosis following infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* *75*, 10746-10754.
- Huber,S., Sartini,D., and Exley,M. (2003). Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J. Immunol.* *170*, 3147-3153.
- Jeannin,P., Magistrelli,G., Goetsch,L., Haeuw,J.F., Thieblemont,N., Bonnefoy,J.Y., and Delneste,Y. (2002). Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine 20 Suppl 4*, A23-A27.
- Jurk,M., Heil,F., Vollmer,J., Schetter,C., Krieg,A.M., Wagner,H., Lipford,G., and Bauer,S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* *3*, 499.
- Kakimi,K., Guidotti,L.G., Koezuka,Y., and Chisari,F.V. (2000). Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 921-930.
- Kakimi,K., Lane,T.E., Chisari,F.V., and Guidotti,L.G. (2001). Cutting edge: Inhibition of hepatitis B virus replication by activated NK T cells does not require inflammatory cell recruitment to the liver. *J. Immunol.* *167*, 6701-6705.

Kanto,T. and Hayashi,N. (2007). Innate immunity in hepatitis C virus infection: Interplay among dendritic cells, natural killer cells and natural killer T cells. *Hepatol. Res.* 37 *Suppl 3*, S319-S326.

Kimura,K., Kakimi,K., Wieland,S., Guidotti,L.G., and Chisari,F.V. (2002). Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J. Virol.* 76, 10702-10707.

Leite-De-Moraes,M.C., Moreau,G., Arnould,A., Machavoine,F., Garcia,C., Papiernik,M., and Dy,M. (1998). IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur. J. Immunol.* 28, 1507-1515.

Lisbonne,M., Diem,S., de Castro,K.A., Lefort,J., Araujo,L.M., Hachem,P., Fourneau,J.M., Sidobre,S., Kronenberg,M., Taniguchi,M., Van Endert,P., Dy,M., Askenase,P., Russo,M., Vargaftig,B.B., Herbelin,A., and Leite-De-Moraes,M.C. (2003). Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J. Immunol.* 171, 1637-1641.

Lucas,M., Gadola,S., Meier,U., Young,N.T., Harcourt,G., Karadimitris,A., Coumi,N., Brown,D., Dusheiko,G., Cerundolo,V., and Klenerman,P. (2003). Frequency and phenotype of circulating Valpha24/Vbeta11 double-positive natural killer T cells during hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 77, 2251-2257.

Matsuda,H., Suda,T., Sato,J., Nagata,T., Koide,Y., Chida,K., and Nakamura,H. (2005). alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 33, 22-31.

Mendiratta,S.K., Martin,W.D., Hong,S., Boesteanu,A., Joyce,S., and Van Kaer,L. (1997). CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4. *Immunity.* 6, 469-477.

Moisan,J., Camateros,P., Thuraisingam,T., Marion,D., Koohsari,H., Martin,P., Boghdady,M.L., Ding,A., Gaestel,M., Guiot,M.C., Martin,J.G., and Radzioch,D. (2006). TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 290, L987-L995.

- Montoya,C.J., Jie,H.B., Al Harthi,L., Mulder,C., Patino,P.J., Rugeles,M.T., Krieg,A.M., Landay,A.L., and Wilson,S.B. (2006). Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J. Immunol.* *177*, 1028-1039.
- Morishima,Y., Ishii,Y., Kimura,T., Shibuya,A., Shibuya,K., Hegab,A.E., Iizuka,T., Kiwamoto,T., Matsuno,Y., Sakamoto,T., Nomura,A., Taniguchi,M., and Sekizawa,K. (2005). Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2803-2814.
- Motsinger,A., Haas,D.W., Stanic,A.K., Van Kaer,L., Joyce,S., and Unutmaz,D. (2002). CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J. Exp. Med.* *195*, 869-879.
- Nagarajan,N.A. and Kronenberg,M. (2007). Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* *178*, 2706-2713.
- Paget,C., Mallevaey,T., Speak,A.O., Torres,D., Fontaine,J., Sheehan,K.C., Capron,M., Ryffel,B., Faveeuw,C., Leite,d.M., Platt,F., and Trottein,F. (2007). Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity.* *27*, 597-609.
- Potvin,D.M., Metzger,D.W., Lee,W.T., Collins,D.N., and Ramsingh,A.I. (2003). Exogenous interleukin-12 protects against lethal infection with coxsackievirus B4. *J. Virol.* *77*, 8272-8279.
- Quarcoo,D., Weixler,S., Joachim,R.A., Stock,P., Kallinich,T., Ahrens,B., and Hamelmann,E. (2004). Resiquimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolinamines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *Clin. Exp. Allergy* *34*, 1314-1320.
- Sandberg,J.K., Fast,N.M., Palacios,E.H., Fennelly,G., Dobroszycki,J., Palumbo,P., Wiznia,A., Grant,R.M., Bhardwaj,N., Rosenberg,M.G., and Nixon,D.F. (2002). Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* *76*, 7528-7534.

-
- Sidobre,S. and Kronenberg,M. (2002). CD1 tetramers: a powerful tool for the analysis of glycolipid-reactive T cells. *J. Immunol. Methods* 268, 107-121.
- Thoren,F., Romero,A., Lindh,M., Dahlgren,C., and Hellstrand,K. (2004). A hepatitis C virus-encoded, nonstructural protein (NS3) triggers dysfunction and apoptosis in lymphocytes: role of NADPH oxidase-derived oxygen radicals. *J. Leukoc. Biol.* 76, 1180-1186.
- Umetsu,D.T. and DeKruyff,R.H. (2006). Immune dysregulation in asthma. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 727-732.
- van der Vliet,H.J., von Blomberg,B.M., Hazenberg,M.D., Nishi,N., Otto,S.A., van Benthem,B.H., Prins,M., Claessen,F.A., van den Eertwegh,A.J., Giaccone,G., Miedema,F., Scheper,R.J., and Pinedo,H.M. (2002). Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J. Immunol.* 168, 1490-1495.
- Van Dommelen,S.L., Tabarias,H.A., Smyth,M.J., and Degli-Esposti,M.A. (2003). Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells. *J. Virol.* 77, 1877-1884.
- Wills-Karp,M., Santeliz,J., and Karp,C.L. (2001). The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 69-75.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. S. Akira and Dr. T. Taniguchi for providing MyD88^{-/-} and Jα18^{-/-} mice respectively. We thank Dr E. Schneider for critical comments. Françoise Grela was a fellowship of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported by grants from FRM (#DAL20041203162) and Legs Poix.

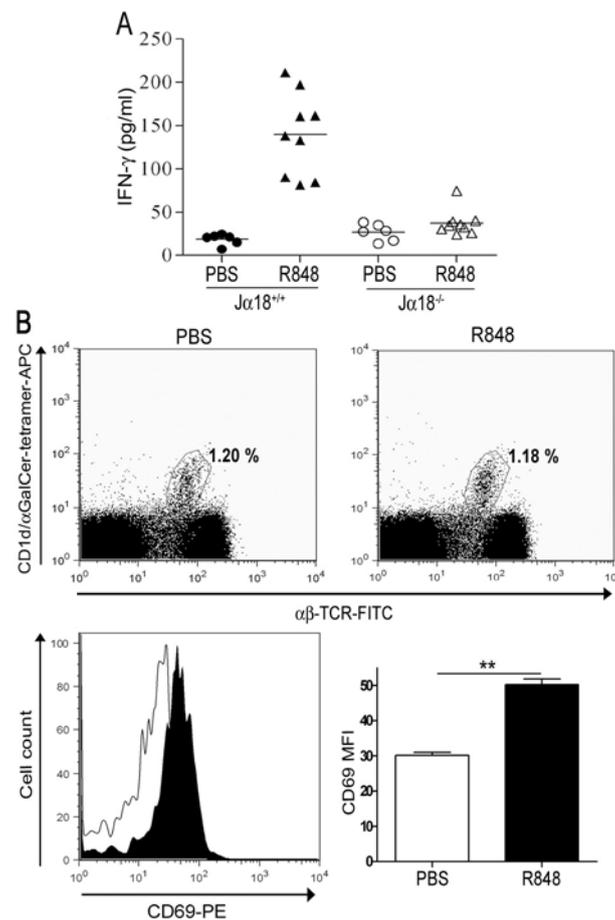


Figure 1. R848 induces iNKT cell activation and rapid IFN- γ production

(A) WT and $J\alpha 18^{-/-}$ mice were injected i.p. with 10 μ g of R848 or PBS. Sera were collected 2 h after injection and IFN- γ level was measured by ELISA. (B) Cell surface expression of CD69 marker is augmented on splenocytes from R848-treated mice (shaded histogram) compared to PBS-injected mice (white histogram). The CD69 MFI is significantly increased in the R848-treated group (n=4). Each panel represents one of at least three independent experiments.

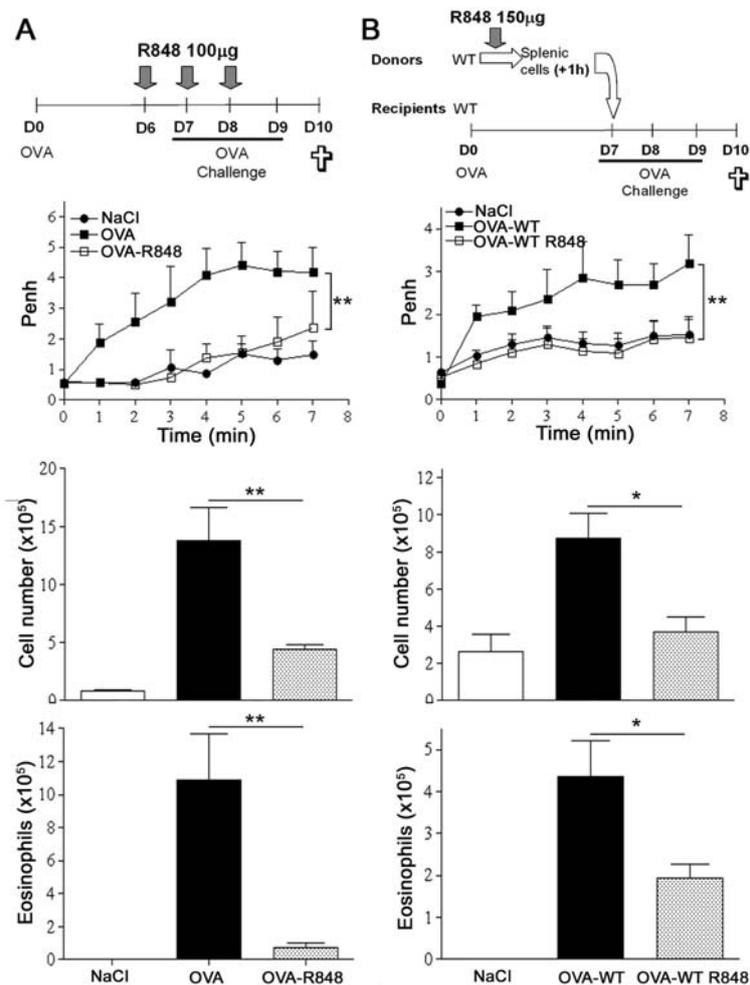


Figure 2. R848 asthma protection can be transferred by splenocytes

(A) Mice immunized with OVA were treated on 3 consecutive days with R848 and challenged with OVA. AHR to metacholine was measured 24 h after the last challenge with OVA or NaCl. OVA-challenged mice were treated (OVA-R848) or not (OVA) with R848. Total cell and eosinophil recruitment was measured in BALFs. (B) WT OVA-immunized recipient mice were transferred with splenocytes from PBS (OVA-WT) or R848-administered WT donor mice (OVA-WT R848). AHR, total cell and eosinophil recruitment were evaluated one day after the last challenge. Each panel represents one of at least three independent experiments.

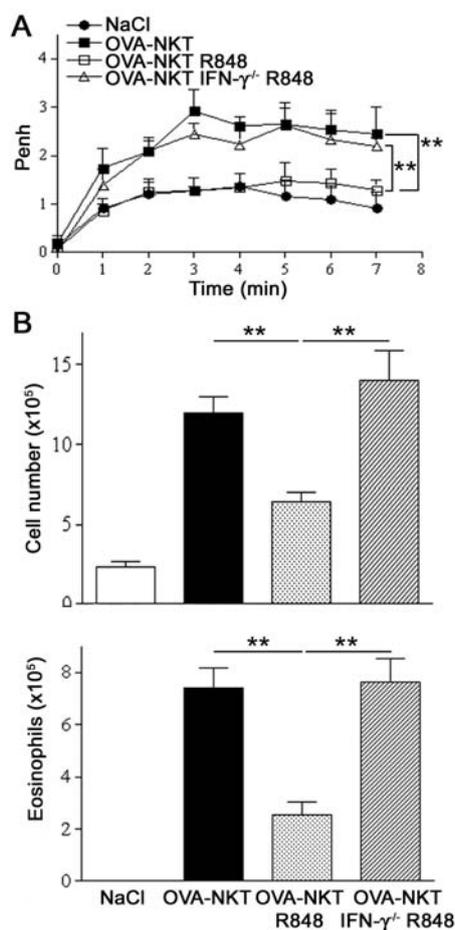


Figure 3. iNKT cells producing IFN- γ promote asthma protection

Sorted CD5⁺ NK1.1⁺ iNKT cells from WT or IFN- $\gamma^{-/-}$ R848-treated mice (OVA-NKT R848 and OVA-NKT IFN- $\gamma^{-/-}$ R848 respectively) or WT PBS-treated mice (OVA-NKT) were transferred in OVA-immunized recipient animals. AHR (A) and total cell and eosinophil recruitment (B) were measured as described in Figure 2. Each panel represents one of at least three independent experiments.

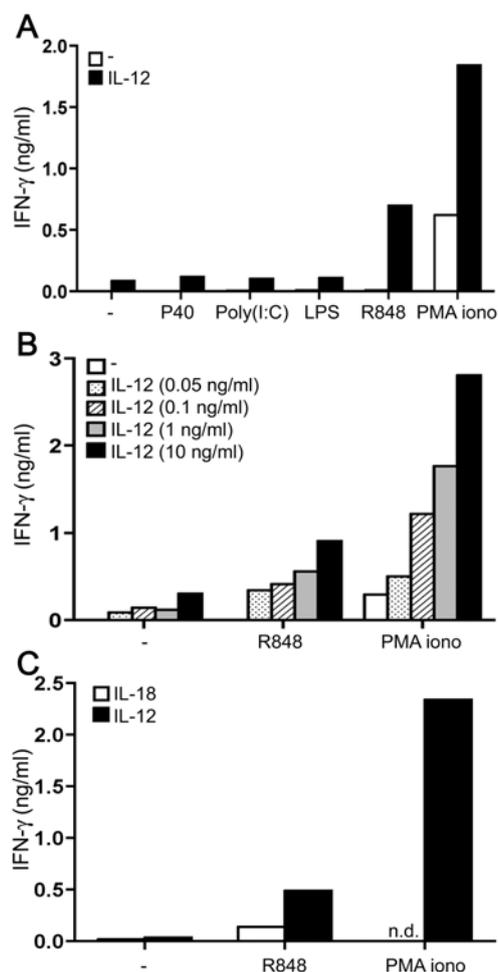


Figure 4. iNKT cells are directly targeted by R848 and promptly produce IFN- γ in the presence of IL-12

Sorted CD5⁺ NK1.1⁺ iNKT cells were stimulated with TLR agonists (2 μ g/ml P40, 1 μ g/ml Poly(I:C), 1 μ g/ml LPS, 1 μ g/ml R848) or 10⁻⁸ M PMA + 10⁻⁶ M ionomycin (PMA + Iono) and cultured in the absence or presence of 10 ng/ml of IL-12. iNKT cells were stimulated in the presence or absence of 10 ng/ml of IL-12 (A,C), with increasing doses of IL-12 (B) or with 10 ng/ml of IL-18 (C). IFN- γ production was evaluated in supernatants by ELISA 48h after stimulation. Each panel represents one of at least three independent experiments.

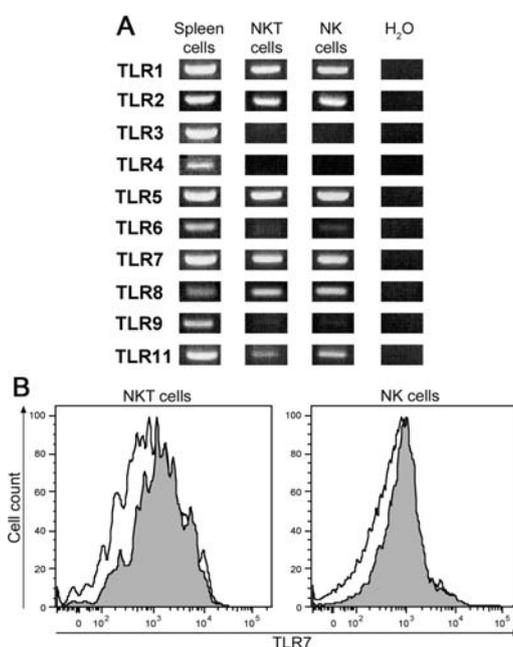


Figure 5. iNKT cells express TLR7

(A) mRNA expression of TLR1 to 11 of sorted CD5⁺NK1.1⁺ iNKT cells and CD5⁻NK1.1⁺ NK cells were evaluated by RT-PCR using sense and antisense primers described in Table I. Total splenocytes were used as a positive control and H₂O as a negative one. (B) Intracellular TLR7 expression was evaluated in iNKT and NK cells by flow cytometry using rabbit polyclonal antibody against TLR7 and goat PE-labeled anti-rabbit IgG (shaded histogram). Normal rabbit ployclonal IgG (white histogram) was used as negative control. Each panel represents one of at least three independent experiments.

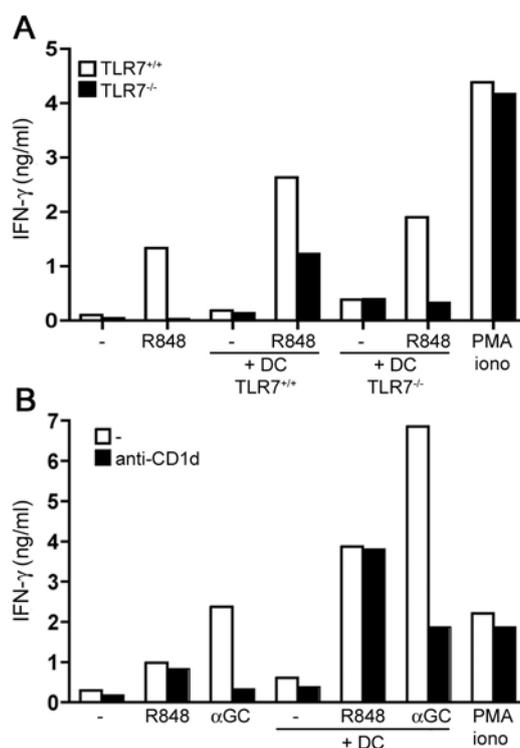


Figure 6. iNKT cells respond to R848 through their TLR7 and without TCR engagement

(A) Sorted iNKT cells from TLR7^{+/+} or TLR7^{-/-} mice were incubated in the presence of 10 ng/ml of IL-12, 1 μ g/ml R848 or PMA + Iono and with MDCs from TLR7^{+/+} or TLR7^{-/-}. (B) Sorted iNKT cells were stimulated with R848, 100 ng/ml α -GalCer or PMA + Iono in the presence of IL-12 and 10 μ g/ml of blocking anti-CD1d antibody. IFN- γ production was evaluated in supernatants by ELISA 48h after stimulation. Each panel represents one of at least three independent experiments.

	Sense primers	Antisense primers
TLR1	5'-TCTCTGAAGGCTTTGTCGATACA	5'-GACAGAGCCTGTAAGCATATTCG
TLR2	5'-CATTGGGTGGAGAACCTCATGGTCCAG	5'-CTAGGACTTTATTGCAGTTCTCAGATT
TLR3	5'-CGGATTCTTGGTTTCAAGGAAATAGAC	5'-TTAATGTGCTGAATTCCGAGATCCAAG
TLR4	5'-CAAGAACATAGATCTGAGCTTCAACCC	5'-GCTGTCCAATAGGGAAGCTTTCTAGAG
TLR5	5'-GCTATGCTTTGAAGAAAGAGACTTCAT	5'-CTAGGAAATGGTTGCTATGGTTCGCAA
TLR6	5'-AACAGGATACGGAGCCTTGA	5'-CCAGGAAAGTCAGCTTCGTC
TLR7	5'-TTCCGATACGATGAATATGCACG	5'-TGAGTTTGTCCAGAAGCCGTAAT
TLR8	5'-GGCACAACCTCCCTTGTGATT	5'-CATTGGGTGCTGTTGTTTG
TLR9	5'-CCGCAAGACTCTATTTGTGCTGG	5'-TGTCCTAGTCAGGGCTGTACTCAG
TLR11	5'-TTGATGTATTCGTGTCCCACTGC	5'-CCTCTTTCTCTCCTCTTCCTCG

Table I Sense and antisense primers used in RT-PCR.

DISCUSSION

Depuis quelques années, les TLR, à l'origine décrits dans l'induction de réponses inflammatoires, ont pris une place importante dans l'induction et l'orientation de la réponse immunologique, par l'intermédiaire des cellules présentatrices d'antigène. Néanmoins, la réponse immune est orientée en fonction de l'environnement cytokinique, des cibles cellulaires et des différents relais mis en place. L'implication des TLR dans différentes pathologies souligne leur rôle immunomodulateur crucial dans le fonctionnement du système immunitaire. C'est pourquoi, afin de mieux évaluer leur participation, nous nous sommes intéressés à deux modèles physiopathologiques, le diabète de type 1, maladie auto-immune à dominante Th1 et l'asthme allergique, caractérisé par des réponses de type Th2.

Ainsi, dans un premier temps, nous discuterons de la modulation du diabète par les TLR, pour ensuite nous intéresser à leur rôle dans l'asthme allergique et enfin, évaluer leur impact sur une cible cellulaire régulatrice, le lymphocyte iNKT.

Modulation du diabète de type 1 par les TLR

Bien que le rôle des infections ait été décrit dans la prévention des maladies auto-immunes et notamment du diabète, la plupart des travaux ont porté sur des modèles animaux. En effet, les études épidémiologiques sont difficiles à établir dans une maladie où les symptômes visibles apparaissent souvent longtemps après le déclenchement de la maladie. Néanmoins, quelques études ont confirmé l'influence d'un polymorphisme TLR dans le développement du diabète, mais les données restent encore lacunaires (Santin et al. 2006a, Pirie et al. 2005b, Rudofsky, Jr. et al. 2004, Park et al. 2004). Ainsi, les modèles animaux sont venus apporter des éléments supplémentaires de compréhension.

Bien qu'une seule injection de BCG soit capable d'induire une protection complète des souris NOD (Qin et al. 1993), nos traitements devaient être répétés pour être efficaces (article n°1 et manuscrits n°2, 3 et 4). En fonction des agonistes testés, les cinétiques pouvaient varier mais seules les administrations précoces en phase prédiabétique se sont révélées efficaces. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que ces agonistes pouvaient cibler les mécanismes régulateurs naturellement présents chez cette souris qui réussissent à limiter pendant quelques semaines l'inflammation du pancréas. Ainsi, en les stimulant par les TLR, nous prolongerions leur effet protecteur.

En effet, nous avons pu mettre en évidence le fait que les agonistes TLR étaient capables d'induire la production de cytokines immunorégulatrices, telles l'IL-10 et le TGF- β

dont le rôle protecteur a clairement été démontré dans le diabète (manuscrit n°2, 3 et 4). Ainsi, le rôle de l'IL-10 a été exploré et il a été montré que l'administration systémique d'IL-10 recombinante protégeait du diabète (Pauza et al. 1999, Nitta et al. 1998). Cependant, l'administration locale dans les îlots de cette cytokine, soit chez des souris transgéniques, soit par administration d'une protéine de fusion IL-10-Ig accélérât la maladie (Wogensen et al. 1994, Zheng et al. 1997). Le TGF- β , quant à lui, est capable de protéger les souris NOD de la maladie (Piccirillo et al. 1998). Bien que les agonistes TLR testés induisent de grandes quantités de ces cytokines, nous n'avons pu montrer *in vivo* qu'une dépendance du TGF- β pour l'extrait bactérien OM-85 (article n°1). Les protections induites par les autres agonistes comme le LPS, le Poly(I:C) ou la P40 n'étaient pas dépendantes de ces deux cytokines mais il n'est pas exclu que plusieurs protéines soient impliquées et que le fait de n'en enlever qu'une ne soit pas suffisant pour lever la protection. En ce qui concerne le Poly(I)Poly(C), agoniste de TLR3 (manuscrit n°4), nous avons démontré une dépendance de l'IL-4 dont les effets protecteurs ont largement été décrits (Cameron et al. 2000a, Cameron et al. 2000b, Chang et al. 1999).

Parmi les cibles cellulaires, nous avons focalisé l'étude sur les cellules régulatrices capables de produire ces cytokines, à savoir Treg et NKT. En effet, le rôle des lymphocytes Treg avait déjà largement été exploré dans le diabète. Ainsi, l'absence de cellules Treg, comme lors de transferts adoptifs de cellules après déplétion en CD25⁺ ou chez les souris déficientes pour CD28 qui présentent une fréquence diminuée de Treg, conduit à une exacerbation de la maladie (Tang et al. 2003). Par ailleurs, le transfert adoptif de Treg, après expansion *in vitro* en présence d'anti-CD3, anti-CD28 ou IL-2, abolissait le développement de la maladie (Tang et al. 2004). Nous avons pu observer qu'un traitement par certains agonistes comme le Pam₃Cys, le LPS et le R848 provoquait rapidement un recrutement des Treg dans le sang (manuscrit n°2). Nous pourrions ainsi imaginer que l'activation de ces cellules pourrait contribuer à renforcer l'immunité naturelle qui préexiste chez la souris NOD. Nous avons déjà montré une expansion mais on peut également envisager une activation de ces cellules et une production de cytokines immunorégulatrices telles l'IL-10 et le TGF- β . En effet, Flavell et son équipe ont montré qu'un traitement transitoire dans les îlots par du TGF- β est capable d'inhiber le développement de la maladie et de stimuler l'expansion des Treg dans les îlots (Peng et al. 2004). A la suite de ce traitement, 40 à 50% des cellules CD4⁺ des îlots sont CD25⁺ et expriment fortement CTLA-4 et Foxp3, et le transfert de celles-ci protège du diabète.

Néanmoins, les TLR ciblent beaucoup de types cellulaires comme des cellules présentatrices de l'antigène, et leur action est nettement plus large que l'activation des Treg. C'est pourquoi leur potentiel semble assez intéressant, d'autant plus que certains d'entre eux sont capables d'agir sur un autre mécanisme de défense naturel, en activant les lymphocytes NKT. La première preuve de leur rôle protecteur est venue de l'observation de leur déficit numérique et fonctionnel chez la souris NOD (Gombert et al. 1996, Baxter et al. 1997). Par la suite, leur rôle protecteur a été confirmé par des expériences de transfert de fractions enrichies en NKT ou chez des souris transgéniques chez lesquelles le diabète était inhibé et une corrélation a été établie entre la fréquence des NKT et le degré de protection contre le diabète (Lehuen et al. 1998, Hammond et al. 1998, Carnaud et al. 2001). Ce rôle naturel peut être renforcé lorsque l'on traite les souris NOD par leur stimulant spécifique, l' α -GalCer (Sharif et al. 2001, Hong et al. 2001). Ainsi, un traitement entre 3 et 5 semaines d'âge, au début de l'infiltration des îlots, protège les souris NOD de l'apparition de la maladie. Nous avons pu définir que les protections induites par l'OM-85, la P40 et le Poly(I)Poly(C) étaient dépendantes des NKT (article n°1 et manuscrits n°3 et 4). Nous pouvons ainsi imaginer qu'à l'instar de l' α -GalCer, la P40, le Poly(I)Poly(C) et l'OM-85 pourraient stimuler et activer les NKT afin de révéler leur rôle protecteur naturel. Il est d'ailleurs probable que la protection induite par le Poly(I)Poly(C) est dépendante de leur production d'IL-4. Par ailleurs, des études en cours suggèrent que la protection par le R848 pourrait également impliquer ces cellules.

Bien que nous ayons montré que le traitement par des agonistes des TLR induisait une protection contre le diabète en termes de régulation de la glycémie, les effets sur le pancréas sont différentiels. En effet, le traitement avec la P40 est parvenu à inhiber fortement l'infiltration pancréatique et à conserver un nombre important d'îlots sains (manuscrit n°3). Les autres agonistes étaient moins efficaces et les îlots étaient largement infiltrés avec des taux de péri-insulite et d'insulite importants. Quelques agonistes réussissaient néanmoins à diminuer le taux d'insulite comme le LPS et le Pam₃Cys (manuscrit n°2). Cependant, nous avons observé un point commun entre toutes ces molécules. En effet, à l'inverse de souris NOD non traitées qui présentent à 25-30 semaines d'âge peu îlots qui sont largement infiltrés et pour la plupart atrophiques, nos souris protégées comportaient des îlots plus grands en taille et en nombre. Ainsi, nos traitements par les agonistes des TLR permettraient de conserver un nombre suffisant d'îlots pour maintenir une fonction pancréatique proche de la normale.

Bien que nous ayons montré que différents agonistes des TLR induisaient une protection, tous ne sont pas aussi efficaces et certains d'entre eux n'ont révélé aucun effet bénéfique. C'est par exemple le cas du lipide A, agoniste de TLR4 qui correspond à la partie

lipidique du LPS, qui n'a aucun effet sur le développement de la maladie. De même, le taxol, décrit pour stimuler TLR4 et le Poly(U) (TLR7) sont totalement inefficaces. Par contre, lorsque l'on bloque la voie TLR4 avec un antagoniste comme le Phosphatidylinositol, le diabète a tendance à être accéléré (manuscrit n°2). Ce résultat est un argument de plus en faveur de l'hypothèse selon laquelle la stimulation des TLR agit sur le développement de cette pathologie. Néanmoins, nos études ont montré que chaque agoniste possède ses mécanismes de protection propres. En effet, bien que le LPS induise une protection remarquable à faible dose, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une dépendance cellulaire ou moléculaire. Nous savons cependant que la protection n'est pas dépendante des NKT et des cytokines IL-10, TGF- β et IL-4. Même si nous avons pu observer *in vitro* et *in vivo*, le recrutement de nombreux types cellulaires et la production de différentes cytokines immunorégulatrices, nous n'avons pas pu les corrélés à la protection. Il est possible que plusieurs éléments soient impliqués et qu'il faut en bloquer plusieurs pour obtenir un effet majeur.

Cependant, certains de nos résultats peuvent sembler contradictoires avec les données publiées dans la littérature. En effet, il a été montré que certaines infections, notamment virales, étaient impliquées dans le déclenchement du diabète. Il a ainsi été décrit que le Poly(I:C) et le R848 pouvaient provoquer une accélération du diabète (Paronen et al. 2004, Lang et al. 2005, Devendra et al. 2005). Cependant, il faut noter qu'il s'agit ici de modèles de diabète induits par des protéines virales. En ce qui nous concerne, nous nous plaçons dans un modèle spontané où le Poly(I:C) a déjà révélé ses propriétés protectrices (Serreze et al. 1989, Sobel et al. 1998). Nous avons ainsi pu montrer que la stimulation des TLR pouvait moduler l'apparition du diabète mais on est en droit de se demander quel peut être leur rôle en absence de stimulation dans le développement de la maladie. Pour répondre à ces questions, nous avons généré différentes souris déficientes pour des TLR et des protéines de leur voie de signalisation et nous disposons désormais de quelques éléments de réponse. Ainsi, nous avons pu observer que des souris déficientes en TLR2 ou en MyD88 sont très bien protégées du diabète. D'ailleurs, une équipe a récemment montré l'implication de TLR2 dans le développement de la pathologie. D'après leur étude, TLR2 serait impliqué dans l'émergence des lymphocytes T autoréactifs (Kim et al. 2007). Ainsi, l'incapacité de stimuler les TLR ou leur voie de signalisation inhiberait le dysfonctionnement du système immunitaire. Cette notion est encore un peu difficile à appréhender car à l'encontre de l'hypothèse de l'hygiène. Cependant, le rôle des TLR semble bien plus large et on pourrait envisager leur implication dans l'éducation du système immunitaire et les mécanismes de tolérance.

En plus du diabète, l'implication des TLR a plus largement été décrite dans différentes maladies autoimmunes. En effet, l'activation de la voie TLR9/MyD88 est requise pour déclencher la production d'autoanticorps pathogènes dans un modèle murin de lupus érythémateux disséminé (Ehlers et al. 2006). D'autres travaux ont suggéré que TLR9 pouvait conférer une protection contre la néphrite induite dans le lupus dans le modèle murin MRL-lpr. TLR7, quant à lui possédait des effets inverses (Christensen et al. 2006). Le rôle des TLR dans l'arthrite autoimmune a été exploré dans des modèles murins d'arthrite induite par des adjuvants ou des protéines de la paroi de streptocoques. Ainsi, des souris déficientes pour MyD88 étaient résistantes à la maladie et les souris TLR2^{-/-} présentaient une atténuation de la sévérité de la pathologie (Liu et al. 2001). Par ailleurs, l'activation de TLR2 a été impliquée dans le développement de l'hépatite autoimmune chez la souris (Lang et al. 2006). Néanmoins, à la différence de ces modèles induits, nous agissons dans le modèle NOD sur une maladie spontanée, plus proche physiologiquement du diabète insulino-dépendant humain.

Tous nos résultats concourent à démontrer que, par leur aptitude à orienter des réponses vers Th2, la stimulation des TLR dans le diabète peut contrer le déséquilibre existant chez la souris NOD. Mais, les mécanismes restent complexes à définir, sont spécifiques à chaque agoniste et semblent stimuler l'immunité naturelle préexistante chez ces animaux qui leur permet au moins au début de contenir l'inflammation pancréatique.

Implication de l'activation TLR des NKT dans l'asthme allergique

De nombreux travaux ont montré le rôle des infections et des signalisations TLR2, 4, 7 et 9 dans l'asthme allergique, mais les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués sont peu élucidés. Néanmoins, la protection est surtout observée lorsque les agonistes TLR sont administrés après l'immunisation. En effet, les molécules protectrices sont alors plus efficaces sur la phase effectrice. Les résultats contradictoires décrits dans la littérature, notamment concernant le LPS s'expliquent la plupart du temps par une différence de cinétique de traitement (Eisenbarth et al. 2002, Murakami et al. 2007, Rodriguez et al. 2003). Le rôle protecteur du R848 avait déjà été publié mais seule une implication de la protéine MyD88 avait pu être définie (Quarcoo et al. 2004, Moisan et al. 2006). Les cibles cellulaires capables d'inhiber les réponses Th2 caractéristiques de l'asthme sont nombreuses, mais nous sommes essentiellement intéressés aux lymphocytes NKT car nous possédions des données qui suggéraient que le R848 pouvait cibler les cellules NKT.

Etant donné que les souris dépourvues de cellules NKT font un asthme très atténué, nous avons mis au point un système de transfert adoptif afin de conserver des souris receveuses de type sauvage faisant un asthme complet (manuscrit n°5). Outre un avantage technique, le principal atout de cette méthode a été de cibler avec le R848, directement chez le donneur, des cellules naïves qui n'avaient pas encore rencontré l'allergène. Nous pouvions ainsi agir plutôt sur des cellules régulatrices que sur des cellules effectrices. Nous avons ainsi pu démontrer que le ciblage des lymphocytes NKT par le R848 leur permettait de jouer leur rôle inhibiteur sur les cellules Th2 effectrices. Ce mécanisme rappelle celui de l' α -GalCer, qui, lui aussi, active spécifiquement les cellules NKT et empêche le développement de l'asthme d'une manière dépendante de l'IFN- γ (Hachem et al. 2005, Matsuda et al. 2005, Morishima et al. 2005). Cependant, contrairement à l' α -GalCer, cet effet serait indépendant de l'engagement du TCR. En effet, des expériences réalisées en présence d'anticorps bloquants anti-CD1d n'ont pu montrer de façon significative de dépendance de CD1d. Bien que peu d'éléments soient décrits sur le mode d'action du R848, un travail effectué chez l'homme est en accord avec nos résultats. En effet, il a été démontré que le R848 pouvait orienter les lymphocytes humains Th2 CD4⁺ spécifiques de l'allergène en cellules productrices d'IFN- γ . Cet effet était associé à une augmentation de la production d'IL-12, IFN- α , IL-18, TNF- α , IL-10 et IL-15 par les cellules CD14⁺, mais aussi à un accroissement de la proportion de cellules CD3⁻CD16⁺ (natural killer) productrices d'IFN- γ (Brugnolo et al. 2003).

Bien que nous ayons focalisé nos expériences sur l'implication des lymphocytes NKT dans la protection induite par le R848, il n'est pas exclu que d'autres cellules y participent. En effet, notre modèle de transfert ne permettait pas de retrouver la protection totale que nous obtenions en traitant les animaux directement par la molécule. D'autre part, nous avons réalisé quelques expériences sur des souris déficientes en cellules NKT, et, bien que l'asthme soit atténué, nous avons pu mettre en évidence une protection chez les souris qui avaient reçu du R848, ce qui laisse supposer que d'autres cellules sont impliquées dans cet effet. Nous pourrions ainsi tout à fait imaginer une implication des Treg. En effet, quelques données commencent à émerger sur l'implication des Treg dans les maladies allergiques. Des travaux chez la souris ont ainsi décrit que le transfert adoptif de CD4⁺ de type Th2 après déplétion des CD4⁺CD25⁺, augmentait l'éosinophilie (Jaffar et al. 2004). Par ailleurs, le transfert de cellules CD4⁺CD25⁺ est capable d'inhiber l'hyperréactivité respiratoire, l'éosinophilie et les réponses de type Th2, de façon dépendante de l'IL-10 (Kearley et al. 2005). Il s'agirait donc d'une

hypothèse à vérifier. En effet, Sel *et al.* ont publié que le Poly(I:C) et le R848 protégeaient de l'asthme allergique et que l'inflammation des voies respiratoires, l'hypertrophie des cellules gobelet et l'hyperréactivité respiratoire étaient diminuées d'une façon dépendante de l'IL-12 mais que la réduction du nombre d'éosinophiles dans les lavages bronchoalvéolaires était dépendante de l'IL-12 et de l'IL-10 (Sel *et al.* 2007).

TLR et NKT : histoire d'un couple improbable...

Les lymphocytes NKT sont des cellules régulatrices impliquées dans de nombreux mécanismes comme l'immunité anti-infectieuse, différentes pathologies autoimmunes et allergiques ou encore dans le cancer. Bien qu'ils aient été décrits comme acteurs de la lutte contre certaines infections, leur capacité de reconnaissance des microorganismes demeure faible. Pendant longtemps, on ne connaissait pas leur ligand naturel. Seul un superantigène exogène du nom d' α -GalCer était capable de les activer. Depuis peu, quelques ligands endogènes commencent à apparaître. Néanmoins, la structure du TCR des cellules NKT limite leur répertoire de reconnaissance aux seuls antigènes glycolipidiques, présentés par la molécule CD1d. Une des grandes avancées dans la biologie des NKT a été la découverte en 2004 d'un ligand glycosphingolipidique endogène, l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) (Zhou *et al.* 2004). De plus, des souris déficientes pour la β -hexosaminidase b (hexb), enzyme requise pour la génération de l'iGb3, comportait un défaut de développement des cellules NKT, suggérant le rôle de cette molécule dans leur développement thymique. Depuis, quelques ligands microbiens ont été mis en évidence comme des glycosylcéramides provenant de la paroi de bactéries *Sphingomonas* Gram-négatives LPS-négatives (Mattner *et al.* 2005, Kinjo *et al.* 2005, Sriram *et al.* 2005). De la même façon, ces cellules peuvent reconnaître des α -galactosyldiacylglycérols provenant de *Borrelia burgdorferi*, l'agent de la maladie de Lyme (Kinjo *et al.* 2006). Néanmoins, ce spectre de reconnaissance reste pauvre face à la diversité des structures pathogéniques. Etant donné que les lymphocytes NKT sont impliqués dans l'immunité anti-infectieuse, notamment contre les virus, on peut postuler que ces cellules reconnaissent bien plus de molécules que celles décrites. Cependant, la structure de leur TCR les cantonne à ne reconnaître que des produits possédant une structure glycolipidique particulière. C'est pourquoi nous avons étudié s'ils pouvaient détecter d'autres molécules de pathogènes, indépendamment de leur TCR, et par exemple par la stimulation des TLR.

Ce champ d'investigation longtemps resté lacunaire commence à se développer et quelques équipes se sont intéressées à l'interaction TLR-NKT. Récemment, deux groupes ont décrit que quelques agonistes TLR, comme le LPS et les ODN CpG, pouvaient activer ces cellules (Nagarajan et al. 2007, Montoya et al. 2006). Nagarajan *et al.* ont analysé l'activation des NKT par le LPS et ont démontré que l'IL-12 et l'IL-18 produites par les DC étaient importantes pour avoir une production d'IFN- γ . Dans cet essai, la présence de DC était cruciale, les cellules NKT étant incapables de répondre directement au LPS (Nagarajan et al. 2007). Montoya *et al.* ont montré que les ODN CpG stimulaient les lymphocytes NKT en présence de DC plasmacytoïdes et myéloïdes, les premières apportant TLR9 et des facteurs solubles (en particulier des IFN de type I) et les dernières exprimant CD1d activant le TCR des NKT. Les trois partenaires étaient indispensables pour obtenir une réponse (Montoya et al. 2006). Très récemment, une deuxième étude est venue apporter plus de précisions sur TLR9 et NKT, puisque les auteurs ont montré que les cellules NKT pouvaient répondre aux ODN CpG en présence de DC myéloïdes uniquement. Leur explication était que la stimulation de TLR9 entraînait la production d'IFN de type I et la néosynthèse de β -glucosylcéramides par les DC, activant ensuite les cellules NKT (Paget et al. 2007).

Nos résultats apportent une nouveauté, puisque le ciblage des NKT par TLR7 est indépendant de CD1d et n'implique donc pas leur TCR (manuscrit n°5). Contrairement à tout ce qui avait été décrit jusqu'à présent, nous apportons la preuve d'un ciblage direct des NKT par TLR7, ne nécessitant pas d'intervention de DC et de ligands endogènes. Les NKT qui expriment fortement TLR7 peuvent donc reconnaître le R848. Nous pouvons postuler que ce résultat est particulier à TLR7 car des agonistes des autres TLR sont incapables de produire le même résultat. En effet, nous avons pu vérifier dans nos expériences que le LPS nécessitait la présence de DC pour activer les cellules NKT. Nous apportons donc un argument en faveur du rôle inné des lymphocytes NKT dans l'immunité anti-infectieuse. Ce résultat possède une relevance physiologique dans le cas des infections virales. En effet, ces lymphocytes sont impliqués dans l'infection au HSV car les souris CD1d^{-/-} et J α 18^{-/-} sont plus sensibles à HSV-1 (Grubor-Bauk et al. 2003). De la même façon, après une infection intravaginale par HSV-2, les souris CD1d^{-/-} présentent une diminution de la survie et une pathologie vaginale exacerbée. Il a été montré dans ce modèle que les NK et les NKT constituent la principale source d'IFN- γ (Ashkar et al. 2003). En effet, les symptômes les plus forts sont observés chez les souris IL-15^{-/-} qui sont dépourvues de ces deux types cellulaires. Il est intéressant de noter que le R848 a été à l'origine généré comme un analogue de l'imiquimod pour traiter le HSV-

2. On pourrait ainsi postuler que le R848 pourrait cibler les NKT *via* TLR7 pour combattre l'infection au HSV-2.

Ce ciblage direct des NKT par TLR7 a pu être révélé grâce à l'ajout d'IL-12 dont le rôle dans l'exacerbation de la production d'IFN- γ après stimulation par l' α -GalCer, avait déjà été montré (Leite-De-Moraes et al. 1998). Par ailleurs, l'ajout de DC dans le milieu augmente fortement la réponse, laissant supposer que ces cellules apportent des signaux supplémentaires. Nous savons que cette réponse est indépendante de CD1d donc il semblerait qu'il n'y ait pas nécessité d'une présentation d'un ligand endogène. De la même façon, les IFN de type I ne sont pas impliqués. Bien que nous n'ayons pas pu mettre en évidence la nature de ces signaux, nous pouvons supposer que des molécules de costimulation et des médiateurs solubles induits par TLR7 sont impliqués dans l'augmentation de la réponse des lymphocytes NKT.

Il est vrai que les lymphocytes NK sont également impliqués dans la réponse au R848 mais il semblerait que les cellules NKT agissent en amont. En effet, lorsque l'on traite des souris avec du R848, l'IFN- γ produit dans le sérum après 2 heures est dû aux NKT puisque les souris $J\alpha 18^{-/-}$ n'en produisent plus. Par contre, si on se place à un temps plus tardif, par exemple 4 heures après injection, dans ce cas, l'augmentation de la quantité d'IFN- γ est présente également chez les souris $J\alpha 18^{-/-}$, ce qui laisse supposer que les cellules NK ont pris le relais dans la réponse. Ainsi, ces deux types cellulaires pourraient agir conjointement avec des cinétiques différentes pour répondre à une stimulation TLR7. Notre étude révèle ainsi le caractère inné des cellules NKT.

Place des TLR dans le fonctionnement du système immunitaire

L'hypothèse de l'hygiène est basée sur la nécessité de l'existence d'un signal stimulant le système immunitaire qui permettrait sa maturation et son bon fonctionnement ultérieur. Les mécanismes soulignant ce concept sont cependant mal définis.

Ainsi, la fonction des TLR pourrait être plus large que la simple reconnaissance des pathogènes. En effet, le taux d'infection limité dans nos sociétés modernes pourrait être insuffisant pour stimuler correctement notre système immunitaire et induire sa maturation. Il existe ainsi toute une littérature sur le rôle de la flore commensale qui stimulerait le système immunitaire *via* MyD88 sans pour autant provoquer de réactions immunitaires. D'ailleurs, de plus en plus de travaux s'intéressent à l'impact des probiotiques sur l'organisme. Ce champ d'investigation plébiscité par les grandes compagnies agro-alimentaires a déjà apporté

quelques informations. Leur rôle bénéfique n'est pas encore attesté mais ces mélanges microbiens sont capables de stimuler l'immunité. Ils seraient donc un bon complément à notre alimentation appauvrie en microorganismes car souvent pasteurisée. Une étude a d'ailleurs montré que l'administration de ces bactéries à des souris NOD les protégeaient de l'apparition du diabète, d'une manière dépendante de l'IL-10 (Calcinaro et al. 2005). D'autres équipes suggèrent l'administration de ces préparations aux femmes enceintes et aux nouveaux-nés pour les protéger des allergies. Un argument indirect en faveur de ces études nous vient des pays où le régime alimentaire est constitué d'aliments fermentés et où une diminution du risque d'allergie est observée (Alm et al. 1999).

Ainsi, l'amélioration de la prise en charge médicale (antibiotiques, vaccination) et des conditions d'hygiène couplées à la stérilisation de nos aliments a contribué à réduire l'incidence des infections, mais a « désœuvré » notre système immunitaire, qui par manque de stimulation microbienne, a tendance à déclencher des réactions exacerbées contre des constituants de l'organisme ou de l'environnement normalement inoffensifs.

Par ailleurs, dans des conditions d'homéostasie, les TLR sont capables de reconnaître le soi du non soi. L'organisme a ainsi mis en place des mécanismes permettant la tolérance, comme la méthylation de l'ADN du soi ou différentes modifications post-transcriptionnelles de l'ARN du soi. Néanmoins, les TLR peuvent également ressentir le danger quand des agonistes endogènes, comme des produits provenant de l'apoptose de cellules, sont présents dans l'environnement. Cependant, l'équilibre entre reconnaissance et tolérance doit être conservé pour ne pas aboutir à des dérèglements comme c'est le cas dans les maladies autoimmunes. En effet, dans le lupus érythémateux disséminé, la stimulation inappropriée de TLR7 et TLR9 par des ribonucléoprotéines et des complexes immuns constitués d'anticorps et d'ADN du soi participe au développement de la maladie (Leadbetter et al. 2002, Viglianti et al. 2003, Savarese et al. 2006).

Agonistes TLR : nouveaux agents thérapeutiques ?

Grâce à tous ces résultats, est-il envisageable d'utiliser ces agonistes TLR en thérapie ? Dans le cas du diabète, nous avons clairement démontré que ces produits étaient actifs en phase prédiabétique, c'est-à-dire avant l'apparition de la maladie. Néanmoins, des études s'intéressent à la caractérisation des gènes de prédisposition au diabète dans les familles à risque afin de permettre un diagnostic précoce. En effet, différents travaux menés chez des familles de diabétiques ont montré que certains haplotypes HLA étaient conservés chez les patients qui avaient un risque élevé de développer un diabète de type 1. Par ailleurs,

une étude est actuellement en cours sur le traitement de patients diabétiques par le peptide p277, dérivé de la molécule humaine hsp60 qui active les TLR. Cet essai clinique est actuellement en phase III et il a été montré que cette molécule est capable de réguler négativement l'auto-réactivité des cellules T et d'inhiber leur production de cytokines inflammatoires dans les îlots pancréatiques (Raz et al. 2001). Cet effet se traduit chez le patient par le maintien d'une production d'insuline et donc un besoin réduit d'un apport exogène d'hormone. Nous pourrions ainsi envisager de telles applications pour nos agonistes TLR.

Dans le cas de l'asthme, nos traitements intervenaient également avant l'apparition des symptômes et inhibaient la maladie. Il a cependant été montré que le R848 était également actif en phase chronique chez la souris (Camateros et al. 2007). Nous pourrions ainsi envisager une approche thérapeutique basée sur l'administration d'agonistes TLR, notamment au moment des crises, pour diminuer les réponses Th2 délétères. Néanmoins, l'administration précoce, avant l'apparition des symptômes pourrait peut-être permettre de réorienter la déficience du système immunitaire.

Ces récepteurs font déjà l'objet de différentes stratégies thérapeutiques. Par exemple, deux vaccins contre l'hépatite B contiennent des agonistes de TLR4 comme adjuvants de vaccination (Dupont et al. 2006, Halperin et al. 2006). Des recherches cliniques sont actuellement en cours dans le traitement du cancer, essentiellement par l'utilisation d'ODN CpG (Kanzler et al. 2007). Dans le cas des maladies allergiques, des agonistes de TLR4 et TLR9 ont été développés pour le traitement de la rhinite allergique (Creticos et al. 2006). De la même façon, l'administration d'ODN CpG dans les voies aériennes a montré une certaine efficacité dans la diminution des réponses de type Th2 (Gauvreau et al. 2006). Une autre approche est l'utilisation d'antagonistes TLR, notamment dans l'autoimmunité. En effet, tous les TLR sauf TLR5 et TLR10 sont capables de reconnaître des antigènes du soi produits par les tissus endommagés et les cellules apoptotiques. Ces agonistes endogènes pourraient donc agir comme des adjuvants pour stimuler les réponses des lymphocytes T et B autoréactifs et conduire à l'autoimmunité. Des antagonistes d'ODN CpG sont actuellement testés dans le modèle du lupus et ont déjà donné des résultats encourageants chez la souris.

Ces études n'en sont pour le moment qu'à leurs balbutiements mais il est envisageable que dans quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques soient mises en place.

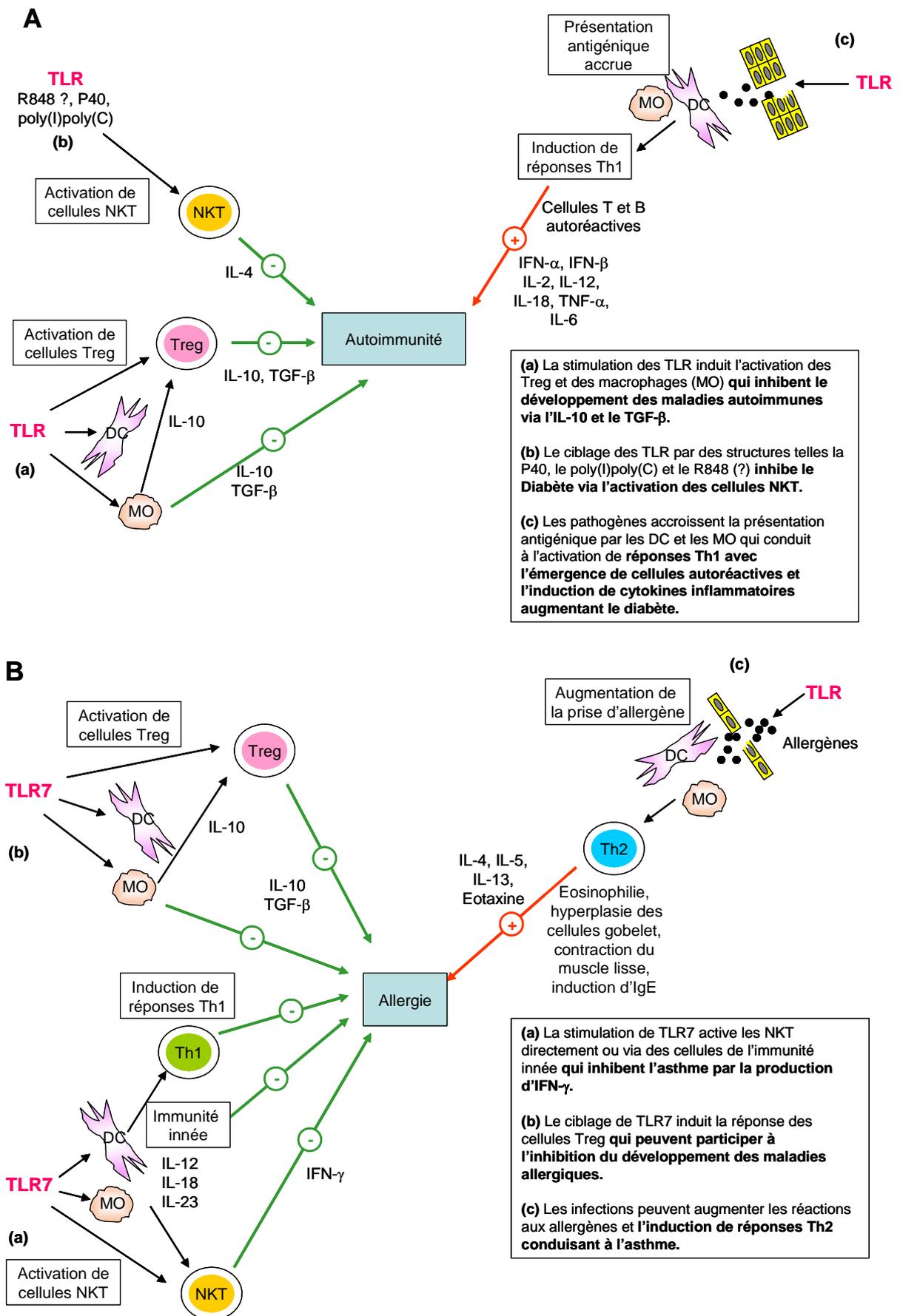


Figure 20 : Mécanismes potentiels de la modulation des réponses autoimmunes (A) et allergiques (B) par les TLR. Treg, lymphocytes T régulateurs ; DC, cellule dendritique ; MO, monocytes.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats apporte de nouvelles preuves du rôle immunomodulateur des TLR. Longtemps associés à une fonction inflammatoire, les TLR changent désormais de statut pour plus largement orienter les réponses immunes. Notre travail permet d'illustrer cette dualité. En effet, nos modèles d'étude à dominance Th1 ou Th2, respectivement diabète de type 1 et asthme allergique, nous ont permis de mettre en évidence les deux types de réponse.

Conformément à l'hypothèse de l'hygiène, nous avons démontré que la stimulation des voies TLR permettait de protéger contre des pathologies du système immunitaire. Cette action permettrait ainsi de rediriger des réponses anormales en « déviant » le système immunitaire vers une réponse anti-infectieuse. Bien que les mécanismes mis en jeu soient encore peu élucidés, on peut postuler que la stimulation TLR rétablisse une partie de la tolérance. Néanmoins, nos études restent valables dans des phases très précoces de la maladie où il est plus facile de contrer des réponses délétères naissantes.

Ces études nous ont également permis de mieux cerner les cibles cellulaires des TLR et de montrer un ciblage de nombreux types cellulaires dont des cellules régulatrices impliquées dans les mécanismes de surveillance immunitaire. Ainsi, en agissant sur ces cellules particulières, on peut activer des mécanismes suppresseurs contrant le fonctionnement anormal du système immunitaire.

L'ensemble de ces résultats fournit donc quelques nouveaux éléments dans la biologie des TLR et pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques.

PERSPECTIVES

Tout ce travail a permis de répondre à de nombreuses questions quant à la participation des TLR dans la modulation des réponses immunes, mais des interrogations demeurent.

Tous les agonistes TLR testés se sont avérés différents au niveau des mécanismes de protection. En effet, nous avons pu mettre en évidence que plusieurs agonistes TLR étaient capables d'activer des cellules T régulatrices mais n'avons pas pu le corrélérer à la protection *in vivo*. Ainsi, l'une des prochaines étapes serait d'étudier l'impact des TLR au sein de souris NOD déficientes pour cette population (CD28^{-/-}). Il serait également intéressant d'étudier le rôle des populations de l'immunité innée comme les macrophages ou les cellules dendritiques. Dans ce contexte, l'étude de souris déficientes pour MyD88 ou un TLR pourrait apporter des informations supplémentaires quant à ces mécanismes. En effet, des travaux menés dans le laboratoire sur des souris NOD déficientes pour MyD88 ont montré de manière surprenante que ces souris étaient totalement protégées du diabète et qu'elles présentaient un déficit en réponses Th1 et Th17. Ainsi, nous pourrions notamment étudier le rôle de l'IL-17 déjà décrit en autoimmunité, chez nos souris traitées.

Dans le modèle de l'asthme, nous avons démontré que le R848 exerçait son action protectrice en activant la production d'IFN- γ des lymphocytes NKT, mais on peut se demander si ce composé ne serait pas capable d'activer les lymphocytes Treg. Nous avons étudié cet effet *in vitro* et il serait intéressant de l'examiner dans l'asthme dans lequel les Treg sont impliqués. Tout ce travail a permis non seulement de démontrer le ciblage direct des cellules NKT par TLR7 mais également de proposer une nouvelle voie d'activation virale. En effet, la plupart des virus activant TLR7 sont aussi capables d'activer les NKT. Il serait donc intéressant de pouvoir faire le lien en testant des molécules provenant de ces virus à la fois *in vitro* et *in vivo*. Toutes ces études ont été effectuées chez la souris et nous souhaiterions pouvoir examiner ces réponses chez l'homme. Ainsi, des données préliminaires suggèrent que les NKT humains pourraient être activés par le R848 en présence d'IL-12 mais elles restent à confirmer.

Notre travail a ainsi permis d'évaluer l'impact des TLR dans des désordres immunitaires et a révélé la capacité de ces récepteurs à induire une protection à la fois dans des pathologies Th1 et Th2, soulignant leur rôle important mais complexe, car fonction de l'environnement, dans l'orientation des réactions immunologiques et le rééquilibrage de la balance Th1/Th2.

BIBLIOGRAPHIE

- Aaby, P., Shaheen, S. O., Heyes, C. B., Goudiaby, A., Hall, A. J., Shiell, A. W., Jensen, H., and Marchant, A. 2000. Early BCG vaccination and reduction in atopy in Guinea-Bissau. *Clin.Exp.Allergy*. **30**: 644-50.
- Abe, M. and Thomson, A. W. 2006. Dexamethasone preferentially suppresses plasmacytoid dendritic cell differentiation and enhances their apoptotic death. *Clin.Immunol*. **118**: 300-6.
- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., and Arditi, M. 2001. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J.Immunol*. **167**: 1609-16.
- Abu-Hadid, M. M., Lazarovits, A. I., and Madrenas, J. 2000. Prevention of diabetes mellitus in the non-obese diabetic mouse strain with monoclonal antibodies against the CD45RB molecule. *Autoimmunity*. **32**: 73-6.
- Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. 1998. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. **9**: 143-50.
- Ahmad-Nejad, P., Mrabet-Dahbi, S., Breuer, K., Klotz, M., Werfel, T., Herz, U., Heeg, K., Neumaier, M., and Renz, H. 2004. The toll-like receptor 2 R753Q polymorphism defines a subgroup of patients with atopic dermatitis having severe phenotype. *J.Allergy Clin.Immunol*. **113**: 565-7.
- Ahonen, C. L., Gibson, S. J., Smith, R. M., Pederson, L. K., Lindh, J. M., Tomai, M. A., and Vasilakos, J. P. 1999. Dendritic cell maturation and subsequent enhanced T-cell stimulation induced with the novel synthetic immune response modifier R-848. *Cell Immunol*. **197**: 62-72.
- Akashi, S., Shimazu, R., Ogata, H., Nagai, Y., Takeda, K., Kimoto, M., and Miyake, K. 2000. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol*. **164**: 3471-5.
- 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**: 582-8.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. **413**: 732-8.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. **285**: 736-9.
- Alm, J. S., Lilja, G., Pershagen, G., and Scheynius, A. 1998. BCG vaccination does not seem to prevent atopy in children with atopic heredity. *Allergy*. **53**: 537.

- Alm, J. S., Swartz, J., Lilja, G., Scheynius, A., and Pershagen, G. 1999. Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet*. **353**: 1485-8.
- Alyanakian, M. A., You, S., Damotte, D., Gouarin, C., Esling, A., Garcia, C., Havouis, S., Chatenoud, L., and Bach, J. F. 2003. Diversity of regulatory CD4+T cells controlling distinct organ-specific autoimmune diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 15806-11.
- Anderson, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr.Opin.Immunol.* **12**: 13-9.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Chen, Z., Berzins, S. P., Benoist, C., and Mathis, D. 2005. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. **23**: 227-39.
- Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. 2004. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**: 17264-9.
- Appelmelk, B. J., van Die, I., van Vliet, S. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Geijtenbeek, T. B., and van Kooyk, Y. 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J.Immunol.* **170**: 1635-9.
- Arbibe, L., Mira, J. P., Teusch, N., Kline, L., Guha, M., Mackman, N., Godowski, P. J., Ulevitch, R. J., and Knaus, U. G. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat.Immunol.* **1**: 533-40.
- Arbour, N. C., Lorenz, E., Schutte, B. C., Zabner, J., Kline, J. N., Jones, M., Frees, K., Watt, J. L., and Schwartz, D. A. 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat.Genet.* **25**: 187-91.
- Arruda, L. K., Sole, D., Baena-Cagnani, C. E., and Naspitz, C. K. 2005. Risk factors for asthma and atopy. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **5**: 153-9.
- Arshad, S. H., Kurukulaaratchy, R. J., Fenn, M., and Matthews, S. 2005. Early life risk factors for current wheeze, asthma, and bronchial hyperresponsiveness at 10 years of age. *Chest*. **127**: 502-8.
- Ashkar, A. A. and Rosenthal, K. L. 2003. Interleukin-15 and natural killer and NKT cells play a critical role in innate protection against genital herpes simplex virus type 2 infection. *J.Virol.* **77**: 10168-71.
- Bach, J. F. 2001. Immunotherapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Curr.Opin.Immunol.* **13**: 601-5.
- Bach, J. F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N.Engl.J.Med.* **347**: 911-20.
- Balasa, B., Krahl, T., Patstone, G., Lee, J., Tisch, R., McDevitt, H. O., and Sarvetnick, N. 1997. CD40 ligand-CD40 interactions are necessary for the initiation of insulinitis and diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **159**: 4620-7.

- Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., and Wright, A. L. 2000. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. *N.Engl.J.Med.* **343**: 538-43.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* **392**: 245-52.
- Barnes, P. J. 2003. Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**: 511-22.
- Barnes, P. J., Chung, K. F., and Page, C. P. 1998. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol.Rev.* **50**: 515-96.
- Barrat, F. J., Meeker, T., Gregorio, J., Chan, J. H., Uematsu, S., Akira, S., Chang, B., Duramad, O., and Coffman, R. L. 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J.Exp.Med.* **202**: 1131-9.
- Bashir, M. E., Louie, S., Shi, H. N., and Nagler-Anderson, C. 2004. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J.Immunol.* **172**: 6978-87.
- Baxter, A. G., Kinder, S. J., Hammond, K. J., Scollay, R., and Godfrey, D. I. 1997. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes.* **46**: 572-82.
- Bazil, V., Horejsi, V., Baudys, M., Kristofova, H., Strominger, J. L., Kostka, W., and Hilgert, I. 1986. Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur.J.Immunol.* **16**: 1583-9.
- Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D., and Bhardwaj, N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J.Clin.Invest.* **115**: 3265-75.
- Bell, J. K., Botos, I., Hall, P. R., Askins, J., Shiloach, J., Segal, D. M., and Davies, D. R. 2005. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**: 10976-80.
- Belvin, M. P. and Anderson, K. V. 1996. A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **12**: 393-416.
- Bendelac, A., Hunziker, R. D., and Lantz, O. 1996. Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J.Exp.Med.* **184**: 1285-93.
- Bendelac, A., Rivera, M. N., Park, S. H., and Roark, J. H. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu.Rev.Immunol.* **15**: 535-62.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. 2001. The immune

dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat.Genet.* **27**: 20-1.

Berry, M. A., Hargadon, B., Shelley, M., Parker, D., Shaw, D. E., Green, R. H., Bradding, P., Brightling, C. E., Wardlaw, A. J., and Pavord, I. D. 2006. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N.Engl.J.Med.* **354**: 697-708.

Berzins, S. P., Kyparissoudis, K., Pellicci, D. G., Hammond, K. J., Sidobre, S., Baxter, A., Smyth, M. J., Kronenberg, M., and Godfrey, D. I. 2004. Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies. *Immunol.Cell Biol.* **82**: 247-52.

Bilenki, L., Yang, J., Fan, Y., Wang, S., and Yang, X. 2004. Natural killer T cells contribute to airway eosinophilic inflammation induced by ragweed through enhanced IL-4 and eotaxin production. *Eur.J.Immunol.* **34**: 345-54.

Bishop, G. A., Hsing, Y., Hostager, B. S., Jalukar, S. V., Ramirez, L. M., and Tomai, M. A. 2000. Molecular mechanisms of B lymphocyte activation by the immune response modifier R-848. *J.Immunol.* **165**: 5552-7.

Bjorksten, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., and Mikelsaar, M. 2001. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J.Allergy Clin.Immunol.* **108**: 516-20.

Black, J. L. and Johnson, P. R. 2002. Factors controlling smooth muscle proliferation and airway remodelling. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **2**: 47-51.

Blasius, A. L., Cella, M., Maldonado, J., Takai, T., and Colonna, M. 2006. Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood.* **107**: 2474-6.

Bloemen, K., Verstraelen, S., Van Den, Heuvel R., Witters, H., Nelissen, I., and Schoeters, G. 2007. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. *Immunol.Lett.* **113**: 6-18.

Boitard, C., Yasunami, R., Dardenne, M., and Bach, J. F. 1989. T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice. *J.Exp.Med.* **169**: 1669-80.

Bosisio, D., Polentarutti, N., Sironi, M., Bernasconi, S., Miyake, K., Webb, G. R., Martin, M. U., Mantovani, A., and Muzio, M. 2002. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood.* **99**: 3427-31.

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**: 1277-84.

Braga, E. G., Ananias, R. Z., Mussalem, J. S., Squaiella, C. C., Longhini, A. L., Mariano, M., Travassos, L. R., and Longo-Maugeri, I. M. 2003. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. *Immunol.Lett.* **88**: 163-9.

Braun-Fahrlander, C., Gassner, M., Grize, L., Neu, U., Sennhauser, F. H., Varonier, H. S., Vuille, J. C., and Wuthrich, 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*. **29**: 28-34.
- Braun-Fahrlander, C., Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufer, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., and von Mutius, E. 2002. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *N.Engl.J.Med.* **347**: 869-77.
- Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Bleharski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. **285**: 732-6.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E., and Brenner, M. B. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat.Immunol.* **4**: 1230-7.
- Brugnolo, F., Sampognaro, S., Liotta, F., Cosmi, L., Annunziato, F., Manuelli, C., Campi, P., Maggi, E., Romagnani, S., and Parronchi, P. 2003. The novel synthetic immune response modifier R-848 (Resiquimod) shifts human allergen-specific CD4+ TH2 lymphocytes into IFN-gamma-producing cells. *J.Allergy Clin.Immunol.* **111**: 380-8.
- Bryan, S. A., O'Connor, B. J., Matti, S., Leckie, M. J., Kanabar, V., Khan, J., Warrington, S. J., Renzetti, L., Rames, A., Bock, J. A., Boyce, M. J., Hansel, T. T., Holgate, S. T., and Barnes, P. J. 2000. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. **356**: 2149-53.
- Burns, K., Clatworthy, J., Martin, L., Martinon, F., Plumpton, C., Maschera, B., Lewis, A., Ray, K., Tschopp, J., and Volpe, F. 2000. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat.Cell Biol.* **2**: 346-51.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R., and Tschopp, J. 2003. Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J.Exp.Med.* **197**: 263-8.
- Byrd-Leifer, C. A., Block, E. F., Takeda, K., Akira, S., and Ding, A. 2001. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur.J.Immunol.* **31**: 2448-57.
- Calcinaro, F., Dionisi, S., Marinaro, M., Candeloro, P., Bonato, V., Marzotti, S., Corneli, R. B., Ferretti, E., Gulino, A., Grasso, F., De Simone, C., Di Mario, U., Falorni, A., Boirivant, M., and Dotta, F. 2005. Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia*. **48**: 1565-75.
- Camateros, P., Tamaoka, M., Hassan, M., Marino, R., Moisan, J., Marion, D., Guiot, M. C., Martin, J. G., and Radzioch, D. 2007. Chronic asthma-induced airway remodeling is prevented by toll-like receptor-7/8 ligand S28463. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **175**: 1241-9.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L., and Figdor, C. G. 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **33**: 532-8.

- Cameron, M. J., Arreaza, G. A., Waldhauser, L., Gauldie, J., and Delovitch, T. L. 2000a. Immunotherapy of spontaneous type 1 diabetes in nonobese diabetic mice by systemic interleukin-4 treatment employing adenovirus vector-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **7**: 1840-6.
- Cameron, M. J., Strathdee, C. A., Holmes, K. D., Arreaza, G. A., Dekaban, G. A., and Delovitch, T. L. 2000b. Biolistic-mediated interleukin 4 gene transfer prevents the onset of type 1 diabetes. *Hum. Gene Ther.* **11**: 1647-56.
- Campbell, I. L., Wong, G. H., Schrader, J. W., and Harrison, L. C. 1985. Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. *Diabetes.* **34**: 1205-9.
- Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., and Gazzinelli, R. T. 2001. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* **167**: 416-23.
- Cao, W., Rosen, D. B., Ito, T., Bover, L., Bao, M., Watanabe, G., Yao, Z., Zhang, L., Lanier, L. L., and Liu, Y. J. 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-Fc epsilonRI gamma inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *J. Exp. Med.* **203**: 1399-405.
- Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M., and Demengeot, J. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**: 403-11.
- Carnaud, C., Gombert, J., Donnars, O., Garchon, H., and Herbelin, A. 2001. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J. Immunol.* **166**: 2404-11.
- Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., and Springer, T. A. 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3652-6.
- Carroll, M. C. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **5**: 981-6.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., and Bowie, A. G. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat. Immunol.* **7**: 1074-81.
- Cembrzynska-Nowak, M., Szklarz, E., Ingot, A. D., and Teodorczyk-Injeyan, J. A. 1993. Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **147**: 291-5.
- Chae, J. J., Komarow, H. D., Cheng, J., Wood, G., Raben, N., Liu, P. P., and Kastner, D. L. 2003. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol. Cell.* **11**: 591-604.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez,

- G., and Inohara, N. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat.Immunol.* **4**: 702-7.
- Chang, Y. and Prud'homme, G. J. 1999. Intramuscular administration of expression plasmids encoding interferon-gamma receptor/IgG1 or IL-4/IgG1 chimeric proteins protects from autoimmunity. *J.Gene Med.* **1**: 415-23.
- Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J., and Bach, J. F. 1994. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**: 123-7.
- Choe, J., Kelker, M. S., and Wilson, I. A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science.* **309**: 581-5.
- Christensen, S. R., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. A., and Shlomchik, M. J. 2006. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity.* **25**: 417-28.
- Chuang, T. H. and Ulevitch, R. J. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur.Cytokine Netw.* **11**: 372-8.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., and Akira, S. 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J.Exp.Med.* **201**: 19-25.
- Cohn, M. 2005. The common sense of the self-nonsel self discrimination. *Springer Semin.Immunopathol.* **27**: 3-17.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O. M., Corbi, A. L., and Rivas, L. 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for Leishmania amastigotes. *J.Biol.Chem.* **277**: 36766-9.
- Colonna, M., Trinchieri, G., and Liu, Y. J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat.Immunol.* **5**: 1219-26.
- Cooke, A., Tonks, P., Jones, F. M., O'Shea, H., Hutchings, P., Fulford, A. J., and Dunne, D. W. 1999. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* **21**: 169-76.
- Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature.* **402**: B5-11.
- Corbett, J. A., Sweetland, M. A., Lancaster, J. R., Jr., and McDaniel, M. L. 1993. A 1-hour pulse with IL-1 beta induces formation of nitric oxide and inhibits insulin secretion by rat islets of Langerhans: evidence for a tyrosine kinase signaling mechanism. *FASEB J.* **7**: 369-74.
- Cornelie, S., Hoebeke, J., Schacht, A. M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M., and Riveau, G. 2004. Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by specific cytosine-phosphate-guanine motif recognition. *J.Biol.Chem.* **279**: 15124-9.

- Corrigan, C. J. and Kay, A. B. 1990. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am.Rev.Respir.Dis.* **141**: 970-7.
- Corry, D. B. and Kheradmand, F. 1999. Induction and regulation of the IgE response. *Nature.* **402**: B18-B23.
- Couillault, C., Pujol, N., Reboul, J., Sabatier, L., Guichou, J. F., Kohara, Y., and Ewbank, J. J. 2004. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat.Immunol.* **5**: 488-94.
- Craighead, J. E. and McLane, M. F. 1968. Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus. *Science.* **162**: 913-4.
- 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. 2006. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N.Engl.J.Med.* **355**: 1445-55.
- Curotto de Lafaille, M. A., Muriglan, S., Sunshine, M. J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G. C., Wensky, A. K., Olivares-Villagomez, D., and Lafaille, J. J. 2001. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **194**: 1349-59.
- Curtis, B. M., Scharnowske, S., and Watson, A. J. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**: 8356-60.
- Cusson-Hermance, N., Khurana, S., Lee, T. H., Fitzgerald, K. A., and Kelliher, M. A. 2005. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- κ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J.Biol.Chem.* **280**: 36560-6.
- da Silva, Correia J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. 2001. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J.Biol.Chem.* **276**: 21129-35.
- Dahl, M. E., Dabbagh, K., Liggitt, D., Kim, S., and Lewis, D. B. 2004. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat.Immunol.* **5**: 337-43.
- Dardenne, M., Lepault, F., Bendelac, A., and Bach, J. F. 1989. Acceleration of the onset of diabetes in NOD mice by thymectomy at weaning. *Eur.J.Immunol.* **19**: 889-95.
- Debray-Sachs, M., Carnaud, C., Boitard, C., Cohen, H., Gresser, I., Bedossa, P., and Bach, J. F. 1991. Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma. *J.Autoimmun.* **4**: 237-48.
- Delovitch, T. L. and Singh, B. 1997. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity.* **7**: 727-38.

- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. 2000. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. **103**: 351-61.
- Devendra, D., Jasinski, J., Melanitou, E., Nakayama, M., Li, M., Hensley, B., Paronen, J., Moriyama, H., Miao, D., Eisenbarth, G. S., and Liu, E. 2005. Interferon-alpha as a mediator of polyinosinic:polycytidylic acid-induced type 1 diabetes. *Diabetes*. **54**: 2549-56.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa. 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. **303**: 1529-31.
- Diebold, S. S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L. E., Al Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., and Reis e Sousa. 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*. **424**: 324-8.
- Doucet, C., Brouty-Boye, D., Pottin-Clemenceau, C., Canonica, G. W., Jasmin, C., and Azzarone, B. 1998. Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J.Clin.Invest*. **101**: 2129-39.
- Droste, J. H., Wieringa, M. H., Weyler, J. J., Nelen, V. J., Vermeire, P. A., and Van Bever, H. P. 2000. Does the use of antibiotics in early childhood increase the risk of asthma and allergic disease? *Clin.Exp.Allergy*. **30**: 1547-53.
- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., and Beutler, B. 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur.Cytokine Netw*. **11**: 362-71.
- Dunstan, S. J., Hawn, T. R., Hue, N. T., Parry, C. P., Ho, V. A., Vinh, H., Diep, T. S., House, D., Wain, J., Aderem, A., Hien, T. T., and Farrar, J. J. 2005. Host susceptibility and clinical outcomes in toll-like receptor 5-deficient patients with typhoid fever in Vietnam. *J.Infect.Dis*. **191**: 1068-71.
- Dupont, J., Altclas, J., Lepetic, A., Lombardo, M., Vazquez, V., Salgueira, C., Seigelchifer, M., Arndtz, N., Antunez, E., von Eschen, K., and Janowicz, Z. 2006. A controlled clinical trial comparing the safety and immunogenicity of a new adjuvanted hepatitis B vaccine with a standard hepatitis B vaccine. *Vaccine*. **24**: 7167-74.
- Duthie, M. S., Wleklinski-Lee, M., Smith, S., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Kahn, S. J. 2002. During *Trypanosoma cruzi* infection CD1d-restricted NK T cells limit parasitemia and augment the antibody response to a glycoposphoinositol-modified surface protein. *Infect.Immun*. **70**: 36-48.
- Dybdahl, B., Wahba, A., Lien, E., Flo, T. H., Waage, A., Qureshi, N., Sellevold, O. F., Espevik, T., and Sundan, A. 2002. Inflammatory response after open heart surgery: release of heat-shock protein 70 and signaling through toll-like receptor-4. *Circulation*. **105**: 685-90.
- Dzionic, A., Sohma, Y., Nagafune, J., Cella, M., Colonna, M., Facchetti, F., Gunther, G., Johnston, I., Lanzavecchia, A., Nagasaka, T., Okada, T., Vermi, W., Winkels, G., Yamamoto, T., Zysk, M., Yamaguchi, Y., and Schmitz, J. 2001. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J.Exp.Med*. **194**: 1823-34.

- Eaves-Pyles, T. D., Wong, H. R., Odoms, K., and Pyles, R. B. 2001. Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J.Immunol.* **167**: 7009-16.
- Eder, W. and von Mutius, E. 2004. Hygiene hypothesis and endotoxin: what is the evidence? *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* **4**: 113-7.
- Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T. L., Aderem, A., and Ravetch, J. V. 2006. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J.Exp.Med.* **203**: 553-61.
- 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**: 1645-51.
- Elias, D., Reshef, T., Birk, O. S., van der, Zee R., Walker, M. D., and Cohen, I. R. 1991. Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 65-kDa heat shock protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**: 3088-91.
- Engstrom, Y., Kadalayil, L., Sun, S. C., Samakovlis, C., Hultmark, D., and Faye, I. 1993. kappa B-like motifs regulate the induction of immune genes in Drosophila. *J.Mol.Biol.* **232**: 327-33.
- Fageras, Bottcher M., Hmani-Aifa, M., Lindstrom, A., Jenmalm, M. C., Mai, X. M., Nilsson, L., Zdolsek, H. A., Bjorksten, B., Soderkvist, P., and Vaarala, O. 2004. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J.Allergy Clin.Immunol.* **114**: 561-7.
- Falcone, M., Yeung, B., Tucker, L., Rodriguez, E., and Sarvetnick, N. 1999. A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus. *J.Exp.Med.* **190**: 963-72.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., and Neurath, M. F. 2004. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J.Immunol.* **172**: 5149-53.
- Ferrero, E., Hsieh, C. L., Francke, U., and Goyert, S. M. 1990. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. *J.Immunol.* **145**: 331-6.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., de Jong, D. J., Langenberg, D. M., van Crevel, R., Adema, G. J., Ottenhoff, T. H., Van der Meer, J. W., and Netea, M. G. 2005. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS.Pathog.* **1**: 279-85.
- Figdor, C. G., van Kooyk, Y., and Adema, G. J. 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat.Rev.Immunol.* **2**: 77-84.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A., and O'Neill, L. A. 2001. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.* **413**: 78-83.

- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M., and Golenbock, D. T. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J.Exp.Med.* **198**: 1043-55.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. 2003a. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* **4**: 330-6.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. 2003b. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* **4**: 330-6.
- Fuchs, A., Cella, M., Kondo, T., and Colonna, M. 2005. Paradoxical inhibition of human natural interferon-producing cells by the activating receptor NKp44. *Blood.* **106**: 2076-82.
- Fujihira, K., Nagata, M., Moriyama, H., Yasuda, H., Arisawa, K., Nakayama, M., Maeda, S., Kasuga, M., Okumura, K., Yagita, H., and Yokono, K. 2000. Suppression and acceleration of autoimmune diabetes by neutralization of endogenous interleukin-12 in NOD mice. *Diabetes.* **49**: 1998-2006.
- Fujiwara, D., Inoue, S., Wakabayashi, H., and Fujii, T. 2004. The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **135**: 205-15.
- Gardner, J. P., Durso, R. J., Arrigale, R. R., Donovan, G. P., Maddon, P. J., Dragic, T., and Olson, W. C. 2003. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 4498-503.
- Garlanda, C., Hirsch, E., Bozza, S., Salustri, A., De Acetis, M., Nota, R., Maccagno, A., Riva, F., Bottazzi, B., Peri, G., Doni, A., Vago, L., Botto, M., De Santis, R., Carminati, P., Siracusa, G., Altruda, F., Vecchi, A., Romani, L., and Mantovani, A. 2002. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature.* **420**: 182-6.
- Gauvreau, G. M., Hessel, E. M., Boulet, L. P., Coffman, R. L., and O'Byrne, P. M. 2006. Immunostimulatory sequences regulate interferon-inducible genes but not allergic airway responses. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **174**: 15-20.
- Gavett, S. H., Chen, X., Finkelman, F., and Wills-Karp, M. 1994. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **10**: 587-93.
- Gavett, S. H., O'Hearn, D. J., Li, X., Huang, S. K., Finkelman, F. D., and Wills-Karp, M. 1995. Interleukin 12 inhibits antigen-induced airway hyperresponsiveness, inflammation, and Th2 cytokine expression in mice. *J.Exp.Med.* **182**: 1527-36.
- Gay, N. J. and Gangloff, M. 2007. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu.Rev.Biochem.* **76**: 141-65.
- Gay, N. J., Gangloff, M., and Weber, A. N. 2006. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat.Rev.Immunol.* **6**: 693-8.
- Geijtenbeek, T. B., Kwon, D. S., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Middel, J., Cornelissen, I. L., Nottet, H. S., KewalRamani, V. N., Littman, D. R., Figdor, C.

- G., and van Kooyk, Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. **100**: 587-97.
- Gerhold, K., Bluemchen, K., Franke, A., Stock, P., and Hamelmann, E. 2003. Exposure to endotoxin and allergen in early life and its effect on allergen sensitization in mice. *J.Allergy Clin.Immunol.* **112**: 389-96.
- Gerhold, K., Blumchen, K., Bock, A., Seib, C., Stock, P., Kallinich, T., Lohning, M., Wahn, U., and Hamelmann, E. 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**: 110-6.
- Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L. 2001. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J.Immunol.* **167**: 1882-5.
- Gharaee-Kermani, M., Denholm, E. M., and Phan, S. H. 1996. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J.Biol.Chem.* **271**: 17779-84.
- Gibson, P. G., Simpson, J. L., and Saltos, N. 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest*. **119**: 1329-36.
- Girard, R., Pedron, T., Uematsu, S., Balloy, V., Chignard, M., Akira, S., and Chaby, R. 2003. Lipopolysaccharides from Legionella and Rhizobium stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J.Cell Sci.* **116**: 293-302.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. 2003a. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. **300**: 1584-7.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. 2003b. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J.Biol.Chem.* **278**: 8869-72.
- Girardin, S. E., Tournebize, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep.* **2**: 736-42.
- Godfrey, D. I., Kinder, S. J., Silvera, P., and Baxter, A. G. 1997. Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in alphabetaTCR+CD8-thymocytes. *J.Autoimmun.* **10**: 279-85.
- Gombert, J. M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C., and Bach, J. F. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur.J.Immunol.* **26**: 2989-98.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. 2000. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol.Cell.* **5**: 1003-11.

- Goodman, M. G. 1995. A new approach to vaccine adjuvants. Immunopotential by intracellular T-helper-like signals transmitted by loxoribine. *Pharm.Biotechnol.* **6**: 581-609.
- Gottenberg, J. E., Cagnard, N., Lucchesi, C., Letourneur, F., Mistou, S., Lazure, T., Jacques, S., Ba, N., Ittah, M., Lepajolec, C., Labetoulle, M., Ardizzone, M., Sibia, J., Fournier, C., Chiocchia, G., and Mariette, X. 2006. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjogren's syndrome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 2770-5.
- Gray, P., Dunne, A., Brikos, C., Jefferies, C. A., Doyle, S. L., and O'Neill, L. A. 2006. MyD88 adapter-like (Mal) is phosphorylated by Bruton's tyrosine kinase during TLR2 and TLR4 signal transduction. *J.Biol.Chem.* **281**: 10489-95.
- Greenberg, S. A., Pinkus, J. L., Pinkus, G. S., Bursleson, T., Sanoudou, D., Tawil, R., Barohn, R. J., Saperstein, D. S., Briemberg, H. R., Ericsson, M., Park, P., and Amato, A. A. 2005. Interferon-alpha/beta-mediated innate immune mechanisms in dermatomyositis. *Ann.Neurol.* **57**: 664-78.
- Grenier, J. M., Wang, L., Manji, G. A., Huang, W. J., Al Garawi, A., Kelly, R., Carlson, A., Merriam, S., Lora, J. M., Briskin, M., DiStefano, P. S., and Bertin, J. 2002. Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. *FEBS Lett.* **530**: 73-8.
- Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G., and Speck, P. G. 2003. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J.Immunol.* **170**: 1430-4.
- Hachem, P., Lisbonne, M., Michel, M. L., Diem, S., Roongapinun, S., Lefort, J., Marchal, G., Herbelin, A., Askenase, P. W., Dy, M., and Leite-De-Moraes, M. C. 2005. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur.J.Immunol.* **35**: 2793-802.
- Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G., Mann, M., and Karin, M. 2006. Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature.* **439**: 204-7.
- Hadeiba, H. and Locksley, R. M. 2003. Lung CD25 CD4 regulatory T cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J.Immunol.* **170**: 5502-10.
- Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J., and Wilson, C. B. 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J.Immunol.* **166**: 15-9.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H., Messerle, M., Delaunay, T., Houles, C., Fieschi, F., Arenzana-Seisdedos, F., Moreau, J. F., and Dechanet-Merville, J. 2002. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* **17**: 653-64.
- Haller, O., Kochs, G., and Weber, F. 2006. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* **344**: 119-30.

- Halperin, S. A., Tapiero, B., Law, B., Diaz-Mitoma, F., Duval, B., Langley, J. M., Elrick, D. B., and Jacquet, J. M. 2006. Interchangeability of two diphtheria and tetanus toxoids, acellular pertussis, inactivated poliovirus, Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines as a fourth dose in 15-20-month-old toddlers. *Vaccine*. **24**: 4017-23.
- Hamerman, J. A., Tchao, N. K., Lowell, C. A., and Lanier, L. L. 2005. Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12. *Nat.Immunol.* **6**: 579-86.
- Hammond, K. J., Poulton, L. D., Palmisano, L. J., Silveira, P. A., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. 1998. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J.Exp.Med.* **187**: 1047-56.
- Han, X., Fan, Y., Wang, S., Yang, J., Bilenki, L., Qiu, H., Jiao, L., and Yang, X. 2004. Dendritic cells from Chlamydia-infected mice show altered Toll-like receptor expression and play a crucial role in inhibition of allergic responses to ovalbumin. *Eur.J.Immunol.* **34**: 981-9.
- Hansen, G., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. 1999. Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J.Clin.Invest.* **103**: 175-83.
- Harada, M., Kishimoto, Y., and Makino, S. 1990. Prevention of overt diabetes and insulinitis in NOD mice by a single BCG vaccination. *Diabetes Res.Clin.Pract.* **8**: 85-9.
- Hardy, M. P., Owczarek, C. M., Jermiin, L. S., Ejdeback, M., and Hertzog, P. J. 2004. Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*. **84**: 331-45.
- Hart, O. M., Athie-Morales, V., O'Connor, G. M., and Gardiner, C. M. 2005. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J.Immunol.* **175**: 1636-42.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*. **52**: 269-79.
- Hawn, T. R., Verbon, A., Janer, M., Zhao, L. P., Beutler, B., and Aderem, A. 2005. Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**: 2487-9.
- Hawn, T. R., Verbon, A., Lettinga, K. D., Zhao, L. P., Li, S. S., Laws, R. J., Skerrett, S. J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K. D., and Aderem, A. 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J.Exp.Med.* **198**: 1563-72.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. **410**: 1099-103.
- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., and Bauer, S. 2003. The Toll-like receptor

- 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur.J.Immunol.* **33**: 2987-97.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. **303**: 1526-9.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat.Immunol.* **3**: 196-200.
- 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**: 740-5.
- Herbelin, A., Gombert, J. M., Lepault, F., Bach, J. F., and Chatenoud, L. 1998. Mature mainstream TCR alpha beta+CD4+ thymocytes expressing L-selectin mediate "active tolerance" in the nonobese diabetic mouse. *J.Immunol.* **161**: 2620-8.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., and Vogel, S. N. 2001. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* **69**: 1477-82.
- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*. **424**: 743-8.
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A., and Kolodner, R. D. 2001. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat.Genet.* **29**: 301-5.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*. **284**: 1313-8.
- Hofstra, C. L., Van, Ark, I, Hofman, G., Kool, M., Nijkamp, F. P., and Van Oosterhout, A. J. 1998. Prevention of Th2-like cell responses by coadministration of IL-12 and IL-18 is associated with inhibition of antigen-induced airway hyperresponsiveness, eosinophilia, and serum IgE levels. *J.Immunol.* **161**: 5054-60.
- Holt, P. G. 2000. Antigen presentation in the lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **162**: S151-S156.
- Honda, K., Sakaguchi, S., Nakajima, C., Watanabe, A., Yanai, H., Matsumoto, M., Ohteki, T., Kaisho, T., Takaoka, A., Akira, S., Seya, T., and Taniguchi, T. 2003. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced by double-stranded RNA or viral infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **100**: 10872-7.
- Hong, S., Wilson, M. T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O. V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D. C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y., and Van Kaer, L. 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat.Med.* **7**: 1052-6.

- Hopfenspirger, M. T. and Agrawal, D. K. 2002. Airway hyperresponsiveness, late allergic response, and eosinophilia are reversed with mycobacterial antigens in ovalbumin-prensensitized mice. *J.Immunol.* **168**: 2516-22.
- Horner, A. A., Van Uden, J. H., Zubeldia, J. M., Broide, D., and Raz, E. 2001. DNA-based immunotherapeutics for the treatment of allergic disease. *Immunol.Rev.* **179**: 102-18.
- Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., and Medzhitov, R. 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature.* **420**: 329-33.
- Hornig, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. 2001. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat.Immunol.* **2**: 835-41.
- Hornung, V., Schlender, J., Guenther-Biller, M., Rothenfusser, S., Endres, S., Conzelmann, K. K., and Hartmann, G. 2004. Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J.Immunol.* **173**: 5935-43.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* **162**: 3749-52.
- Hsieh, C. S., Liang, Y., Tyznik, A. J., Self, S. G., Liggitt, D., and Rudensky, A. Y. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity.* **21**: 267-77.
- Hu, X., Bies, J., and Wolff, L. 2005. Interferon beta increases c-Myc proteolysis in mouse monocyte/macrophage leukemia cells. *Leuk.Res.* **29**: 1307-14.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. 2001. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science.* **294**: 870-5.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* **411**: 599-603.
- Hultgren, B., Huang, X., Dybdal, N., and Stewart, T. A. 1996. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes.* **45**: 812-7.
- Hultmark, D. 1994. Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **199**: 144-6.
- Hutchings, P. R. and Cooke, A. 1990. The transfer of autoimmune diabetes in NOD mice can be inhibited or accelerated by distinct cell populations present in normal splenocytes taken from young males. *J.Autoimmun.* **3**: 175-85.
- Hysi, P., Kabesch, M., Moffatt, M. F., Schedel, M., Carr, D., Zhang, Y., Boardman, B., von Mutius, E., Weiland, S. K., Leupold, W., Fritsch, C., Klopp, N., Musk, A. W., James, A., Nunez, G., Inohara, N., and Cookson, W. O. 2005. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum.Mol.Genet.* **14**: 935-41.

- Iacopino, F., Ferrandina, G., Scambia, G., Benedetti-Panici, P., Mancuso, S., and Sica, G. 1996. Interferons inhibit EGF-stimulated cell growth and reduce EGF binding in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* **16**: 1919-24.
- Ignotz, R. A. and Massague, J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J.Biol.Chem.* **261**: 4337-45.
- Imler, J. L. and Hoffmann, J. A. 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of Drosophila. *Curr.Opin.Microbiol.* **3**: 16-22.
- Innes, R. W. 2004. Guarding the goods. New insights into the central alarm system of plants. *Plant Physiol.* **135**: 695-701.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. 1999. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J.Biol.Chem.* **274**: 14560-7.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., and Nunez, G. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J.Biol.Chem.* **278**: 5509-12.
- Ishikawa, H., Hisaeda, H., Taniguchi, M., Nakayama, T., Sakai, T., Maekawa, Y., Nakano, Y., Zhang, M., Zhang, T., Nishitani, M., Takashima, M., and Himeno, K. 2000. CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with Leishmania major. *Int.Immunol.* **12**: 1267-74.
- Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W., and Liu, Y. J. 2006. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood.* **107**: 2423-31.
- Jaffar, Z., Sivakuru, T., and Roberts, K. 2004. CD4+CD25+ T cells regulate airway eosinophilic inflammation by modulating the Th2 cell phenotype. *J.Immunol.* **172**: 3842-9.
- Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **54 Pt 1**: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 7461-8.
- Janeway, C. A., Jr., Goodnow, C. C., and Medzhitov, R. 1996. Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Curr.Biol.* **6**: 519-22.
- Janssens, S., Burns, K., Tschopp, J., and Beyaert, R. 2002. Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr.Biol.* **12**: 467-71.
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J. F., Thieblemont, N., Bonnefoy, J. Y., and Delneste, Y. 2002. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine.* **20 Suppl 4**: A23-A27.

- Jiang, D., Liang, J., Fan, J., Yu, S., Chen, S., Luo, Y., Prestwich, G. D., Mascarenhas, M. M., Garg, H. G., Quinn, D. A., Homer, R. J., Goldstein, D. R., Bucala, R., Lee, P. J., Medzhitov, R., and Noble, P. W. 2005. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat.Med.* **11**: 1173-9.
- Jiang, Q., Akashi, S., Miyake, K., and Petty, H. R. 2000. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J.Immunol.* **165**: 3541-4.
- Jiang, Z., Johnson, H. J., Nie, H., Qin, J., Bird, T. A., and Li, X. 2003. Pellino 1 is required for interleukin-1 (IL-1)-mediated signaling through its interaction with the IL-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4)-IRAK-tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) complex. *J.Biol.Chem.* **278**: 10952-6.
- Jin, S. X., Yin, K. S., Bian, T., and Sun, P. L. 2006. Imiquimod attenuates airway inflammation and decreases the expression of thymus and activation regulated chemokine in allergic asthmatic mice. *Chin Med.J.(Engl.)*. **119**: 412-6.
- Jones, D. A. and Takemoto, D. 2004. Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr.Opin.Immunol.* **16**: 48-62.
- Jones, T. 2003. Resiquimod 3M. *Curr.Opin.Investig.Drugs.* **4**: 214-8.
- Juan, T. S., Kelley, M. J., Johnson, D. A., Busse, L. A., Hailman, E., Wright, S. D., and Lichenstein, H. S. 1995. Soluble CD14 truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enables cellular response to LPS. *J.Biol.Chem.* **270**: 1382-7.
- Kagan, J. C. and Medzhitov, R. 2006. Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling. *Cell.* **125**: 943-55.
- Kaisho, T. and Akira, S. 2004. Pleiotropic function of Toll-like receptors. *Microbes.Infect.* **6**: 1388-94.
- Kang, A. D., Park, G., Kim, Y. H., and Oh, I. H. 2004. Differential modulation of Myb family genes by Ets-2. *Oncogene.* **23**: 4177-81.
- Kanto, T. and Hayashi, N. 2006. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern.Med.* **45**: 183-91.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M., and Coffman, R. L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat.Med.* **13**: 552-9.
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. 2005. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity.* **23**: 165-75.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. 2005. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* **23**: 19-28.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* **11**: 115-22.

- Kawai, T. and Akira, S. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nat.Immunol.* **7**: 131-7.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., Takeuchi, O., and Akira, S. 2004. Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat.Immunol.* **5**: 1061-8.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. 2005. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat.Immunol.* **6**: 981-8.
- Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M., and Saito, A. 2001. Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J.Immunol.* **167**: 6525-32.
- Kay, A. B. 2003. Immunomodulation in asthma: mechanisms and possible pitfalls. *Curr.Opin.Pharmacol.* **3**: 220-6.
- Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. 2005. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J.Exp.Med.* **202**: 1539-47.
- Khattari, R., Cox, T., Yasayko, S. A., and Ramsdell, F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat.Immunol.* **4**: 337-42.
- Khor, C. C., Chapman, S. J., Vannberg, F. O., Dunne, A., Murphy, C., Ling, E. Y., Frodsham, A. J., Walley, A. J., Kyrieleis, O., Khan, A., Aucan, C., Segal, S., Moore, C. E., Knox, K., Campbell, S. J., Lienhardt, C., Scott, A., Aaby, P., Sow, O. Y., Grignani, R. T., Sillah, J., Sirugo, G., Peshu, N., Williams, T. N., Maitland, K., Davies, R. J., Kwiatkowski, D. P., Day, N. P., Yala, D., Crook, D. W., Marsh, K., Berkley, J. A., O'Neill, L. A., and Hill, A. V. 2007. A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. *Nat.Genet.* **39**: 523-8.
- Kim, H. S., Han, M. S., Chung, K. W., Kim, S., Kim, E., Kim, M. J., Jang, E., Lee, H. A., Youn, J., Akira, S., and Lee, M. S. 2007. Toll-like receptor 2 senses beta-cell death and contributes to the initiation of autoimmune diabetes. *Immunity.* **27**: 321-33.
- Kim, J. G., Lee, S. J., and Kagnoff, M. F. 2004a. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect.Immun.* **72**: 1487-95.
- Kim, Y. S., Kwon, K. S., Kim, D. K., Choi, I. W., and Lee, H. K. 2004b. Inhibition of murine allergic airway disease by Bordetella pertussis. *Immunology.* **112**: 624-30.
- Kinjo, Y., Tupin, E., Wu, D., Fujio, M., Garcia-Navarro, R., Benhnia, M. R., Zajonc, D. M., Ben Menachem, G., Ainge, G. D., Painter, G. F., Khurana, A., Hoebe, K., Behar, S. M., Beutler, B., Wilson, I. A., Tsuji, M., Sellati, T. J., Wong, C. H., and Kronenberg, M. 2006. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat.Immunol.* **7**: 978-86.

- Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G. W., Poles, M. A., Ho, D. D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C. H., and Kronenberg, M. 2005. Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature*. **434**: 520-5.
- Kips, J. C., O'Connor, B. J., Langley, S. J., Woodcock, A., Kerstjens, H. A., Postma, D. S., Danzig, M., Cuss, F., and Pauwels, R. A. 2003. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study. *Am.J.Respir.Crit Care Med*. **167**: 1655-9.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*. **416**: 194-9.
- Koski, G. K., Kariko, K., Xu, S., Weissman, D., Cohen, P. A., and Czerniecki, B. J. 2004. Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J.Immunol*. **172**: 3989-93.
- Koyasu, S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nat.Immunol*. **4**: 313-9.
- Kraal, G., van der Laan, L. J., Elomaa, O., and Tryggvason, K. 2000. The macrophage receptor MARCO. *Microbes.Infect*. **2**: 313-6.
- Krieger, M. 1997. The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense. *Curr.Opin.Lipidol*. **8**: 275-80.
- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity*. **21**: 107-19.
- Kufer, T. A., Fritz, J. H., and Philpott, D. J. 2005. NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol*. **13**: 381-8.
- Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., Ten, S., Sanz, M., Exley, M., Wilson, B., Porcelli, S., and Maclaren, N. 2002. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J.Clin.Invest*. **109**: 131-40.
- Kumar, A. and Yu, F. S. 2006. Toll-like receptors and corneal innate immunity. *Curr.Mol.Med*. **6**: 327-37.
- Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S. W., and Bockenstedt, L. K. 2000. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J.Immunol*. **165**: 4797-801.
- Kurukulaaratchy, R. J., Matthews, S., and Arshad, S. H. 2005. Defining childhood atopic phenotypes to investigate the association of atopic sensitization with allergic disease. *Allergy*. **60**: 1280-6.
- Laloux, V., Beaudoin, L., Jeske, D., Carnaud, C., and Lehuen, A. 2001. NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is

associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J.Immunol.* **166**: 3749-56.

Landmann, R., Zimmerli, W., Sansano, S., Link, S., Hahn, A., Glauser, M. P., and Calandra, T. 1995. Increased circulating soluble CD14 is associated with high mortality in gram-negative septic shock. *J.Infect.Dis.* **171**: 639-44.

Lang, K. S., Georgiev, P., Recher, M., Navarini, A. A., Bergthaler, A., Heikenwalder, M., Harris, N. L., Junt, T., Odermatt, B., Clavien, P. A., Pircher, H., Akira, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 2006. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J.Clin.Invest.* **116**: 2456-63.

Lang, K. S., Recher, M., Junt, T., Navarini, A. A., Harris, N. L., Freigang, S., Odermatt, B., Conrad, C., Ittner, L. M., Bauer, S., Luther, S. A., Uematsu, S., Akira, S., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. 2005. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat.Med.* **11**: 138-45.

Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G., and Butcher, E. 2002. Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol.Rev.* **186**: 37-46.

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.

Lazarus, R., Raby, B. A., Lange, C., Silverman, E. K., Kwiatkowski, D. J., Vercelli, D., Klimecki, W. J., Martinez, F. D., and Weiss, S. T. 2004. TOLL-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **170**: 594-600.

Leadbetter, E. A., Rifkin, I. R., Hohlbaum, A. M., Beaudette, B. C., Shlomchik, M. J., and Marshak-Rothstein, A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* **416**: 603-7.

Leckie, M. J., ten Brinke, A., Khan, J., Diamant, Z., O'Connor, B. J., Walls, C. M., Mathur, A. K., Cowley, H. C., Chung, K. F., Djukanovic, R., Hansel, T. T., Holgate, S. T., Sterk, P. J., and Barnes, P. J. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet.* **356**: 2144-8.

Lee, B., Leslie, G., Soilleux, E., O'Doherty, U., Baik, S., Levroney, E., Flummerfelt, K., Swiggard, W., Coleman, N., Malim, M., and Doms, R. W. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J.Virol.* **75**: 12028-38.

Lee, B. J., Kim, S. K., Kim, M. K., Park, E. S., Cho, H. C., Shim, M. S., Kim, M. J., Shin, Y. G., and Chung, C. H. 2005. Limited effect of CpG ODN in preventing type 1 diabetes in NOD mice. *Yonsei Med.J.* **46**: 341-6.

Lee, J., Wu, C. C., Lee, K. J., Chuang, T. H., Katakura, K., Liu, Y. T., Chan, M., Tawatao, R., Chung, M., Shen, C., Cottam, H. B., Lai, M. M., Raz, E., and Carson, D. A. 2006. Activation

- of anti-hepatitis C virus responses via Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 1828-33.
- Lee, J. D., Kato, K., Tobias, P. S., Kirkland, T. N., and Ulevitch, R. J. 1992. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J.Exp.Med.* **175**: 1697-705.
- Lehuen, A., Lantz, O., Beaudoin, L., Laloux, V., Carnaud, C., Bendelac, A., Bach, J. F., and Monteiro, R. C. 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J.Exp.Med.* **188**: 1831-9.
- Leite-De-Moraes, M. C., Moreau, G., Arnould, A., Machavoine, F., Garcia, C., Papiernik, M., and Dy, M. 1998. IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *Eur.J.Immunol.* **28**: 1507-15.
- Lemaitre, B., Kromer-Metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**: 9465-9.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* **86**: 973-83.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. 1997. Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**: 14614-9.
- Lepault, F. and Gagnerault, M. C. 2000. Characterization of peripheral regulatory CD4+ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **164**: 240-7.
- Li, M., Carpio, D. F., Zheng, Y., Bruzzo, P., Singh, V., Ouaz, F., Medzhitov, R. M., and Beg, A. A. 2001. An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells. *J.Immunol.* **166**: 7128-35.
- Li, X. M., Srivastava, K., Huleatt, J. W., Bottomly, K., Burks, A. W., and Sampson, H. A. 2003. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J.Immunol.* **170**: 3289-95.
- Lin, Y., Lee, H., Berg, A. H., Lisanti, M. P., Shapiro, L., and Scherer, P. E. 2000. The lipopolysaccharide-activated toll-like receptor (TLR)-4 induces synthesis of the closely related receptor TLR-2 in adipocytes. *J.Biol.Chem.* **275**: 24255-63.
- Ling, E. M., Smith, T., Nguyen, X. D., Pridgeon, C., Dallman, M., Arbery, J., Carr, V. A., and Robinson, D. S. 2004. Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet.* **363**: 608-15.
- Lisbonne, M., Diem, S., de Castro, Keller A., Lefort, J., Araujo, L. M., Hachem, P., Fourneau, J. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Taniguchi, M., Van Endert, P., Dy, M., Askenase, P.,

- Russo, M., Vargaftig, B. B., Herbelin, A., and Leite-De-Moraes, M. C. 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J.Immunol.* **171**: 1637-41.
- Liu, J. and Beller, D. I. 2003. Distinct pathways for NF-kappa B regulation are associated with aberrant macrophage IL-12 production in lupus- and diabetes-prone mouse strains. *J.Immunol.* **170**: 4489-96.
- Liu, Y. J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* **106**: 259-62.
- Liu, Y. J. 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu.Rev.Immunol.* **23**: 275-306.
- Liu, Z. Q., Deng, G. M., Foster, S., and Tarkowski, A. 2001. Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis. *Arthritis Res.* **3**: 375-80.
- Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B., and Liebermann, D. A. 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene.* **5**: 1095-7.
- Lore, K., Smed-Sorensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J. R., and Koup, R. A. 2005. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* **201**: 2023-33.
- Lorenz, E., Mira, J. P., Cornish, K. L., Arbour, N. C., and Schwartz, D. A. 2000. A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect.Immun.* **68**: 6398-401.
- Lu, J., O'Hara, E. B., Trieselmann, B. A., Romano, P. R., and Dever, T. E. 1999. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase PKR will phosphorylate serine, threonine, or tyrosine at residue 51 in eukaryotic initiation factor 2alpha. *J.Biol.Chem.* **274**: 32198-203.
- Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., and Flavell, R. A. 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**: 5598-603.
- Maddox, L. and Schwartz, D. A. 2002. The pathophysiology of asthma. *Annu.Rev.Med.* **53**: 477-98.
- Maeda, N., Nigou, J., Herrmann, J. L., Jackson, M., Amara, A., Lagrange, P. H., Puzo, G., Gicquel, B., and Neyrolles, O. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between Mycobacterium species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J.Biol.Chem.* **278**: 5513-6.
- Mandrup-Poulsen, T., Spinas, G. A., Prowse, S. J., Hansen, B. S., Jorgensen, D. W., Bendtzen, K., Nielsen, J. H., and Nerup, J. 1987. Islet cytotoxicity of interleukin 1. Influence of culture conditions and islet donor characteristics. *Diabetes.* **36**: 641-7.

- Mansell, A., Brint, E., Gould, J. A., O'Neill, L. A., and Hertzog, P. J. 2004. Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J.Biol.Chem.* **279**: 37227-30.
- Mansell, A., Smith, R., Doyle, S. L., Gray, P., Fenner, J. E., Crack, P. J., Nicholson, S. E., Hilton, D. J., O'Neill, L. A., and Hertzog, P. J. 2006. Suppressor of cytokine signaling 1 negatively regulates Toll-like receptor signaling by mediating Mal degradation. *Nat.Immunol.* **7**: 148-55.
- 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**: 677-86.
- Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V. M. 2004. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature.* **430**: 213-8.
- Marleau, A. M. and Singh, B. 2002. Myeloid dendritic cells in non-obese diabetic mice have elevated costimulatory and T helper-1-inducing abilities. *J.Autoimmun.* **19**: 23-35.
- Marshall, J. D., Wen, Y., Abrams, J. S., and Umetsu, D. T. 1993. In vitro synthesis of IL-4 by human CD4+ T cells requires repeated antigenic stimulation. *Cell Immunol.* **152**: 18-34.
- Marshall-Clarke, S., Downes, J. E., Haga, I. R., Bowie, A. G., Borrow, P., Pennock, J. L., Grecis, R. K., and Rothwell, P. 2007. Polyinosinic acid is a ligand for toll-like receptor 3. *J.Biol.Chem.* **282**: 24759-66.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol.Cell.* **10**: 417-26.
- Martins, T. C. and Aguas, A. P. 1999. Mechanisms of Mycobacterium avium-induced resistance against insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic (NOD) mice: role of Fas and Th1 cells. *Clin.Exp.Immunol.* **115**: 248-54.
- Matricardi, P. M., Rosmini, F., Riondino, S., Fortini, M., Ferrigno, L., Rapicetta, M., and Bonini, S. 2000. Exposure to foodborne and orofecal microbes versus airborne viruses in relation to atopy and allergic asthma: epidemiological study. *BMJ.* **320**: 412-7.
- Matsuda, H., Suda, T., Sato, J., Nagata, T., Koide, Y., Chida, K., and Nakamura, H. 2005. alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **33**: 22-31.
- Matsuguchi, T., Musikachoen, T., Ogawa, T., and Yoshikai, Y. 2000. Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J.Immunol.* **165**: 5767-72.
- Mattner, J., Debord, K. L., Ismail, N., Goff, R. D., Cantu, C., III, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., Hoebe, K., Schneewind, O., Walker, D., Beutler, B., Teyton, L., Savage, P. B., and Bendelac, A. 2005. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature.* **434**: 525-9.

- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 991-1045.
- Matzinger, P. 1998. An innate sense of danger. *Semin.Immunol.* **10**: 399-415.
- McCurdy, J. D., Lin, T. J., and Marshall, J. S. 2001. Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J.Leukoc.Biol.* **70**: 977-84.
- McFadden, E. R., Jr. and Gilbert, I. A. 1992. Asthma. *N.Engl.J.Med.* **327**: 1928-37.
- McGettrick, A. F., Brint, E. K., Palsson-McDermott, E. M., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., Gay, N. J., Fitzgerald, K. A., and O'Neill, L. A. 2006. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC{epsilon} during Toll-like receptor 4 signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 9196-201.
- McGovern, D. P., Hysi, P., Ahmad, T., van Heel, D. A., Moffatt, M. F., Carey, A., Cookson, W. O., and Jewell, D. P. 2005. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Hum.Mol.Genet.* **14**: 1245-50.
- McKinney, P. A., Okasha, M., Parslow, R. C., Law, G. R., Gurney, K. A., Williams, R., and Bodansky, H. J. 2000. Early social mixing and childhood Type 1 diabetes mellitus: a case-control study in Yorkshire, UK. *Diabet.Med.* **17**: 236-42.
- Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T., and Luster, A. D. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J.Clin.Invest.* **115**: 407-17.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. 1998. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol.Cell.* **2**: 253-8.
- Meyers, B. C., Morgante, M., and Michelmore, R. W. 2002. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in Arabidopsis and other plant genomes. *Plant J.* **32**: 77-92.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M., and Tschopp, J. 2004. RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat.Immunol.* **5**: 503-7.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. 2005. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature.* **437**: 1167-72.
- Mi, Q. S., Ly, D., Zucker, P., McGarry, M., and Delovitch, T. L. 2004. Interleukin-4 but not interleukin-10 protects against spontaneous and recurrent type 1 diabetes by activated CD1d-restricted invariant natural killer T-cells. *Diabetes.* **53**: 1303-10.
- Miceli-Richard, C., Lesage, S., Rybojad, M., Prieur, A. M., Manouvrier-Hanu, S., Hafner, R., Chamailard, M., Zouali, H., Thomas, G., and Hugot, J. P. 2001. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat.Genet.* **29**: 19-20.

- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I., and Matikainen, S. 2001. IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. *Genes Immun.* **2**: 349-55.
- Mink, M., Fogelgren, B., Olszewski, K., Maroy, P., and Csiszar, K. 2001. A novel human gene (SARM) at chromosome 17q11 encodes a protein with a SAM motif and structural similarity to Armadillo/beta-catenin that is conserved in mouse, *Drosophila*, and *Caenorhabditis elegans*. *Genomics.* **74**: 234-44.
- Mitchison, N. A. 1993. A walk round the edges of self tolerance. *Ann.Rheum.Dis.* **52 Suppl 1**: S3-S5.
- Miyazaki, A., Hanafusa, T., Yamada, K., Miyagawa, J., Fujino-Kurihara, H., Nakajima, H., Nonaka, K., and Tarui, S. 1985. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clin.Exp.Immunol.* **60**: 622-30.
- Mockenhaupt, F. P., Hamann, L., von Gaertner, C., Bedu-Addo, G., von Kleinsorgen, C., Schumann, R. R., and Bienzle, U. 2006. Common polymorphisms of toll-like receptors 4 and 9 are associated with the clinical manifestation of malaria during pregnancy. *J.Infect.Dis.* **194**: 184-8.
- Moisan, J., Camateros, P., Thuraisingam, T., Marion, D., Koohsari, H., Martin, P., Boghdady, M. L., Ding, A., Gaestel, M., Guiot, M. C., Martin, J. G., and Radzioch, D. 2006. TLR7 ligand prevents allergen-induced airway hyperresponsiveness and eosinophilia in allergic asthma by a MYD88-dependent and MK2-independent pathway. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* **290**: L987-L995.
- Montoya, C. J., Jie, H. B., Al Harthi, L., Mulder, C., Patino, P. J., Rugeles, M. T., Krieg, A. M., Landay, A. L., and Wilson, S. B. 2006. Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells. *J.Immunol.* **177**: 1028-39.
- Moore, C. E., Segal, S., Berendt, A. R., Hill, A. V., and Day, N. P. 2004. Lack of association between Toll-like receptor 2 polymorphisms and susceptibility to severe disease caused by *Staphylococcus aureus*. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **11**: 1194-7.
- Morishima, Y., Ishii, Y., Kimura, T., Shibuya, A., Shibuya, K., Hegab, A. E., Iizuka, T., Kiwamoto, T., Matsuno, Y., Sakamoto, T., Nomura, A., Taniguchi, M., and Sekizawa, K. 2005. Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide. *Eur.J.Immunol.* **35**: 2803-14.
- Morita, R., Uchiyama, T., and Hori, T. 2005. Nitric oxide inhibits IFN-alpha production of human plasmacytoid dendritic cells partly via a guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent pathway. *J.Immunol.* **175**: 806-12.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* **7**: 145-73.
- Muntoni, S., Fonte, M. T., Stoduto, S., Marietti, G., Bizzarri, C., Crino, A., Ciampalini, P., Multari, G., Suppa, M. A., Matteoli, M. C., Lucentini, L., Sebastiani, L. M., Visalli, N., Pozzilli, P., Boscherini, B., and Muntoni, S. 1997. Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among Sardinian-heritage children born in Lazio region, Italy. *Lancet.* **349**: 160-2.

- 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*. **37**: 339-47.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., and Mantovani, A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J.Immunol.* **164**: 5998-6004.
- Nafstad, P., Brunekreef, B., Skrondal, A., and Nystad, W. 2005. Early respiratory infections, asthma, and allergy: 10-year follow-up of the Oslo Birth Cohort. *Pediatrics*. **116**: e255-e262.
- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat.Immunol.* **3**: 667-72.
- Nagarajan, N. A. and Kronenberg, M. 2007. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J.Immunol.* **178**: 2706-13.
- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J.Biol.Chem.* **274**: 21491-4.
- Naumov, Y. N., Bahjat, K. S., Gausling, R., Abraham, R., Exley, M. A., Koezuka, Y., Balk, S. B., Strominger, J. L., Clare-Salzer, M., and Wilson, S. B. 2001. Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 13838-43.
- Navarro-Sanchez, E., Altmeyer, R., Amara, A., Schwartz, O., Fieschi, F., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., and Despres, P. 2003. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* **4**: 723-8.
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., and Honda, K. 2006. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 15136-41.
- Negishi, H., Ohba, Y., Yanai, H., Takaoka, A., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Taniguchi, T., and Honda, K. 2005. Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **102**: 15989-94.
- Nestle, F. O., Conrad, C., Tun-Kyi, A., Homey, B., Gombert, M., Boyman, O., Burg, G., Liu, Y. J., and Gilliet, M. 2005. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J.Exp.Med.* **202**: 135-43.
- Neven, B., Callebaut, I., Prieur, A. M., Feldmann, J., Bodemer, C., Lepore, L., Derfalvi, B., Benjaponpitak, S., Vesely, R., Sauvain, M. J., Oertle, S., Allen, R., Morgan, G., Borkhardt, A., Hill, C., Gardner-Medwin, J., Fischer, A., and de Saint, Basile G. 2004. Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood*. **103**: 2809-15.

- Nitta, Y., Tashiro, F., Tokui, M., Shimada, A., Takei, I., Tabayashi, K., and Miyazaki, J. 1998. Systemic delivery of interleukin 10 by intramuscular injection of expression plasmid DNA prevents autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Hum.Gene Ther.* **9**: 1701-7.
- Noguchi, E., Nishimura, F., Fukai, H., Kim, J., Ichikawa, K., Shibasaki, M., and Arinami, T. 2004. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin.Exp.Allergy.* **34**: 177-83.
- Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., and Akira, S. 2000. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J.Immunol.* **164**: 3476-9.
- Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol.Rev.* **198**: 249-66.
- O'Neill, L. 2000. The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem.Soc.Trans.* **28**: 557-63.
- O'Reilly, L. A., Hutchings, P. R., Crocker, P. R., Simpson, E., Lund, T., Kioussis, D., Takei, F., Baird, J., and Cooke, A. 1991. Characterization of pancreatic islet cell infiltrates in NOD mice: effect of cell transfer and transgene expression. *Eur.J.Immunol.* **21**: 1171-80.
- O'Riordan, T. G., Zwang, J., and Smaldone, G. C. 1992. Mucociliary clearance in adult asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* **146**: 598-603.
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A., and Cheng, G. 2006. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature.* **439**: 208-11.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., and Henson, P. M. 2001. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J.Exp.Med.* **194**: 781-95.
- Ogus, A. C., Yoldas, B., Ozdemir, T., Uguz, A., Olcen, S., Keser, I., Coskun, M., Cilli, A., and Yegin, O. 2004. The Arg753GLn polymorphism of the human toll-like receptor 2 gene in tuberculosis disease. *Eur.Respir.J.* **23**: 219-23.
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., and Kolb, H. 2000. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* **164**: 558-61.
- Oikawa, Y., Shimada, A., Yamada, S., Motohashi, Y., Nakagawa, Y., Irie, J., Maruyama, T., and Saruta, T. 2002. High frequency of valpha24(+) vbeta11(+) T-cells observed in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* **25**: 1818-23.
- Ojaniemi, M., Glumoff, V., Harju, K., Liljeroos, M., Vuori, K., and Hallman, M. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in Toll-like receptor 4-mediated cytokine expression in mouse macrophages. *Eur.J.Immunol.* **33**: 597-605.

- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., and Strauss, J. F., III. 2001. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J.Biol.Chem.* **276**: 10229-33.
- Oldstone, M. B., Nerenberg, M., Southern, P., Price, J., and Lewicki, H. 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell.* **65**: 319-31.
- Opitz, B., Forster, S., Hocke, A. C., Maass, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Krull, M. 2005. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomonas pneumoniae*. *Circ.Res.* **96**: 319-26.
- Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J.Biol.Chem.* **279**: 36426-32.
- Oro, A. S., Guarino, T. J., Driver, R., Steinman, L., and Umetsu, D. T. 1996. Regulation of disease susceptibility: decreased prevalence of IgE-mediated allergic disease in patients with multiple sclerosis. *J.Allergy Clin.Immunol.* **97**: 1402-8.
- Oshiumi, H., Sasai, M., Shida, K., Fujita, T., Matsumoto, M., and Seya, T. 2003. TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J.Biol.Chem.* **278**: 49751-62.
- Ozdemir, C., Akkoc, T., Bahceciler, N. N., Kucukercan, D., Barlan, I. B., and Basaran, M. M. 2003. Impact of *Mycobacterium vaccae* immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma. *Clin.Exp.Allergy.* **33**: 266-70.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 13766-71.
- Padovan, E., Landmann, R. M., and De Libero, G. 2007. How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system. *Trends Immunol.* **28**: 308-14.
- Paget, C., Mallewaey, T., Speak, A. O., Torres, D., Fontaine, J., Sheehan, K. C., Capron, M., Ryffel, B., Faveeuw, C., Leite, de Moraes, Platt, F., and Trottein, F. 2007. Activation of Invariant NKT Cells by Toll-like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids. *Immunity.* **27**: 597-609.
- Park, S. H. and Bendelac, A. 2000. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature.* **406**: 788-92.
- Park, Y., Park, S., Yoo, E., Kim, D., and Shin, H. 2004. Association of the polymorphism for Toll-like receptor 2 with type 1 diabetes susceptibility. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1037**: 170-4.
- Paronen, J., Liu, E., Moriyama, H., Devendra, D., Ide, A., Taylor, R., Yu, L., Miao, D., Melanitou, E., and Eisenbarth, G. S. 2004. Genetic differentiation of poly I:C from B:9-23 peptide induced experimental autoimmune diabetes. *J.Autoimmun.* **22**: 307-13.

- Parroche, P., Lauw, F. N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B. G., Visintin, A., Halmen, K. A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D. C., Gazzinelli, R. T., and Golenbock, D. T. 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**: 1919-24.
- Pascual, V., Banchereau, J., and Palucka, A. K. 2003. The central role of dendritic cells and interferon-alpha in SLE. *Curr.Opin.Rheumatol.* **15**: 548-56.
- Patel, M., Xu, D., Kewin, P., Choo-Kang, B., McSharry, C., Thomson, N. C., and Liew, F. Y. 2005. TLR2 agonist ameliorates established allergic airway inflammation by promoting Th1 response and not via regulatory T cells. *J.Immunol.* **174**: 7558-63.
- Patterson, C. C., Carson, D. J., and Hadden, D. R. 1996. Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989-1994: low incidence in areas with highest population density and most household crowding. Northern Ireland Diabetes Study Group. *Diabetologia.* **39**: 1063-9.
- Pauza, M. E., Neal, H., Hagenbaugh, A., Cheroutre, H., and Lo, D. 1999. T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes. *Diabetes.* **48**: 1948-53.
- Pearlman, D. S. 1999. Pathophysiology of the inflammatory response. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**: S132-S137.
- Peng, G., Guo, Z., Kiniwa, Y., Voo, K. S., Peng, W., Fu, T., Wang, D. Y., Li, Y., Wang, H. Y., and Wang, R. F. 2005. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science.* **309**: 1380-4.
- Peng, Y., Laouar, Y., Li, M. O., Green, E. A., and Flavell, R. A. 2004. TGF-beta regulates in vivo expansion of Foxp3-expressing CD4+CD25+ regulatory T cells responsible for protection against diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**: 4572-7.
- Phillips, J. M., Harach, S. Z., Parish, N. M., Fehervari, Z., Haskins, K., and Cooke, A. 2000. Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic beta cells. *J.Immunol.* **165**: 1949-55.
- Picard, C., Puel, A., Bonnet, M., Ku, C. L., Bustamante, J., Yang, K., Soudais, C., Dupuis, S., Feinberg, J., Fieschi, C., Elbim, C., Hitchcock, R., Lammas, D., Davies, G., Al Ghonaium, A., Al Rayes, H., Al Jumaah, S., Al Hajjar, S., Al Mohsen, I. Z., Frayha, H. H., Rucker, R., Hawn, T. R., Aderem, A., Tufenkeji, H., Haraguchi, S., Day, N. K., Good, R. A., Gougerot-Pocidalo, M. A., Ozinsky, A., and Casanova, J. L. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. *Science.* **299**: 2076-9.
- Piccirillo, C. A., Chang, Y., and Prud'homme, G. J. 1998. TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **161**: 3950-6.
- Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A. K., and Banchereau, J. 2006. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood.* **107**: 2613-8.
- Pirie, F. J., Pegoraro, R., Motala, A. A., Rauff, S., Rom, L., Govender, T., and Esterhuizen, T. M. 2005a. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes. *Tissue Antigens.* **66**: 125-30.

- Pirie, F. J., Pegoraro, R., Motala, A. A., Rauff, S., Rom, L., Govender, T., and Esterhuizen, T. M. 2005b. Toll-like receptor 3 gene polymorphisms in South African Blacks with type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. **66**: 125-30.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*. **282**: 2085-8.
- Poulton, L. D., Smyth, M. J., Hawke, C. G., Silveira, P., Shepherd, D., Naidenko, O. V., Godfrey, D. I., and Baxter, A. G. 2001. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int.Immunol.* **13**: 887-96.
- Prussin, C. and Metcalfe, D. D. 2006. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* **117**: S450-S456.
- Purkerson, J. M. and Isakson, P. C. 1994. Independent regulation of DNA recombination and immunoglobulin (Ig) secretion during isotype switching to IgG1 and IgE. *J.Exp.Med.* **179**: 1877-83.
- Qian, Y., Commane, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., and Li, X. 2001. IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B. *J.Biol.Chem.* **276**: 41661-7.
- Qin, H. Y., Sadelain, M. W., Hitchon, C., Lauzon, J., and Singh, B. 1993. Complete Freund's adjuvant-induced T cells prevent the development and adoptive transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **150**: 2072-80.
- Qin, H. Y., Suarez, W. L., Parfrey, N., Power, R. F., and Rabinovitch, A. 1992. Mechanisms of complete Freund's adjuvant protection against diabetes in BB rats: induction of non-specific suppressor cells. *Autoimmunity*. **12**: 193-9.
- Quarcoo, D., Weixler, S., Joachim, R. A., Stock, P., Kallinich, T., Ahrens, B., and Hamelmann, E. 2004. Resiquimod, a new immune response modifier from the family of imidazoquinolinamines, inhibits allergen-induced Th2 responses, airway inflammation and airway hyper-reactivity in mice. *Clin.Exp.Allergy*. **34**: 1314-20.
- Quintana, F. J., Rotem, A., Carmi, P., and Cohen, I. R. 2000. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J.Immunol.* **165**: 6148-55.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J.Exp.Med.* **189**: 615-25.
- Rabinovitch, A., Suarez-Pinzon, W. L., Sorensen, O., Bleackley, R. C., and Power, R. F. 1995. IFN-gamma gene expression in pancreatic islet-infiltrating mononuclear cells correlates with autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **154**: 4874-82.
- Raby, B. A., Klimecki, W. T., Laprise, C., Renaud, Y., Faith, J., Lemire, M., Greenwood, C., Weiland, K. M., Lange, C., Palmer, L. J., Lazarus, R., Vercelli, D., Kwiatkowski, D. J., Silverman, E. K., Martinez, F. D., Hudson, T. J., and Weiss, S. T. 2002. Polymorphisms in

- toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **166**: 1449-56.
- Rapoport, M. J., Jaramillo, A., Zipris, D., Lazarus, A. H., Serreze, D. V., Leiter, E. H., Cyopick, P., Danska, J. S., and Delovitch, T. L. 1993. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* **178**: 87-99.
- Raulet, D. H. 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat.Immunol.* **5**: 996-1002.
- Raz, I., Elias, D., Avron, A., Tamir, M., Metzger, M., and Cohen, I. R. 2001. Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet.* **358**: 1749-53.
- Redecke, V., Hacker, H., Datta, S. K., Fermin, A., Pitha, P. M., Broide, D. H., and Raz, E. 2004. Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J.Immunol.* **172**: 2739-43.
- Reiter, M. J., Testerman, T. L., Miller, R. L., Weeks, C. E., and Tomai, M. A. 1994. Cytokine induction in mice by the immunomodulator imiquimod. *J.Leukoc.Biol.* **55**: 234-40.
- Repa, A., Grangette, C., Daniel, C., Hochreiter, R., Hoffmann-Sommergruber, K., Thalhamer, J., Kraft, D., Breiteneder, H., Mercenier, A., and Wiedermann, U. 2003. Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy. *Vaccine.* **22**: 87-95.
- Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., and von Mutius, E. 2001. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* **358**: 1129-33.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. 1998. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **95**: 588-93.
- Rodriguez, 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.* **171**: 1001-8.
- Roger, T., David, J., Glauser, M. P., and Calandra, T. 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature.* **414**: 920-4.
- Roman, L. M., Simons, L. F., Hammer, R. E., Sambrook, J. F., and Gething, M. J. 1990. The expression of influenza virus hemagglutinin in the pancreatic beta cells of transgenic mice results in autoimmune diabetes. *Cell.* **61**: 383-96.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K. A. 2005. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J.Immunol.* **175**: 5260-8.

- Rowe, D. C., McGettrick, A. F., Latz, E., Monks, B. G., Gay, N. J., Yamamoto, M., Akira, S., O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A., and Golenbock, D. T. 2006. The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **103**: 6299-304.
- Rudofsky, G., Jr., Reismann, P., Witte, S., Humpert, P. M., Isermann, B., Chavakis, T., Tafel, J., Nosikov, V. V., Hamann, A., Nawroth, P., and Bierhaus, A. 2004. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* **27**: 179-83.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G. B., Wagner, H., and Bauer, S. 2004. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur.J.Immunol.* **34**: 2541-50.
- Sadelain, M. W., Qin, H. Y., Lauzon, J., and Singh, B. 1990a. Prevention of type I diabetes in NOD mice by adjuvant immunotherapy. *Diabetes.* **39**: 583-9.
- Sadelain, M. W., Qin, H. Y., Sumoski, W., Parfrey, N., Singh, B., and Rabinovitch, A. 1990b. Prevention of diabetes in the BB rat by early immunotherapy using Freund's adjuvant. *J.Autoimmun.* **3**: 671-80.
- Saetta, M., Di Stefano, A., Rosina, C., Thiene, G., and Fabbri, L. M. 1991. Quantitative structural analysis of peripheral airways and arteries in sudden fatal asthma. *Am.Rev.Respir.Dis.* **143**: 138-43.
- Saitoh, S., Akashi, S., Yamada, T., Tanimura, N., Kobayashi, M., Konno, K., Matsumoto, F., Fukase, K., Kusumoto, S., Nagai, Y., Kusumoto, Y., Kosugi, A., and Miyake, K. 2004. Lipid A antagonist, lipid IVA, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int.Immunol.* **16**: 961-9.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat.Immunol.* **6**: 345-52.
- Santin, I., Bilbao, J. R., de Nanclares, G. P., Calvo, B., and Castano, L. 2006a. No association of TLR2 and TLR4 polymorphisms with type I diabetes mellitus in the Basque population. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1079**: 268-72.
- Santin, I., Bilbao, J. R., de Nanclares, G. P., Calvo, B., and Castano, L. 2006b. No association of TLR2 and TLR4 polymorphisms with type I diabetes mellitus in the Basque population. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1079**: 268-72.
- Sarosdy, M. F. 1993. Bropiramine in bladder cancer: clinical studies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **685**: 301-8.
- Savarese, E., Chae, O. W., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S., and Krug, A. 2006. U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood.* **107**: 3229-34.
- Sayers, I., Severn, W., Scanga, C. B., Hudson, J., Le Gros, G., and Harper, J. L. 2004. Suppression of allergic airway disease using mycobacterial lipoglycans. *J.Allergy Clin.Immunol.* **114**: 302-9.

- Schmidt, B., Fujimura, S. H., Martin, J. N., and Levy, J. A. 2006. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J.Clin.Immunol.* **26**: 55-64.
- Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **2**: 947-50.
- Schofield, L., McConville, M. J., Hansen, D., Campbell, A. S., Fraser-Reid, B., Grusby, M. J., and Tachado, S. D. 1999. CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science.* **283**: 225-9.
- Schon, M., Bong, A. B., Drewniok, C., Herz, J., Geilen, C. C., Reifenberger, J., Benninghoff, B., Slade, H. B., Gollnick, H., and Schon, M. P. 2003. Tumor-selective induction of apoptosis and the small-molecule immune response modifier imiquimod. *J.Natl.Cancer Inst.* **95**: 1138-49.
- Schroder, N. W., Diterich, I., Zinke, A., Eckert, J., Draing, C., von, Baehr, V., Hassler, D., Priem, S., Hahn, K., Michelsen, K. S., Hartung, T., Burmester, G. R., Gobel, U. B., Hermann, C., and Schumann, R. R. 2005. Heterozygous Arg753Gln polymorphism of human TLR-2 impairs immune activation by *Borrelia burgdorferi* and protects from late stage Lyme disease. *J.Immunol.* **175**: 2534-40.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J.Biol.Chem.* **274**: 17406-9.
- Sel, S., Wegmann, M., Sel, S., Bauer, S., Garn, H., Alber, G., and Renz, H. 2007. Immunomodulatory effects of viral TLR ligands on experimental asthma depend on the additive effects of IL-12 and IL-10. *J.Immunol.* **178**: 7805-13.
- Sempe, P., Bedossa, P., Richard, M. F., Villa, M. C., Bach, J. F., and Boitard, C. 1991. Anti-alpha/beta T cell receptor monoclonal antibody provides an efficient therapy for autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *Eur.J.Immunol.* **21**: 1163-9.
- Serreze, D. V., Hamaguchi, K., and Leiter, E. H. 1989. Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J.Autoimmun.* **2**: 759-76.
- Serreze, D. V., Post, C. M., Chapman, H. D., Johnson, E. A., Lu, B., and Rothman, P. B. 2000. Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes.* **49**: 2007-11.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell.* **122**: 669-82.
- Sharif, S., Arreaza, G. A., Zucker, P., Mi, Q. S., Sondhi, J., Naidenko, O. V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T. L., Gombert, J. M., Leite-De-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J. F., and Herbelin, A. 2001. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat.Med.* **7**: 1057-62.

- Sharma, M., Batra, J., Mabalirajan, U., Goswami, S., Ganguly, D., Lahkar, B., Bhatia, N. K., Kumar, A., and Ghosh, B. 2004. Suggestive evidence of association of C-159T functional polymorphism of the CD14 gene with atopic asthma in northern and northwestern Indian populations. *Immunogenetics*. **56**: 544-7.
- Shi, F. D., Flodstrom, M., Balasa, B., Kim, S. H., Van Gunst, K., Strominger, J. L., Wilson, S. B., and Sarvetnick, N. 2001. Germ line deletion of the CD1 locus exacerbates diabetes in the NOD mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 6777-82.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* **189**: 1777-82.
- Shirakawa, T., Enomoto, T., Shimazu, S., and Hopkin, J. M. 1997. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science*. **275**: 77-9.
- Shuto, T., Xu, H., Wang, B., Han, J., Kai, H., Gu, X. X., Murphy, T. F., Lim, D. J., and Li, J. D. 2001. Activation of NF-kappa B by nontypeable Hemophilus influenzae is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 8774-9.
- Sigurs, N., Gustafsson, P. M., Bjarnason, R., Lundberg, F., Schmidt, S., Sigurbergsson, F., and Kjellman, B. 2005. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **171**: 137-41.
- Simmons, G., Reeves, J. D., Grogan, C. C., Vandenberghe, L. H., Baribaud, F., Whitbeck, J. C., Burke, E., Buchmeier, M. J., Soilleux, E. J., Riley, J. L., Doms, R. W., Bates, P., and Pohlmann, S. 2003. DC-SIGN and DC-SIGNR bind ebola glycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelial cells. *Virology*. **305**: 115-23.
- Simpson, P. B., Mistry, M. S., Maki, R. A., Yang, W., Schwarz, D. A., Johnson, E. B., Lio, F. M., and Alleva, D. G. 2003. Cuttine edge: diabetes-associated quantitative trait locus, Idd4, is responsible for the IL-12p40 overexpression defect in nonobese diabetic (NOD) mice. *J.Immunol.* **171**: 3333-7.
- Sioud, M. 2005. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J.Mol.Biol.* **348**: 1079-90.
- Slack, J. L., Schooley, K., Bonnert, T. P., Mitcham, J. L., Qwarnstrom, E. E., Sims, J. E., and Dower, S. K. 2000. Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J.Biol.Chem.* **275**: 4670-8.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. 2003. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat.Immunol.* **4**: 1247-53.
- Sobel, D. O., Goyal, D., Ahvazi, B., Yoon, J. W., Chung, Y. H., Bagg, A., and Harlan, D. M. 1998. Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. *J.Autoimmun.* **11**: 343-52.

- Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J., and Brutkiewicz, R. R. 2005. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur.J.Immunol.* **35**: 1692-701.
- Staines, A., Bodansky, H. J., McKinney, P. A., Alexander, F. E., McNally, R. J., Law, G. R., Lilley, H. E., Stephenson, C., and Cartwright, R. A. 1997. Small area variation in the incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Yorkshire, UK: links with overcrowding and population density. *Int.J.Epidemiol.* **26**: 1307-13.
- Stein, R. T., Sherrill, D., Morgan, W. J., Holberg, C. J., Halonen, M., Taussig, L. M., Wright, A. L., and Martinez, F. D. 1999. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* **354**: 541-5.
- Strachan, D. P. 1989. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ.* **299**: 1259-60.
- Sutmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G., and Adema, G. J. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest.* **116**: 485-94.
- Swann, J., Crowe, N. Y., Hayakawa, Y., Godfrey, D. I., and Smyth, M. J. 2004. Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol.Cell Biol.* **82**: 323-31.
- Sweet, M. J., Campbell, C. C., Sester, D. P., Xu, D., McDonald, R. C., Stacey, K. J., Hume, D. A., and Liew, F. Y. 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J.Immunol.* **168**: 392-9.
- Szabo, G. and Dolganiuc, A. 2005. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. *Immunobiology.* **210**: 237-47.
- Szanya, V., Ermann, J., Taylor, C., Holness, C., and Fathman, C. G. 2002. The subpopulation of CD4⁺CD25⁺ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J.Immunol.* **169**: 2461-5.
- Takaesu, G., Kishida, S., Hiyama, A., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Ninomiya-Tsuji, J., and Matsumoto, K. 2000. TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol.Cell.* **5**: 649-58.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W., and Taniguchi, T. 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature.* **434**: 243-9.
- Takeda, K., Kaisho, T., and Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* **21**: 335-76.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. 1999a. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**: 443-51.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F., and Akira, S. 2000a. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal

lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J.Immunol.* **164**: 554-7.

Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* **13**: 933-40.

Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Takeda, K., and Akira, S. 1999b. TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene.* **231**: 59-65.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* **169**: 10-4.

Takeuchi, O., Takeda, K., Hoshino, K., Adachi, O., Ogawa, T., and Akira, S. 2000b. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int.Immunol.* **12**: 113-7.

Tal, G., Mandelberg, A., Dalal, I., Cesar, K., Somekh, E., Tal, A., Oron, A., Itskovich, S., Ballin, A., Houry, S., Beigelman, A., Lider, O., Rechavi, G., and Amariglio, N. 2004. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J.Infect.Dis.* **189**: 2057-63.

Tang, C., Rolland, J. M., Ward, C., Thien, F., Li, X., Gollant, S., and Walters, E. H. 1998. Differential regulation of allergen-specific T(H2)- but not T(H1)-type responses by alveolar macrophages in atopic asthma. *J.Allergy Clin.Immunol.* **102**: 368-75.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Bi, M., Finger, E. B., Szot, G., Ye, J., Masteller, E. L., McDevitt, H., Bonyhadi, M., and Bluestone, J. A. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J.Exp.Med.* **199**: 1455-65.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Bluestone, J. A. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* **171**: 3348-52.

Tantisira, K., Klimecki, W. T., Lazarus, R., Palmer, L. J., Raby, B. A., Kwiatkowski, D. J., Silverman, E., Vercelli, D., Martinez, F. D., and Weiss, S. T. 2004. Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun.* **5**: 343-6.

Teran, L. M. 2000. CCL chemokines and asthma. *Immunol.Today.* **21**: 235-42.

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.

Tighe, H., Takabayashi, K., Schwartz, D., Van Nest, G., Tuck, S., Eiden, J. J., Kagey-Sobotka, A., Creticos, P. S., Lichtenstein, L. M., Spiegelberg, H. L., and Raz, E. 2000. Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. *J.Allergy Clin.Immunol.* **106**: 124-34.

- Todd, J. A. 1997. Genetics of type 1 diabetes. *Pathol.Biol.(Paris)*. **45**: 219-27.
- Tomai, M. A., Gibson, S. J., Imbertson, L. M., Miller, R. L., Myhre, P. E., Reiter, M. J., Wagner, T. L., Tamulinas, C. B., Beaurline, J. M., Gerster, J. F., and . 1995. Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res.* **28**: 253-64.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Girardin, S. E., Boneca, I. G., Lemos, R., Bozza, M. T., Domingues, R. C., Coyle, A. J., Bertin, J., Philpott, D. J., and Plotkowski, M. C. 2005. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Biol.Chem.* **280**: 36714-8.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M. A., Werts, C., and Boneca, I. G. 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* **5**: 1000-6.
- Trembleau, S., Penna, G., Bosi, E., Mortara, A., Gately, M. K., and Adorini, L. 1995. Interleukin 12 administration induces T helper type 1 cells and accelerates autoimmune diabetes in NOD mice. *J.Exp.Med.* **181**: 817-21.
- Trembleau, S., Penna, G., Gregori, S., Chapman, H. D., Serreze, D. V., Magram, J., and Adorini, L. 1999. Pancreas-infiltrating Th1 cells and diabetes develop in IL-12-deficient nonobese diabetic mice. *J.Immunol.* **163**: 2960-8.
- Triantafylou, M. and Triantafylou, K. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* **23**: 301-4.
- Trujillo, C. and Erb, K. J. 2003. Inhibition of allergic disorders by infection with bacteria or the exposure to bacterial products. *Int.J.Med.Microbiol.* **293**: 123-31.
- Tukenmez, F., Bahceciler, N. N., Barlan, I. B., and Basaran, M. M. 1999. Effect of pre-immunization by killed *Mycobacterium bovis* and *vaccae* on immunoglobulin E response in ovalbumin-sensitized newborn mice. *Pediatr.Allergy Immunol.* **10**: 107-11.
- Turner, H. and Kinet, J. P. 1999. Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature.* **402**: B24-B30.
- Uematsu, S., Sato, S., Yamamoto, M., Hirotani, T., Kato, H., Takeshita, F., Matsuda, M., Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. 2005. Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J.Exp.Med.* **201**: 915-23.
- Umetsu, D. T., McIntire, J. J., Akbari, O., Macaubas, C., and DeKruyff, R. H. 2002. Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat.Immunol.* **3**: 715-20.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* **401**: 811-5.
- Uter, W., Stock, C., Pfahlberg, A., Guillen-Grima, F., Aguinaga-Ontoso, I., Brun-Sandiumenge, C., and Kramer, A. 2003. Association between infections and signs and

- symptoms of 'atopic' hypersensitivity--results of a cross-sectional survey among first-year university students in Germany and Spain. *Allergy*. **58**: 580-4.
- Vabulas, R. M., Ahmad-Nejad, P., Da Costa, C., Miethke, T., Kirschning, C. J., Hacker, 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**: 31332-9.
- Van Benten, I., Koopman, L., Niesters, B., Hop, W., van Middelkoop, B., de Waal, L., van Drunen, K., Osterhaus, A., Neijens, H., and Fokkens, W. 2003. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr.Allergy Immunol.* **14**: 363-70.
- van der Molen, R. G., Sprengers, D., Binda, R. S., de Jong, E. C., Niesters, H. G., Kusters, J. G., Kwekkeboom, J., and Janssen, H. L. 2004. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. **40**: 738-46.
- van Santen, H. M., Benoist, C., and Mathis, D. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J.Exp.Med.* **200**: 1221-30.
- Varadaradjalou, S., Feger, F., Thieblemont, N., Hamouda, N. B., Pleau, J. M., Dy, M., and Arock, M. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells. *Eur.J.Immunol.* **33**: 899-906.
- Vasilakos, J. P., Smith, R. M., Gibson, S. J., Lindh, J. M., Pederson, L. K., Reiter, M. J., Smith, M. H., and Tomai, M. A. 2000. Adjuvant activities of immune response modifier R-848: comparison with CpG ODN. *Cell Immunol.* **204**: 64-74.
- Venkatesha, R. T., Berla, Thangam E., Zaidi, A. K., and Ali, H. 2005. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol.Immunol.* **42**: 581-7.
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., Athman, R., Memet, S., Huerre, M. R., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Sansonetti, P. J., Labigne, A., Bertin, J., Philpott, D. J., and Ferrero, R. L. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat.Immunol.* **5**: 1166-74.
- Viglianti, G. A., Lau, C. M., Hanley, T. M., Miko, B. A., Shlomchik, M. J., and Marshak-Rothstein, A. 2003. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity*. **19**: 837-47.
- Visintin, A., Mazzoni, A., Spitzer, J. A., and Segal, D. M. 2001. Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **98**: 12156-61.
- Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K. M., Reeves, W. H., Bauer, S., and Krieg, A. M. 2005. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J.Exp.Med.* **202**: 1575-85.
- von Mutius, E. 2007. Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. *Immunobiology*. **212**: 433-9.

- von Mutius, E., Pearce, N., Beasley, R., Cheng, S., von Ehrenstein, O., Bjorksten, B., and Weiland, S. 2000. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. *Thorax*. **55**: 449-53.
- Wagner, H. 1999. Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv.Immunol.* **73**: 329-68.
- Waldmann, H., Cobbold, S. P., Benjamin, R., and Qin, S. 1988. A theoretical framework for self-tolerance and its relevance to therapy of autoimmune disease. *J.Autoimmun.* **1**: 623-9.
- Walter, M. J., Morton, J. D., Kajiwara, N., Agapov, E., and Holtzman, M. J. 2002. Viral induction of a chronic asthma phenotype and genetic segregation from the acute response. *J.Clin.Invest.* **110**: 165-75.
- Wang, B., Geng, Y. B., and Wang, C. R. 2001a. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J.Exp.Med.* **194**: 313-20.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. 2001b. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. **412**: 346-51.
- Wang, J. P., Liu, P., Latz, E., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., and Libraty, D. H. 2006. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J.Immunol.* **177**: 7114-21.
- Wang, L., Manji, G. A., Grenier, J. M., Al Garawi, A., Merriam, S., Lora, J. M., Geddes, B. J., Briskin, M., DiStefano, P. S., and Bertin, J. 2002a. PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apafl-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. *J.Biol.Chem.* **277**: 29874-80.
- Wang, T., Lafuse, W. P., and Zwillig, B. S. 2000. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following Mycobacterium avium infection. *J.Immunol.* **165**: 6308-13.
- Wang, X., Moser, C., Louboutin, J. P., Lysenko, E. S., Weiner, D. J., Weiser, J. N., and Wilson, J. M. 2002b. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J.Immunol.* **168**: 810-5.
- Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y. H., Cao, W., and Liu, Y. J. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. **436**: 1181-5.
- Weber, A. N., Moncrieffe, M. C., Gangloff, M., Imler, J. L., and Gay, N. J. 2005. Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. *J.Biol.Chem.* **280**: 22793-9.
- Weeks, C. E. and Gibson, S. J. 1994. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J.Interferon Res.* **14**: 81-5.
- Weidinger, S., Klopp, N., Rummler, L., Wagenpfeil, S., Novak, N., Baurecht, H. J., Groer, W., Darsow, U., Heinrich, J., Gauger, A., Schafer, T., Jakob, T., Behrendt, H., Wichmann, H.

- E., Ring, J., and Illig, T. 2005. Association of NOD1 polymorphisms with atopic eczema and related phenotypes. *J.Allergy Clin.Immunol.* **116**: 177-84.
- Weis, W. I., Taylor, M. E., and Drickamer, K. 1998. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol.Rev.* **163**: 19-34.
- Wen, L., Peng, J., Li, Z., and Wong, F. S. 2004. The effect of innate immunity on autoimmune diabetes and the expression of Toll-like receptors on pancreatic islets. *J.Immunol.* **172**: 3173-80.
- Wenzel, S. E., Gibbs, R. L., Lehr, M. V., and Simoes, E. A. 2002. Respiratory outcomes in high-risk children 7 to 10 years after prophylaxis with respiratory syncytial virus immune globulin. *Am.J.Med.* **112**: 627-33.
- Werts, C., Girardin, S. E., and Philpott, D. J. 2006. TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death.Differ.* **13**: 798-815.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint, Girons, I, Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S., and Ulevitch, R. J. 2001. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat.Immunol.* **2**: 346-52.
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., and Cao, Z. 1997. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* **7**: 837-47.
- Wierenga, E. A., Snoek, M., Jansen, H. M., Bos, J. D., van Lier, R. A., and Kapsenberg, M. L. 1991. Human atopen-specific types 1 and 2 T helper cell clones. *J.Immunol.* **147**: 2942-9.
- Wiggs, B. R., Bosken, C., Pare, P. D., James, A., and Hogg, J. C. 1992. A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am.Rev.Respir.Dis.* **145**: 1251-8.
- Wilson, M. S., Taylor, M. D., Balic, A., Finney, C. A., Lamb, J. R., and Maizels, R. M. 2005. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J.Exp.Med.* **202**: 1199-212.
- Wilson, S. B., Kent, S. C., Horton, H. F., Hill, A. A., Bollyky, P. L., Hafler, D. A., Strominger, J. L., and Byrne, M. C. 2000. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**: 7411-6.
- Wilson, S. B., Kent, S. C., Patton, K. T., Orban, T., Jackson, R. A., Exley, M., Porcelli, S., Schatz, D. A., Atkinson, M. A., Balk, S. P., Strominger, J. L., and Hafler, D. A. 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature.* **391**: 177-81.
- Wogensen, L., Lee, M. S., and Sarvetnick, N. 1994. Production of interleukin 10 by islet cells accelerates immune-mediated destruction of beta cells in nonobese diabetic mice. *J.Exp.Med.* **179**: 1379-84.

- Wohlleben, G., Muller, J., Tatsch, U., Hambrecht, C., Herz, U., Renz, H., Schmitt, E., Moll, H., and Erb, K. J. 2003. Influenza A virus infection inhibits the efficient recruitment of Th2 cells into the airways and the development of airway eosinophilia. *J.Immunol.* **170**: 4601-11.
- Wolfs, T. G., Buurman, W. A., van Schadewijk, A., de Vries, B., Daemen, M. A., Hiemstra, P. S., and van, 't, V. 2002. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J.Immunol.* **168**: 1286-93.
- Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. 1990. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* **249**: 1431-3.
- Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z., and Shu, H. B. 2005. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol.Cell.* **19**: 727-40.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L., and Tong, L. 2000. Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature.* **408**: 111-5.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., and Akira, S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* **301**: 640-3.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K., and Akira, S. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* **420**: 324-9.
- Yang, I. A., Barton, S. J., Rorke, S., Cakebread, J. A., Keith, T. P., Clough, J. B., Holgate, S. T., and Holloway, J. W. 2004a. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun.* **5**: 41-5.
- Yang, X. D., Tisch, R., Singer, S. M., Cao, Z. A., Liblau, R. S., Schreiber, R. D., and McDevitt, H. O. 1994. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *J.Exp.Med.* **180**: 995-1004.
- Yang, Z., Chen, M., Ellett, J. D., Fialkow, L. B., Carter, J. D., McDuffie, M., and Nadler, J. L. 2004b. Autoimmune diabetes is blocked in Stat4-deficient mice. *J.Autoimmun.* **22**: 191-200.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* **308**: 1626-9.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., and Fujita, T. 2005. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J.Immunol.* **175**: 2851-8.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat.Immunol.* **5**: 730-7.

- Yoo, N. J., Park, W. S., Kim, S. Y., Reed, J. C., Son, S. G., Lee, J. Y., and Lee, S. H. 2002. Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1 β processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **299**: 652-8.
- Yoon, J. W. 1991. Role of viruses in the pathogenesis of IDDM. *Ann.Med.* **23**: 437-45.
- Yu, K. Y., Kwon, H. J., Norman, D. A., Vig, E., Goebel, M. G., and Harrington, M. A. 2002. Cutting edge: mouse pellino-2 modulates IL-1 and lipopolysaccharide signaling. *J.Immunol.* **169**: 4075-8.
- Zaccone, P., Fehervari, Z., Jones, F. M., Sidobre, S., Kronenberg, M., Dunne, D. W., and Cooke, A. 2003. Schistosoma mansoni antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur.J.Immunol.* **33**: 1439-49.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A., and Ghosh, S. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* **303**: 1522-6.
- Zhang, G. and Ghosh, S. 2002. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J.Biol.Chem.* **277**: 7059-65.
- Zhang, Y., Rogers, K. H., and Lewis, D. B. 1996. Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses. *J.Exp.Med.* **184**: 1507-12.
- Zhang, Z., Fu, J., Zhao, Q., He, Y., Jin, L., Zhang, H., Yao, J., Zhang, L., and Wang, F. S. 2006. Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J.Immunol.* **176**: 5644-51.
- Zheng, X. X., Steele, A. W., Hancock, W. W., Stevens, A. C., Nickerson, P. W., Roy-Chaudhury, P., Tian, Y., and Strom, T. B. 1997. A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J.Immunol.* **158**: 4507-13.
- Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., III, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y. P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R. L., Lavery, S. B., Savage, P. B., Teyton, L., and Bendelac, A. 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science.* **306**: 1786-9.
- Zinkernagel, R. M., Pircher, H. P., Ohashi, P., Oehen, S., Odermatt, B., Mak, T., Arnheiter, H., Burki, K., and Hengartner, H. 1991. T and B cell tolerance and responses to viral antigens in transgenic mice: implications for the pathogenesis of autoimmune versus immunopathological disease. *Immunol.Rev.* **122**: 133-71.