



HAL
open science

Interactions entre épithélium bronchique et cellules dendritiques : implication de molécules membranaires

Solenne Taront

► **To cite this version:**

Solenne Taront. Interactions entre épithélium bronchique et cellules dendritiques : implication de molécules membranaires. Immunologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT : . tel-00373159

HAL Id: tel-00373159

<https://theses.hal.science/tel-00373159>

Submitted on 3 Apr 2009

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.

Université du Droit et de la Santé de Lille II

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Discipline : IMMUNOLOGIE

Solenne TARONT

**INTERACTIONS ENTRE EPITHELIUM
BRONCHIQUE ET CELLULES DENDRITIQUES :
IMPLICATION DE MOLECULES
MEMBRANAIRES**

Présentée et soutenue publiquement le 3 Octobre 2008 devant le jury composé de :

Président : **Professeur Isabelle TILLIE-LEBLONB** : Clinique des maladies
respiratoires, CHRU de Lille

Rapporteurs : **Professeur Antoine MAGNAN** : INSERM U915, Nantes
Docteur Paul SOLER : INSERM U700, Paris

Examineurs : **Docteur Yves DELNESTE** : INSERM U564, Angers
Docteur Jean-Claude SIRARD, U801 : Institut de Biologie de Lille

Directeur de thèse : **Docteur Philippe GOSSET**, INSERM U774, Institut Pasteur, Lille

INSERM U774 – Institut Pasteur de Lille

*Ca a été très long mais il y est arrivé
Il fait le compte de ce qu'il y a laissé
Beaucoup plus que des plumes,
des morceaux entiers
Certains disent même un peu d'identité*

...
Pour être le premier
J.J. Goldman

Un grand merci à tous les membres de l'unité 416 devenue 774 :

A Monsieur le Professeur A.B. Tonnel et Monsieur le Docteur Philippe Lassalle

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre unité et de m'avoir permis d'y réaliser ma thèse. Ces cinq années au sein du laboratoire m'auront permis de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche.

A Philippe Gosset

Je tiens à te remercier pour ton regard critique et tes conseils tout au long de ces cinq années.

A Anne Tsicopoulos

Je te remercie pour ton écoute attentive, tes conseils et le regard critique que tu as posé sur mon travail tout au long de ma thèse. Je me souviendrai longtemps des dégustations de chocolat à huis clos... Je n'aurais jamais cru découvrir tant de saveurs !

A Catherine Duez

Tout simplement merci. Sur le plan professionnel, je te remercie pour ton regard critique, tes conseils avisés, ton aide précieuse en matière de rédaction. Sur le plan personnel, merci d'avoir été ma voisine de bureau durant ma thèse, merci pour ton soutien de chaque instant dans cette épreuve. Merci d'avoir été à mon écoute. Je me souviendrai longtemps de nos discussions, pas toujours scientifiques d'ailleurs...

Aux membres de l'équipe Gosset : Catherine Fourneau, Benoist Degonne, Cecilia Estrela, David Torres, Audrey Dieudonné et Eva Vilain

J'adresse un merci tout particulier à Catherine. Tu m'as apporté une aide précieuse dès mon arrivée au sein du laboratoire, et ce, jusqu'à la fin de mon DEA. Merci de m'avoir fait partager ta rigueur lorsque tu m'as formée aux différentes techniques et surtout merci de ta patience. Merci pour ta gentillesse. Merci, tout simplement.

Merci à toi, Cecilia pour tes conseils avisés, ta gentillesse. Travailler avec toi fut un excellent apprentissage. En plus, nous avons quand-même un point commun qui est de taille : notre amour du chocolat !

Merci à toi, Benoist, pour tes conseils en biologie moléculaire, mais aussi pour les sachets de thé que tu m'as si gentiment fournis !

Merci à tous pour votre aide et vos précieux conseils tout au long de la thèse.

A tous les techniciens du laboratoire : Gwenola Kervoaze, Geneviève Marchandise, Philippe Marquillies, Philippe Hauw, Han Vorng, Michelle Masurelle, Emilie Lefèvre, Edith Evrard, Cendrine Prost, Joelle Flipo.

Je tiens à vous adresser un grand merci pour votre aide précieuse tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir fait partager vos connaissances des différentes techniques de laboratoire. Je vous remercie pour les conseils avisés que vous m'avez donnés. Un grand merci à Gwen pour ses conseils en culture cellulaire. Toutes les questions trouvent des réponses. Un grand merci à Philippe M. pour la technique du western blot, et les manip souris. Je n'y serais jamais arrivée sans vous. Un grand merci à Han pour votre très grande connaissance en matière de purification cellulaire. J'aimerais adresser un clin d'œil à Philippe H. alias « Monsieur Taront » pour Madame Corning. On peut donc considérer que tu es un peu mon Papa du labo ! Enfin, encore une fois, un grand merci à tous pour votre gentillesse.

Aux anciennes : Muriel Pichavant, Patricia de Nadai, Florence Depontieu, Laetitia Breuilh et Céline Ratajczak (ma demi-sœur polonaise)

Un grand merci à toutes pour les conseils que vous m'avez donné tout au long de cette aventure, merci pour votre soutien, et surtout merci pour les excellents moments passés en votre compagnie au labo et en dehors. Un grand merci à Mumu pour ton aide de tous les moments pendant mon DEA, pour ton franc-parler. Merci d'être toi tout simplement. Merci à vous, Pat et Flo. J'ai été ravie de faire un bout de chemin avec vous. Un merci particulier à ma demi-sœur polonaise, Céline, pour ta compagnie dans le bureau, nos discussions animées avec Catherine, scientifiques, mais pas toujours... Je pense que nous avons vécu cette aventure qu'est la thèse de la même manière, et c'est à mon sens ce qui nous a rapprochées. Je suis finalement rassurée, il y a une vie après la thèse !

A mes compagnons de pailasse et amis : Latiffa Amniai (ma compagne de galère), Coline Plé, Mathieu Barrier, Benjamin Legendre, Nathalie de Freitas Caires

Merci à tous pour vos précieux conseils, et aussi et surtout pour votre amitié et votre soutien. J'ai vraiment passé d'excellents moments en votre compagnie aussi bien au laboratoire qu'en dehors. Moments mémorables et inoubliables. Latiffa, je pense que je ne t'oublierai jamais. Je me souviendrai longtemps de l'épopée que fut notre DEA, et plus particulièrement la fin. Je te remercie de ton soutien. Et surtout, je suis heureuse d'avoir partagé un peu de ta culture. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Tu as le cœur sur la main, ne change surtout pas...

Je tiens à adresser un grand merci à mes parents, pour leur soutien et leur présence tout au long de ma thèse.

Enfin, j'adresse un merci tout particulier à Xavier Dezitter. Merci d'avoir cru en moi jusqu'à la fin. Merci pour ton soutien et ta présence de tous les instants. Merci de m'avoir aidée à surmonter les mauvais moments de cette aventure, et tu sais comme ils ont été nombreux.

Sommaire

SOMMAIRE	6
ABBREVIATIONS	9
RESUME FRANÇAIS	11
RESUME ANGLAIS	12
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I. Influence des facteurs exogènes sur la pathologie pulmonaire	14
I.1. Les pathogènes	14
I.1.a. Bactéries	14
I.1.b. Virus	16
I.1.c. Allergènes	17
I.2. La pollution atmosphérique : les particules de diesel	19
I.2.a. Généralités	19
I.2.b. Effets de la pollution sur la santé : études <i>in vivo</i>	22
I.2.b.i. Chez l'animal	23
I.2.b.ii. Chez l'homme	24
I.2.c. Effets de la pollution sur la santé : études <i>in vitro</i>	25
I.2.c.i. Sur le système immunitaire	25
I.2.c.ii. Sur les cellules épithéliales bronchiques	27
II. L'épithélium bronchique	28
II.1. Physiologie	28
II.1.a. Anatomie	28
II.1.b. Fonctions	30
II.1.c. Jonctions	31
II.1.c.i. Les jonctions serrées	34
II.1.c.ii. Les jonctions adhérentes	36
II.1.c.iii. Les protéines adaptatrices cytoplasmiques	40
II.1.c.iv. Assemblage des jonctions	44
II.1.c.v. Désassemblage des jonctions	47
II.1.d. Réparation	50
II.2. Epithélium et immunité muqueuse	52
II.2.a. La clairance mucociliaire	53
II.2.b. Sécrétion d'agents antimicrobiens	54
II.2.c. Sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance	55
II.2.d. Implication dans le recrutement des leucocytes	56
II.2.d.i. Recrutement de neutrophiles	57
II.2.d.ii. Recrutement d'éosinophiles	57
II.2.d.iii. Recrutement de lymphocytes	58
II.2.d.iv. Recrutement de cellules dendritiques	58
III. Les cellules dendritiques	59
III.1. description	59
III.1.a. Ontogénèse	60
III.1.b. Les différents phénotypes	61
III.1.b.i. Chez la souris	61
III.1.b.ii. Chez l'homme	61
III.1.c. Les différentes sous-populations	63
III.1.c.i. Les cellules de Langerhans	63

III.1.c.ii.	Les DC interstitielles	64
III.1.c.iii.	Les DC plasmacytoïdes	64
III.1.c.iv.	Les DC du sang périphérique	66
III.1.d.	Fonctions	66
III.1.d.i.	La capture des antigènes	66
III.1.d.ii.	L'apprêtement des antigènes	67
III.1.d.iii.	La costimulation	70
III.1.d.iv.	Interface DC/cellule T : la synapse immunologique	73
III.2.	DC dans le tractus respiratoire	75
III.2.a.	Répartition des DC pulmonaires	75
III.2.b.	Homéostasie et dynamique du pool de DC pulmonaires	76
III.2.c.	Fonctions des DC pulmonaires : tolérance versus immunité	78
IV.	Les Pattern Recognition Receptors ou PRR	80
IV.1.	Les Toll-Like Receptors TLR	80
IV.1.a.	Structure	82
IV.1.b.	Les ligands	82
IV.1.c.	La signalisation	84
IV.1.c.i.	La voie dépendante de MyD88	85
IV.1.c.ii.	La voie indépendante de MyD88	87
IV.1.d.	Expression dans les DC	89
IV.1.e.	Expression dans les cellules épithéliales bronchiques	91
IV.1.e.i.	TLR2	91
IV.1.e.ii.	TLR3	92
IV.1.e.iii.	TLR4	93
IV.1.e.iv.	TLR5	94
IV.1.e.v.	TLR7 et 8	94
IV.1.e.vi.	TLR9	94
IV.2.	Les Récepteurs d'épuration ou Scavenger Receptors	95
IV.2.a.	Structure	95
IV.2.a.i.	Classe A	96
IV.2.a.ii.	Classe B	97
IV.2.a.iii.	Classe C	97
IV.2.a.iv.	Classe D	97
IV.2.a.v.	Classe E	98
IV.2.a.vi.	Classe F	98
IV.2.a.vii.	Classe G	99
IV.2.a.viii.	Classe H	99
IV.2.b.	Les ligands	100
IV.2.c.	Trafic intracellulaire et signalisation	101
IV.2.c.i.	Classe A	102
IV.2.c.ii.	Classe B	103
IV.2.c.iii.	Classe E	104
IV.2.c.iv.	Classe G	105
IV.2.d.	Expression dans les DC	105
IV.2.d.i.	Chez l'homme	105
IV.2.d.ii.	Chez la souris	106
IV.2.e.	Expression dans les cellules épithéliales bronchiques	107
IV.3.	Collaboration entre PRR	108
IV.3.a.	Interactions TLR/TLR	108
IV.3.b.	Interactions TLR/récepteurs scavenger	110
BUT DU TRAVAIL DE THESE		112
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE RECHERCHE		113
Article I		114
Article II		116

Article III	118
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	120
ANNEXES	130
Article I	131
Article II	139
Article III	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162

Abbreviations

15-HETE	acide 15-Hydroxyeicosatetraenoïque
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine Triphosphate
BMDC	Bone Marrow-derived Dendritic Cell
CEB	Cellules Epithéliales Bronchiques
CCL	CC Chemokine Ligand
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'Antigène
CXCL	CXC chemokine Ligand
CXCR	CXC chemokine Receptor
DC	Dendritic Cell
DC-LAMP	Dendritic Cell-Lysosome-Associated Membrane glycoProtein
DC-SIGN	DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin
DEP	Diesel Exhaust Particule
Der p1	Dermatophagoides pteronyssimus
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
FGF	Fibroblast Growth Factor
FnBP	Fibronectin-binding protein
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HO-1	Heme Oxygenase-1
HRB	Hyper-réactivité bronchique
HSP	Heat Shock Protein
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule
ICOS	Inducible Costimulatory molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IPTG	Isopropyl-Beta-Thio-Galactoside
IRAK4	Interleukin Receptor-Associated kinase 4
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KpOmpA	Klebsiella pneumoniae Outer Membrane Protein A
LC	Langerhans Cell
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinases
MCP-3	Monocyte Chemotactic Protein-3
MIG	Monokine Induced by interferon-Gamma
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MMP-7	Matrix Metalloproteinase-7
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NK	Natural Killer Cell
NKT	Natural Killer T Cell
NO	Nitric Oxide

OxLDL	Oxidized Low-Density Lipoprotein
OVA	Ovalbumine
PAF	Platelet-Activated Factor
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PAMP	Patogen-associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
pDC	Plasmacytoid Dendritic Cell
PDCA	Plasmacytoid Dendritic Cell Antigen-1
PGE2	Prostaglandin E2
PKC	Proteine-Kinase C
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted
SP-A	Surfactant Protein-A
TARC	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
TCR	T Cell Receptor
TER	Transepithelial Resistance
TGF- β	Transforming-Growth Factor- β
Th	T Helper
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoeitin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO-1	Zonula Occludens-1

Résumé français

De nombreuses études montrent une corrélation nette entre les pics de pollution atmosphérique et la fréquence d'apparition de maladies respiratoires telles que l'asthme. La pollution par les particules de diesel (DEP ou Diesel Exhaust Particles) est en partie responsable de ces effets sur la santé. Cependant, le mode d'action de ces particules n'est pas totalement élucidé. Pour se défendre des agressions par des polluants ou des agents microbiens, la muqueuse respiratoire dispose d'un réseau d'immuno-surveillance constitué de cellules dendritiques (DC) localisées au sein de la muqueuse respiratoire. Les DC jouent un rôle clé dans le développement et le contrôle de la réponse immune locale, alors que l'épithélium bronchique participe au contrôle de la réaction inflammatoire. La discrimination du soi par rapport au non soi ou au soi modifié est effectuée par les Pattern Recognition Receptors (PRR) (notamment les Toll-like Receptors ou TLR, Scavenger Receptors ou SR) qui reconnaissent notamment les PAMP (Pathogen-Associated Molecular Pattern ou PAMP). De façon intéressante, les SR semblent impliqués dans l'élimination de particules inertes inhalées.

Le but de ce travail est d'étudier le dialogue entre l'épithélium bronchique et les DC dans un contexte d'exposition au polluant et/ou aux PAMP en se focalisant sur le rôle des molécules membranaires dans ces interactions, en particulier ICAM-1, les protéines de jonctions intercellulaires (PJI) et les SR.

Le kpOmpA, une protéine membranaire de *Klebsiella pneumoniae*, active les macrophages et les DC, et possède des propriétés immunomodulatrices. Notre but était d'étudier les interactions entre CEB et DC dans le contexte de l'exposition à un PAMP et les conséquences sur la réponse LcT. Nos résultats montrent que après inhalation de kpOmpA, l'épithélium bronchique participe au déclenchement de la réponse immune innée par le recrutement de précurseurs de DC myéloïdes par un mécanisme dépendant d'ICAM-1. Ces DC favorisent l'induction d'une réponse Th2. Cette étude démontre la participation active des CEB au développement de la réaction immunitaire en facilitant la transition entre l'immunité innée et acquise.

Au niveau intestinal, la capture des bactéries au niveau de la lumière intestinale par les DC implique l'expression de protéines de jonctions intercellulaires, permettant aux DC d'insinuer des pseudopodes entre les cellules épithéliales afin de capturer l'antigène sans rompre l'intégrité de la barrière épithéliale. Dans ce contexte, nous supposons que l'ouverture des jonctions intercellulaires de l'épithélium pourrait également permettre la capture de l'antigène dans la lumière bronchique et influencer sur les fonctions des DC. Nos résultats montrent que les DC expriment les protéines de jonctions adhérentes E-Cadhérine et β -Caténine et les protéines de jonctions serrées Occludine et ZO-1 à l'état basal. Les ligands de TLR modulent l'expression de ces protéines au niveau des ARNm et des protéines. Nous avons montré pour la première fois que la E-Cadhérine jouait un rôle clé dans la maturation des DC lors de l'établissement des jonctions intercellulaires entre CEB et DC.

Concernant les SR, les ligands de TLR modulent l'expression des SR au niveau des ARNm et des protéines contrairement aux DEP qui n'ont que peu d'effet. Associées aux ligands de TLR, les DEP modulent l'action des ligands des TLR sur l'expression des SR. Le prétraitement avec de l'ovalbumine maleylée et du dextran sulfate (agonistes des SR) bloque uniquement les effets d'une faible dose de DEP (1 μ g/ml) sur la maturation des DC et la sécrétion de cytokines. En revanche, les ligands de SR n'ont pas d'effet sur la maturation ou encore la production d'espèces réactives de l'oxygène lorsque les DC sont exposées à une dose plus importante de DEP (10 μ g/ml). Ces données suggèrent la participation des SR au cours de la réponse des DC aux DEP.

Ces données suggèrent l'importance des molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 ou les PJI et des SR dans la réponse des cellules dendritiques de la muqueuse bronchique aux PAMP et aux DEP. De plus, ils confirment les interactions existantes entre ces deux types de stimuli.

Résumé anglais

Epidemiologic studies showed a correlation between atmospheric pollution and the frequency of respiratory diseases like asthma. The effects on health are partly due to diesel exhaust particles (DEP). However, the mechanisms by which DEP affect the immune system in respiratory tract is not completely understood.

Airway mucosa has to defend itself against pollutants or micro-organisms thanks to an immunological network of dendritic cells (DC) localized into the epithelium. DC play a key role in the development and the control of the immune and inflammatory response. DC are able to recognize self from non-self or modified self thanks to Pattern Recognition Receptors (PRR) (including Toll-like Receptors also called TLR, Scavenger Receptors also called SR) that recognize Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP). Interestingly, SR are also implicated in inhaled inert particles recognition.

The aim of the work is to study the effect DEP and/or PAMP on the interactions between bronchial epithelium and DC. We particularly focused on the implication of membrane molecules such as ICAM-1, intercellular junction proteins and SR.

KpOmpA, the outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*, activates macrophages and DC, and possess immunomodulatory properties. The aim of the work was to study the crosstalk between bronchial epithelial cells (BEC) and DC after exposure to KpOmpA and the consequences on T cell response. Our results showed KpOmpA-exposed BEC induced the recruitment and the subsequent maturation of myeloid DC by a mechanism depending on ICAM-1. These DC induce the development of a Th2 response. These data show that BEC participate in the homeostasis of myeloid DC network and regulate the induction of local immune response by favouring the transition between innate and adaptive immunity.

In intestinal mucosa, the expression of intercellular junction proteins on DC allow these cells to send dendrites between intestinal epithelial cells and to capture bacteria without disrupting the barrier integrity. In this context, we supposed that this mechanism would allow antigen capture in bronchial lumen and impact on DC functions and. Our results showed that DC express adherens junction proteins E-Cadherin and β -Catenin and tight junction proteins ZO-1 and Occludin at steady state. TLR ligands modulate the expression of these proteins at mRNA and protein levels. Moreover, we showed for the first time that E-Cadherin probably modulates DC maturation during the establishment of intercellular junctions between BEC and DC.

Concerning SR, TLR ligands modulate SR expression at mRNA and protein levels contrary to the weak effect of DEP. Associated to TLR ligands, DEP modulate the action of TLR on SR expression. The pretreatment with SR agonists maleylated ovalbumin and dextran sulfate only inhibits the effects of the low dose DEP (1 μ g/ml) on DC maturation and cytokine secretion. SR ligands have any effect on DC maturation, cytokine or ROS production when DC are exposed to a high dose DEP (10 μ g/ml). These data suggest a participation for SR in DC interactions with DEP.

In conclusion, these data suggest the importance of adhesion molecules ICAM-1 or intercellular junction proteins and SR in mucosal DC immune response to PAMP and DEP. Our results also confirmed the interactions between both stimuli.

Première partie : revue bibliographique

I. Influence des facteurs exogènes sur la pathologie pulmonaire

De nombreux agents d'agression, comme les micro-organismes (bactéries, virus, allergènes), la fumée de cigarettes ou les particules de diesel, sont véhiculés par l'air ambiant et pénètrent dans les voies aériennes. Un défaut, une inadaptation ou exagération des mécanismes de défense, en particulier de l'immunité innée et de l'immunité adaptative peuvent être à l'origine de différentes pathologies.

I.1. Les pathogènes

I.1.a. Bactéries

Chez des sujets sains, les voies respiratoires inférieures ne sont pas colonisées par des bactéries. Bien que nos voies aériennes soient continuellement exposées à ces micro-organismes, le tractus respiratoire permet d'en éliminer une part très importante grâce aux mécanismes de clairance muco-ciliaire (mucus et cils vibratiles des cellules épithéliales bronchiques), de bactéricidie via l'endocytose et la sécrétion de protéines anti-bactériennes par l'hôte (défensines, collectines,...), de défense immunologique humorale et cellulaire (immunité innée et acquise). Les bactéries non pathogènes, chez un sujet non-immunodéprimé, sont sous le contrôle du système immunitaire de l'hôte. Les bactéries invasives et pathogènes ont développé des mécanismes d'échappement à l'immunité naturelle. Elles peuvent être regroupées en deux grandes catégories sur la base de leur relation avec le système immunitaire de l'hôte et en fonction de leur localisation extra- ou intra-cellulaire. Les bactéries pathogènes habituellement retrouvées au niveau des voies aériennes diffèrent selon le degré d'immunocompétence des patients (Tableau 1).

Pathogènes usuels	Pathologies associées
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	Grippe
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus aureus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>	Alcoolisme
<i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Bronchite chronique
<i>Enterobacteriaceae spp.</i> , <i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Ventilation mécanique, pneumonies
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Klebsiella</i>	Personnes âgées

<i>pneumoniae, Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae</i>	
<i>Legionella pneumophila</i>	Air conditionné, fumée de cigarette, personnes âgées, déficits immunitaires
<i>Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Mycobacterium tuberculosis</i>	Déficits immunitaires, SIDA, Tuberculose

Tableau 1 : Principales bactéries pathogènes retrouvées au niveau des voies respiratoires inférieures de patients selon leur degré d'immunocompétence. D'après van Alphen (van Alphen 1995).

Les interactions entre les bactéries pathogènes et les cellules de l'interface épithéliale représentent l'évènement initial dans de nombreuses pathologies (Boren 1993; Krivan 1988). Ainsi, le tétrasaccharide d'asialoganglioside 1 présent à la surface des cellules épithéliales bronchiques est un récepteur pour les bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus*. L'expression de ce récepteur est augmentée au niveau apical des cellules épithéliales bronchiques de patients atteints de mucoviscidose, ce qui contribue à la pathogenèse des infections bactériennes dans les voies aériennes de ces patients (Imundo 1995). De plus, l'élastase et la pseudolysine de *P. aeruginosa*, et la protéinase A extracellulaire de *L. pneumophila* sont capables d'interagir avec le récepteur PAR-2 (Protease-Activated Receptor-2) exprimé par les cellules épithéliales bronchiques au niveau apical, pour entraîner une activation cellulaire (de Kreij 2000; Dulong 2003). De la même façon, l'adhérence de *S. pneumoniae* aux cellules eucaryotes est un pré-requis à la colonisation et l'infection de l'hôte. Ainsi, une étude menée *in vitro* a montré que *S. pneumoniae* peut directement adhérer aux BEAS-2B, une lignée de cellules épithéliales bronchiques humaines, via des adhésines de la capsule (Adamou 1998). Pendant la colonisation du tractus respiratoire par *B. pertussis*, des facteurs de virulence sont impliqués dans l'adhérence des bactéries à de nombreuses cellules, dont les cellules épithéliales (Geuijen 1997; Tuomanen 1985) et les monocytes humains (Hazenbos 1994; Relman 1990). Alors que la pertactine et la toxine pertussis ne participent pas au mécanisme d'adhérence, les fimbriae et les hémagglutinines filamenteuses associées à la membrane externe des bactéries interviennent aussi comme facteurs d'adhésion de *B. pertussis* aux cellules épithéliales laryngées, et les hémagglutinines filamenteuses dans la liaison aux cellules épithéliales bronchiques (van den Berg 1999). Dans le cas d'une infection par *S. aureus*, les protéines liant la fibronectine, ou FnBP, jouent un rôle essentiel dans l'adhérence du micro-organisme à l'épithélium pulmonaire (Mongodin 2002). La reconnaissance des bactéries implique les Pattern Recognition Receptors (PRR) de signalisation comme les Toll-Like Receptors (TLR)

ainsi que les PRR d'endocytose comme les Scavenger Receptors (SR). Ces deux types de récepteurs seront présentés dans le chapitre consacré aux PRR.

Les mécanismes de liaison des bactéries à tropisme pulmonaire aux cellules épithéliales bronchiques sont essentiels pour comprendre comment les pathogènes interagissent avec l'hôte pour le coloniser et induire des pathologies. Ainsi, des stratégies d'intervention thérapeutiques se sont basées sur ces données, afin d'enrayer les infections bactériennes. De plus, il est important de noter que l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales bronchiques est augmentée quand l'épithélium est agressé, remodelé, ou quand les cellules épithéliales bronchiques cultivées *in vitro* se sont différenciées (Mongodin 2000).

I.1.b. Virus

Les voies aériennes supérieures et inférieures peuvent être infectées par des virus. Les virus sont des microorganismes qui ont besoin de pénétrer les cellules de l'hôte afin de se multiplier. Ils utilisent en effet la machinerie protéique et le métabolisme des sucres de l'hôte puisqu'ils en sont dépourvus. Ils sont composés d'un acide nucléique protégé d'une capside protéique et dans certains cas sont entourés d'une enveloppe lipidique.

Certains virus sont préférentiellement à tropisme respiratoire. On citera par exemple le Virus Syncytial Respiratoire ou RSV, responsable de la bronchiolite chez les jeunes enfants, le Rhinovirus ou RV qui touche toutes les tranches d'âge, et les virus Influenza, notamment responsables de la grippe et Parainfluenza. Il est à noter que les infections générées par ces virus peuvent avoir des conséquences néfastes, notamment contribuer à la survenue d'un asthme ou exacerber un asthme déjà présent.

L'infection de l'hôte par la plupart des virus débute par l'attachement du virus à des récepteurs de surface spécifiques. Contrairement aux plantes, chez les animaux, le récepteur qui va permettre l'entrée du virus dans la cellule hôte va déterminer le rang de l'hôte ainsi que le tropisme tissulaire. Les virus sont capables d'utiliser à leur profit de nombreuses molécules de surface comme récepteur. Certains virus sont capables de reconnaître des protéines très spécifiques à la surface de l'hôte alors que d'autres s'attachent à des structures telles que des sucres. Enfin, pour la plupart des virus, le récepteur joue un rôle actif puisqu'il permet l'entrée du génôme viral à l'intérieur de la cellule hôte (Bella 2000).

La majorité des souches de Rhinovirus, par exemple, a pour récepteur la glycoprotéine ICAM-1 (Greve 1989; Staunton 1989).

Les virus Influenza sont des virus entourés d'une enveloppe dans laquelle on retrouve 2 types de glycoprotéines qui sont des déterminants antigéniques majeurs : l'hémagglutinine et la neuraminidase. L'hémagglutinine se lie spécifiquement aux acides sialiques des sphingolipides, protéoglycanes et glycoprotéines de la membrane cellulaire de la cellule hôte (Gottshalk 1959 NY Academic Press).

Si on se place maintenant du point de vue de la cellule hôte, cette dernière peut reconnaître certains dérivés de la réplication des virus comme l'ARN double brin que l'on ne retrouve pas naturellement chez l'hôte. Cet ARN double brin sera reconnu par le TLR3, notamment pour le virus Influenza A (Guillot 2005) et le Rhinovirus (Hewson 2005). Les TLR7, 8 et 9 interviennent également dans l'immunité anti-virale contre les virus à ADN comme l'HSV (Herpes Simplex Virus) pour le TLR9 (Hochrein 2004; Krug 2004), ou en reconnaissant les séquences riches en GU des ARN simple brin de certains virus pour les TLR7 et 8 (Heil 2004). En plus des TLR, d'autres protéines intracellulaires interviennent dans la reconnaissance des ARN viraux, en particulier les ARN hélicases. Parmi elles, on peut citer RIG-1 (Retinoic acid Inducible Gene-1) et MDA5 (Melanoma Differentiation Antigen 5). Ces deux hélicases cytoplasmiques lient des molécules d'ARN spécifiques issues de différents virus, et activent des voies de signalisation conduisant à la production d'IFN de type I et de cytokines proinflammatoires (Eisenacher 2007). RIG-1 joue un rôle essentiel dans les réponses immunes antivirales dirigées contre le virus Influenza par exemple (Kato 2006). MDA5, quant à elle, est plutôt impliquée dans la reconnaissance du poly(I:C) (agoniste synthétique du TLR3) et du virus EMCV (Encephalomyocarditis Virus) (Eisenacher 2007; Gitlin 2006).

I.1.c. Allergènes

Les allergènes se définissent comme des antigènes qui sont, dans un premier temps, capables d'induire dans certaines conditions la synthèse d'immunoglobulines (Ig) de type E chez des individus prédisposés et, en second lieu, de se lier spécifiquement aux molécules d'IgE fixées sur les cellules effectrices pour déclencher la réaction allergique. Le mode d'introduction de l'allergène dans l'organisme permet d'avoir une orientation clinique. Il existe deux types d'allergènes : les pneumallergènes et les trophallergènes.

Les pneumallergènes, allergènes véhiculés par l'air, sont généralement impliqués dans des manifestations respiratoires, oculaires ou conjonctivales. Ces allergènes inhalés peuvent être soit saisonniers comme les pollens, soit perannuels, localisés dans des lieux d'habitation

confinés, comme les acariens de la poussière de maison. Les trophallergènes, allergènes d'origine alimentaire comme le lait ou l'œuf, sont responsables de symptômes digestifs, mais ces troubles affectent également d'autres organes comme la peau par exemple. Les venins d'insectes ou les médicaments induisent des réactions systémiques. Par définition, un allergène majeur d'une substance est celui vis-à-vis duquel au moins 50 % des individus sensibles réagissent en fabriquant des IgE sériques spécifiques.

Bien que des études épidémiologiques récentes ont mis en évidence un lien entre la pollution atmosphérique et des troubles de la santé, l'environnement domestique est lui aussi responsable de nombreuses manifestations pathologiques (asthmes et rhinites allergiques), d'autant plus qu'un citoyen passe en moyenne 80 % de son temps à l'intérieur des bâtiments. L'augmentation de la température, la diminution de la ventilation et la présence fréquente d'animaux de compagnie pourraient entraîner une augmentation des taux d'allergènes dans les maisons ce qui expliquerait, au moins en partie, l'augmentation des allergies observée au cours des dernières décennies. Les allergènes le plus souvent mis en cause sont les acariens et les poils d'animaux (surtout le chat) pour ce qui est de la poussière domestique, les pollens (en particulier de graminées) mais aussi les pollens d'arbres (le bouleau) et, dans certains milieux professionnels, les animaux de laboratoire (cobayes, rats, souris, hamsters, lapins).

Comme tous les antigènes protéiques complexes, les allergènes possèdent des déterminants antigéniques, ou épitopes, qui se lient spécifiquement aux sites anticorps des IgE mais aussi des IgG, IgM et IgA. Récemment, les techniques de biologie moléculaire consistant à cloner des gènes et à exprimer la protéine sous forme recombinante ont permis la caractérisation des allergènes, mais aussi la standardisation de l'immunothérapie. Depuis 1988, date à laquelle a été publiée la première séquence nucléotidique d'un allergène (Der p1) (Thomas 1988), un grand nombre de protéines allergéniques provenant de sources diverses ont été clonées et produites sous forme recombinante. On compte actuellement plus de 60 allergènes clonés dont on connaît les séquences nucléotidiques.

Les principaux allergènes responsables de l'asthme allergique peuvent être perannuels (acariens de la poussière de maison, animaux domestiques, etc) ou saisonniers (pollens, moisissures, etc). Les acariens semblent jouer un rôle capital dans le développement de l'asthme allergique perannuel ; en effet, près de 70% de ces allergies sont à mettre en relation avec une sensibilisation aux acariens.

L'exposition à des allergènes amenés par les voies aériennes, tels que *Dermatophagoïdes pteronyssinus* (acarien de la poussière de maison ; Dpt), ou l'allergène Der

p1, entraîne une activation de l'épithélium bronchique. Ainsi, le Der p1, additionné à des cultures de cellules épithéliales bronchiques de la lignée BEAS-2B, déclenche la production d'IL-6, de CXCL8 et de GM-CSF, du fait de son activité cystéine-protéase (King 1998). Cette activité protéasique, présente aussi chez d'autres allergènes, comme les allergènes fongiques d'Aspergillus, implique la stimulation du récepteur aux protéases PAR-2 (Asokanathan 2002b). Des observations faites chez des souris déficientes en PAR-2 ou surexprimant des molécules de PAR-2 humain suggèrent que ce récepteur contribue à la réaction inflammatoire allergique (Schmidlin 2002). De plus, les cellules épithéliales bronchiques de patients asthmatiques expriment davantage de PAR-2 (Knight 2001). Cependant, il est à noter que l'épithélium peut aussi être activé par des allergènes non protéasiques, comme les allergènes de bouleau et d'ivraie (Kauffman 2000; Tomee 1998). Ces observations montrent que les allergènes peuvent moduler les fonctions des cellules épithéliales bronchiques. Par ailleurs, grâce à son activité enzymatique, l'allergène Der p1 est capable de dégrader les jonctions serrées assurant la cohésion de cette interface. Par ce mécanisme, l'allergène favorise sa diffusion vers les cellules dendritiques (DC), et altérant ainsi le rôle de barrière physique de l'épithélium bronchique (Wan 1999). On peut supposer que, dès lors, les DC vont plus facilement entrer en jeu afin de mettre en route les processus de défense de l'organisme, en jouant leur rôle de cellules présentatrices d'Ag.

Enfin, des travaux ont montré que les allergènes pouvaient agir sur les lectines et les mucines. Ainsi, le récepteur au mannose (MR) participe à la reconnaissance de Der p1 et à la réponse immunitaire qui en découle au niveau des DC de patients allergiques (Deslee 2002). Enfin, une étude récente réalisée par Furmonaviciene et al a montré que Der p1 pouvait cliver la lectine de type C DC-SIGN, empêchant ainsi sa liaison avec la protéine JAM-3 exprimée à la surface des lymphocytes T naïfs et par conséquent la signalisation conduisant à la polarisation de type Th1 de la réponse immune (Furmonaviciene 2007). Une étude récente a montré que Der p1 pouvait se lier aux protéines du surfactant SP-A et D et les dégrader via son activité protéasique, augmentant ainsi son allergénicité (Deb 2007).

I.2. La pollution atmosphérique : les particules de diesel

I.2.a. Généralités

L'appareil respiratoire est la cible privilégiée des polluants atmosphériques. Les principales substances polluantes de l'atmosphère peuvent se répartir en deux groupes : les gaz, qui

représentent 90% des masses globales de polluants rejetées dans l'air, et les particules solides (poussières, fumées) qui représentent les 10% restants. Les évolutions industrielles (disparition des industries lourdes) et l'extension du parc automobile font des moteurs diesel l'une des principales sources de particules dans l'air de nos villes.

Ces particules issues de l'échappement de moteurs diesel (DEP ou Diesel Exhaust Particles) sont complexes (Figure 1). Elles sont composées de particules carbonées solides à la surface desquelles sont adsorbées une fraction soluble organique et une fraction insoluble.

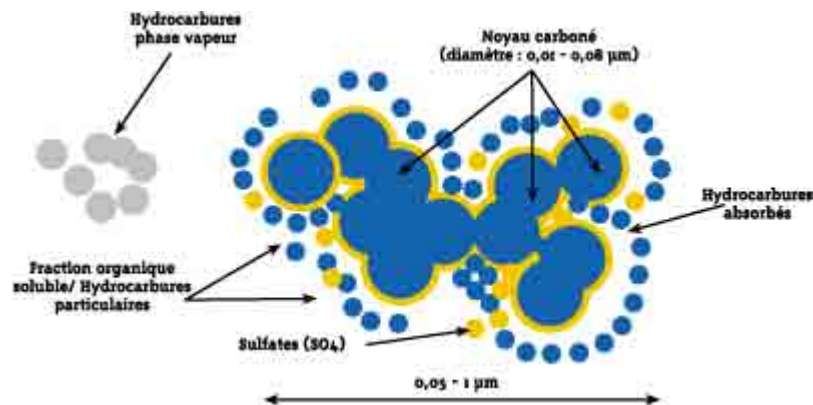


Figure 1 : Représentation schématique de la composition des particules de diesel.

Leur observation au microscope électronique à transmission révèle la présence de microsphérules de carbone sur lesquelles sont adsorbés les hydrocarbures et d'autres espèces minérales. Ces sphérules de quelques centaines d'Angström ont un grand pouvoir d'assemblage soit en mode « embryon » de 0,005 à 0,015 µm, soit en mode agrégat de 0,08 à 1 µm, en fonction du régime du moteur et de la richesse du carburant.

La fraction soluble organique est constituée d'hydrocarbures imbrûlés issus principalement de la combustion incomplète du gazole et de l'huile. Cette phase imbrûlée comprend plusieurs centaines de composés avec, notamment, des hydrocarbures aromatiques polycycliques insaturés, regroupés sous la dénomination de DEP-PAH (Diesel Exhaust Particles Polycyclic Aromatic Hydrocarbons). Ces derniers forment une très vaste famille de composés organiques réactifs, formés de 3 à 5 cycles de benzène diversement chlorés et oxygénés, dont les principaux représentants sont les phénanthrènes, les fluorènes, les naphthalènes, les fluoranthènes et les pyrènes (Figures 2 et 3).

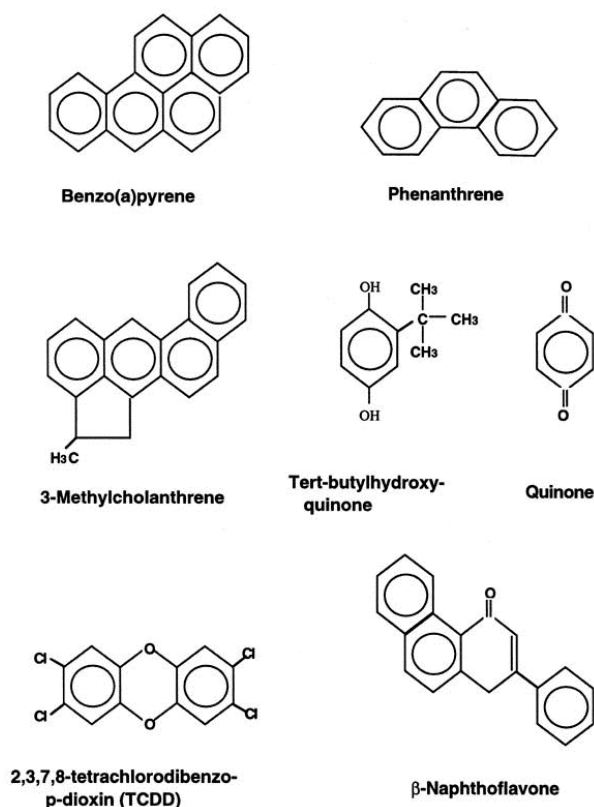


Figure 2 : Formule chimique des principaux hydrocarbures polycycliques aromatiques, quinones et autres composés chimiques participant à la composition des particules de diesel. D’après Nel (Nel 1998).

Compounds	Organic extract (%)
Phenanthrenes (0, C ₂ , C ₃ , and C ₄ methylated)	52
Fluorenes (0, C ₂ , C ₃ , and C ₄ methylated)	15
Naphthalenes	13
Fluoranthrenes	10
Pyrenes (including benzopyrene)	10

Figure 3 : Importance relative des principaux hydrocarbures polycycliques aromatiques contenus dans les particules de diesel. Modifié d’après Barfknecht (Barfknecht 1982).

La fraction insoluble quant à elle se compose entre autres de sulfates et de dérivés soufrés.

Du fait de leur faible diamètre, les particules de diesel vont pénétrer plus ou moins profondément dans l’appareil respiratoire. Les particules dont le diamètre excède les 10 μ m sont arrêtées dans les voies aériennes supérieures (du nez au pharynx). En revanche, les

particules dont le diamètre est inférieur à 10µm vont pénétrer dans les voies aériennes inférieures (du larynx aux bronchioles). Il s'agit là de la déposition majoritaire des particules de diesel. A noter que les particules ultrafines dont le diamètre est inférieur à 2,5 µm vont atteindre les alvéoles pulmonaires. Par conséquent, plus les particules sont fines et pénètrent profondément, moins l'organisme a de facilités pour les éliminer.

I.2.b. Effets de la pollution sur la santé : études *in vivo*

Des études épidémiologiques ont montré un lien entre le niveau de pollution atmosphérique et la recrudescence de maladies respiratoires, en particulier des allergies et de l'asthme persistant. En effet, un accroissement de la morbidité et de l'incidence des maladies allergiques est associé aux pics de pollution.

Les études visant à comprendre l'effet des particules de diesel ont montré à la fois chez la souris et chez l'homme que ces particules jouaient un rôle d'adjuvant dans la production d'IgE (Figure 4).

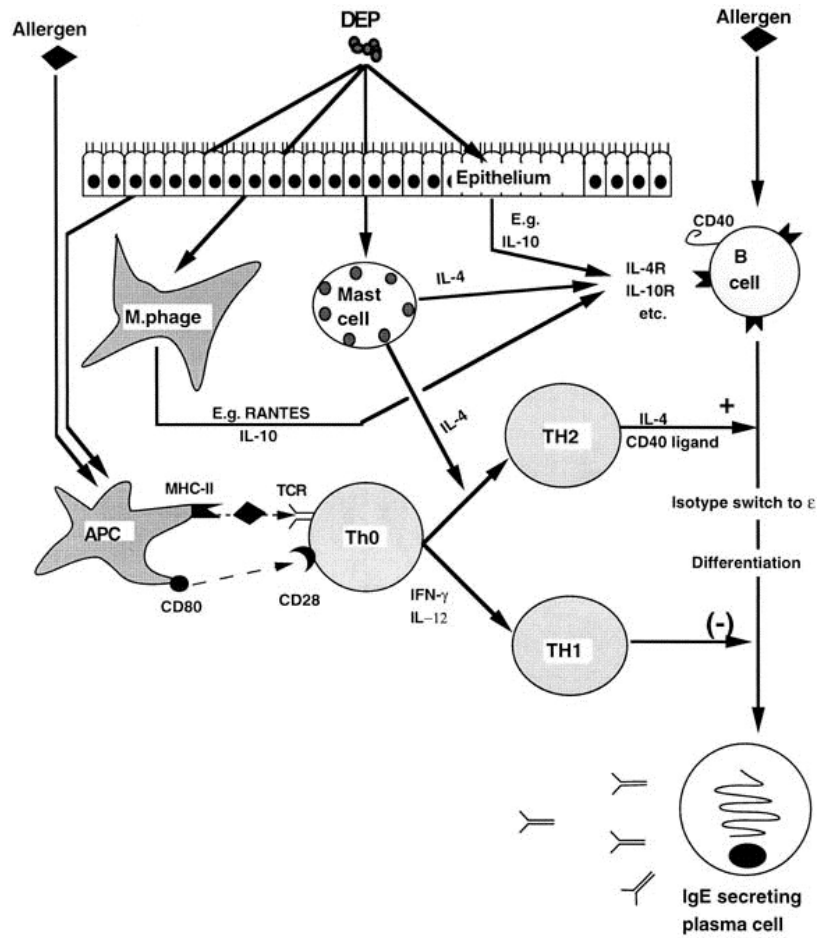


Figure 4 : Les différentes cibles cellulaires des particules de diesel et la contribution de ces cellules dans l'inflammation allergique et la production d'IgE. D'après Nel (Nel 1998).

I.2.b.i. Chez l'animal

L'étude réalisée par Muranaka *et al* montre une augmentation de la production des IgE totales suite à la co-administration de l'allergène et des DEP par voie intrapéritonéale (Muranaka 1986). D'autres études mettent cette fois en évidence l'augmentation des IgE spécifiques de l'allergène lors de la co-administration de l'allergène et des DEP en injection intrapéritonéale, intratrachéale ou lors d'inhalation (Fujimaki 1994; Fujimaki 1995; Fujimaki 1997; Suzuki 1993; Takafuji 1989). Les DEP induisent également une réaction inflammatoire, entraînant l'augmentation de la production d'IL-4 dans les ganglions médiastinaux après injection intratrachéale de l'allergène ou provocation allergénique par inhalation (Fujimaki 1994; Fujimaki 1995; Fujimaki 1997). Des études montrent que cette réaction inflammatoire a un profil de type Th-2, les DEP induisant la production d'IL-2, IL-4, IL-5 et de GM-CSF chez des animaux ayant reçu des injections intratrachéales (Takano 1997). Par ailleurs, dans un

modèle de rhinite allergique expérimentale induite par l'histamine chez le cobaye, les DEP augmentent les symptômes allergiques des animaux comme la fréquence d'éternuement, le volume des sécrétions et la résistance de l'épithélium nasal (Kobayashi 1997; Kobayashi 1995).

Toutes ces études réalisées chez l'animal montrent l'effet adjuvant des particules de diesel dans la réponse IgE quel que soit le mode d'administration. De plus, l'exposition à ces particules amplifie la réaction inflammatoire favorisant une réponse Th2.

I.2.b.ii. Chez l'homme

Les études réalisées chez l'homme se décomposent en deux parties : premièrement l'effet des particules de diesel sur la réaction allergique nasale et deuxièmement l'effet des particules de diesel inhalées sur les voies aériennes inférieures.

I.2.b.ii.. Aérosols de particules de diesel

L'exposition aux particules de diesel induit tout comme chez l'animal une augmentation de la production locale d'IgE et de la fréquence des cellules produisant des IgE dans les fluides de lavage nasal chez des individus non atopiques ainsi qu'un changement qualitatif dans la synthèse des IgE, à savoir un changement d'isoforme d'IgE par épissage alternatif de l'ARNm ϵ (Diaz-Sanchez 1994). Lors de la co-administration des particules de diesel avec l'allergène, en particulier l'allergène de l'ambrosie, chez des sujets qui y sont allergiques, on observe une augmentation de la production d'IgE spécifiques de l'allergène, une réponse cytokinique de type Th-2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13) et une diminution de la réponse de type Th1 (IFN- γ) dans les fluides de lavage nasal (Diaz-Sanchez 1997a; Diaz-Sanchez 1997b). Une étude a montré que les particules de diesel interagissaient avec l'allergène de l'ambrosie chez des sujets allergiques à l'ambrosie pour induire un switch isotypique μ vers ϵ des IgE dans les lymphocytes B issus des fluides de lavage nasal (Fujieda 1998). Enfin, chez des sujets atopiques, les particules de diesel induisent un afflux nasal de cellules inflammatoires comme les lymphocytes T, les monocytes et les granulocytes mais pas les éosinophiles, ainsi qu'une augmentation de la production locale de chimiokines de type C-C (RANTES, MCP-3, MIP-1 α) (Diaz-Sanchez 2000).

I.2.b.ii.. Inhalations de particules de diesel

Peu d'études s'intéressant aux effets *in vivo* des particules de diesel sur le poumon ont été réalisées. L'étude de Rudell *et al* a montré que l'inhalation de particules de diesel induisait

in vivo un afflux de neutrophiles et une diminution *in vitro* de la fonction phagocytaire des macrophages alvéolaires issus de lavages broncho-alvéolaires (Rudell 1999).

I.2.c. Effets de la pollution sur la santé : études *in vitro*

I.2.c.i. Sur le système immunitaire

I.2.c.i.. Les PBMC (cellules mononucléées du sang périphérique)

Les études suivantes montrent un effet synergique des particules de diesel avec l'allergène majeur de la poussière de maison Der p1 sur la réaction inflammatoire allergique. Ces études ont été réalisées sur des PBMC issus de patients allergiques à la poussière, et plus particulièrement à Der p1. Fahy *et al* ont montré un effet synergique des particules de diesel avec l'allergène Der p1 : l'association des HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) adsorbés aux particules de diesel avec Der p1 induit une augmentation de la production du TNF- α , de l'IL-8 et de RANTES, et l'augmentation de la chimioattraction des neutrophiles et des éosinophiles par les PBMC. L'effet des HAP sur la synthèse des cytokines est dépendant des MAP kinases Erk1/2 et p38 (Fahy 2000). Dans une autre étude, Fahy *et al* montrent que les particules de diesel favorisent le recrutement de cellules de type Th2 par les PBMC de patients allergiques à Der p1 en inhibant la production d'IP-10/CXCL10 et en potentialisant la production de MDC induite par Der p1. Ces effets font intervenir un dialogue entre les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules T, et en particulier une coopération entre les molécules CD28 et B7 (Fahy 2002).

Sénéchal *et al* ont démontré quant à eux que les HAP associés ou non à l'allergène Der p1 amplifiaient la réponse inflammatoire de type Th2 par augmentation de l'expression des chimiokines Th2 (I-309, MIG et PARC), augmentant ainsi la migration des lymphocytes Th2. Cependant, aucune augmentation de l'expression des récepteurs aux chimiokines de type Th2 n'a été observée (Senechal 2003).

Ces différentes études sur les PBMC montrent que l'exposition des PBMC aux particules de diesel favorise une réponse immunitaire de type Th2.

I.2.c.i.. Les macrophages alvéolaires

Les études réalisées sur des macrophages alvéolaires obtenus chez l'homme, la souris et le rat analysant l'effet des particules de diesel sur leurs fonctions montrent dans la majorité

des cas que les particules de diesel ont un effet néfaste sur la phagocytose et la sécrétion de médiateurs de l'inflammation.

Le travail d'Amakawa *et al* sur des macrophages alvéolaires humains et murins montre que les particules de diesel inhibent le relargage de médiateurs de l'inflammation (IFN- γ , TNF- α et IL-6) à l'état basal ou en réponse au LPS, suggérant ainsi que les particules de diesel vont à l'encontre d'une défense efficace de l'hôte (Amakawa 2003). Des résultats similaires ont été trouvés par Yin *et al* chez le rat. Dans ce modèle, les particules de diesel et en particulier leur fraction organique induisent l'expression de HO-1, une enzyme impliquée dans le métabolisme oxydatif, et la production d'IL-10, alors qu'elles inhibent la production de TNF- α et d'IL-12. Les auteurs suggèrent ici que les particules de diesel, en diminuant la réponse inflammatoire de l'hôte, favorisent la croissance bactérienne (Yin 2004).

L'étude réalisée par Lundborg *et al* montre que les particules de diesel induisent une inhibition générale de la fonction de phagocytose des macrophages alvéolaires, induisant probablement une augmentation de la sensibilité aux infections par des microorganismes (Lundborg 2006).

Une étude récente de Yin *et al* montre de la même manière que les particules de diesel et particulièrement leurs extraits organiques inhibent la bactéricidie des macrophages alvéolaires de rat infectés préalablement par *Listeria monocytogenes* (Yin 2007).

En conclusion, toutes ces études montrent que la déposition des particules de diesel dans les poumons a des effets néfastes sur les fonctions des macrophages, diminuant la clairance pulmonaire de la bactérie et augmentant la sensibilité du poumon aux infections bactériennes.

I.2.c.i.. Les cellules dendritiques

Deux études réalisées par Bleck *et al* et Verstraelen *et al* sur des DC humaines ont montré que les particules de diesel seules n'avaient pas d'effet sur la maturation des DC. En revanche, la coculture de DC immatures avec des cellules épithéliales bronchiques humaines exposées à des particules de diesel induit la maturation des DC. Cette maturation est dépendante de la production de GM-CSF par les cellules épithéliales bronchiques (Bleck 2006). Verstraelen *et al* montrent quant à eux l'effet adjuvant des particules de diesel sur la maturation des DC puisque l'association des particules de diesel au LPS potentialise la maturation des DC par rapport au LPS seul (Verstraelen 2005). Une autre étude réalisée sur des DC humaines montre que les particules de diesel induisent préférentiellement une réponse

immunitaire de type Th2. En effet, l'exposition des DC aux particules de diesel inhibe leur production d'IL-12p40 et p35 au niveau des ARN et d'IL-12p40 et p70 au niveau protéique, mais induit l'expression de l'IL-1 β au niveau des ARN. Ceci a pour conséquence l'inhibition de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T mis en coculture avec ces DC. Ces effets sont médiés par le stress oxydatif induit par les particules de diesel dans les DC (Ohtani 2005).

Enfin, des résultats similaires ont été obtenus chez la souris. Chan *et al* montrent que les particules de diesel inhibent la maturation induite par le LPS des DC issues de la moelle osseuse ou de la lignée de DC BC1, et ce par inhibition de l'activation de NF- κ B. En parallèle avec les études réalisées chez l'homme, les particules de diesel inhibent la production d'IFN- γ par les lymphocytes T mis en coculture avec ces DC, et, de plus, induisent la production d'IL-10. Ces effets impliquent vraisemblablement l'effet inhibiteur des particules de diesel sur la maturation et la production d'IL-12 par les DC stimulées par les ligands de TLR2, 3, 4 et 9. Les auteurs montrent enfin que les particules de diesel provoquent un stress oxydatif ayant pour conséquence l'induction de l'expression d'enzymes de détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Chan 2006).

Toutes ces études réalisées sur les DC montrent la capacité des DEP à modifier le comportement des DC vers un profil de type Th2. L'effet des particules de diesel passe par l'induction d'un stress oxydatif dans la cellule.

I.2.c.ii. Sur les cellules épithéliales bronchiques

Les études visant à comprendre les effets des particules de diesel sur l'épithélium bronchique ont été réalisées sur des lignées telles que les 16HBE14o-, les BEAS-2B ou encore les A549, mais également sur des cultures primaires de cellules épithéliales nasales et bronchiques.

Une étude morphologique réalisée sur des 16HBE14o- a montré que l'exposition des cellules aux particules de diesel diminuait la capacité des cellules à adhérer à la matrice extracellulaire en diminuant la rigidité du cytosquelette d'actine, l'expression des molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire ainsi que la prolifération des cellules et par conséquent la capacité à réparer une zone lésée. Les auteurs montrent également que les particules de diesel sont phagocytées par les cellules épithéliales bronchiques (Doornaert 2003).

Les études suivantes montrent que les particules de diesel induisent l'activation des cellules épithéliales, et que cet effet passe par la production d'espèces réactives de l'oxygène induites par les particules de diesel. Takizawa *et al* montrent ainsi que l'exposition des BEAS-

2B aux particules de diesel induit la production d'IL-8 grâce à l'activation de NF- κ B, l'effet des particules de diesel faisant intervenir le métabolisme oxydatif (Takizawa 1999). Boland *et al* démontrent que les particules de diesel induisent la production de GM-CSF, d'IL-8 et d'IL-1 β . Ils montrent également que la production de GM-CSF dépend des composés organiques adsorbés sur les particules de diesel (Boland 1999). La sécrétion de GM-CSF consécutive à l'exposition aux particules de diesel et à leur phagocytose par les cellules épithéliales bronchiques (16HBE14o-) fait intervenir les espèces réactives de l'oxygène ainsi que la voie des tyrosines kinases (en partie les MAPK) (Boland 2000). Bonvallet *et al* confirment que les particules de diesel, via les DEP-PAH adsorbés à leur surface, induisent un stress oxydatif qui a pour conséquence l'activation de NF- κ B ainsi que sa translocation nucléaire et l'activation des MAP kinases. Cela entraîne la production de GM-CSF et l'expression du cytochrome P450 qui semble impliqué dans le métabolisme des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Bonvallet 2001). Enfin, l'étude de Ciencewicki *et al* montre que les particules de diesel altèrent la réponse immunitaire au virus Influenza A en augmentant l'expression et la fonction du TLR3 (Ciencewicki 2006).

L'ensemble de ces données démontre l'impact des particules de diesel sur les cellules pulmonaires (cellules épithéliales bronchiques et macrophages alvéolaires) ou de l'immunité (DC et lymphocytes T) : elles limitent les réactions de défense de l'hôte face aux pathogènes et favorisent l'induction d'une réponse de type Th2.

II. L'épithélium bronchique

II.1. Physiologie

II.1.a. Anatomie

Un épithélium est formé de cellules jointives, juxtaposées, solidaires les unes des autres par un système de jonctions et séparées du tissu conjonctif sous-jacent par une lame basale.

Il existe deux types d'épithéliums : les épithéliums de revêtement (qui tapissent les différentes cavités de l'organisme ainsi que la surface du corps) et les épithéliums glandulaires.

La structure de l'épithélium respiratoire varie en fonction du diamètre des voies aériennes et se divise en trois types différents en fonction du site anatomique : l'épithélium

trachéo-bronchique, bronchiolaire et alvéolaire (Figure 5). Au niveau trachéo-bronchique, l'épithélium respiratoire est un épithélium de revêtement pseudo-stratifié prismatique/cylindrique cilié contenant des cellules à mucus. Quatre types cellulaires le composent : cellules ciliées, caliciformes, intermédiaires et basales. Cette pseudo-stratification disparaît au niveau des bronchioles, où l'épithélium est alors monostratifié prismatique/cylindrique et composé de trois types cellulaires : cellules ciliées, neuroépithéliales et de Clara. Enfin, l'épithélium alvéolaire est de type monostratifié et composé de deux types cellulaires : les pneumocytes de type I et de type II.

Au moins huit types de cellules épithéliales, distincts d'un point de vue morphologique, sont présents dans l'épithélium respiratoire humain. Cependant, en se basant sur leurs propriétés ultrastructurales, fonctionnelles et biochimiques, celles-ci peuvent être classées en trois catégories : les cellules basales, les cellules ciliées et les cellules sécrétoires.

Les cellules épithéliales ciliées représentent le principal type cellulaire retrouvé dans l'épithélium respiratoire, soit plus de 50% de l'ensemble des cellules épithéliales (Spina 1998). Les cellules ciliées constituent un stade terminal de différenciation et ont pour origine les cellules basales ou sécrétoires (Ayers 1988). Les cellules ciliées sont ancrées à la lame basale et s'étendent jusqu'à la lumière bronchique. Leur rôle est d'assurer la clairance mucociliaire qui permet l'élimination des aéro-contaminants et des micro-organismes. Cette fonction est assurée par les cils situés au pôle apical des cellules (200 à 300 par cellule).

Les cellules caliciformes, ou à mucus, sont caractérisées par la présence de granules peu denses aux électrons, qui contiennent des mucines acides sécrétées pour piéger les contaminants dans la lumière bronchique (Jeffery 1983). La régulation de la production et la sécrétion de mucus est primordiale pour le bon fonctionnement de l'appareil muco-ciliaire. Au niveau des bronchioles respiratoires et terminales, les cellules caliciformes sont remplacées par des cellules sécrétoires contenant des granules denses aux électrons appelées cellules de Clara. Les cellules caliciformes sont capables de se différencier en cellules épithéliales ciliées (Evans 1988).

Les cellules intermédiaires sont également ancrées à la membrane basale mais n'atteignent pas la lumière des voies respiratoires. Ces cellules seraient issues de la division des cellules caliciformes au cours du processus de stratification (Jeffery 1997).

Les cellules basales sont des cellules ubiquitaires au niveau des voies aériennes. Cependant, leur nombre diminue avec le calibre des voies respiratoires (Evans 1990; Evans 1988). Ce sont les seules cellules de l'épithélium qui adhèrent fermement à la membrane basale, via des héli-desmosomes. Ces cellules basales sont des cellules progénitrices

capables de se différencier en cellules caliciformes ou en cellules ciliées (Boers 1998). De plus, les cellules basales peuvent sécréter des molécules bio-actives comme de l'endopeptidase, les produits de la 15-lipoxygénase et des cytokines.

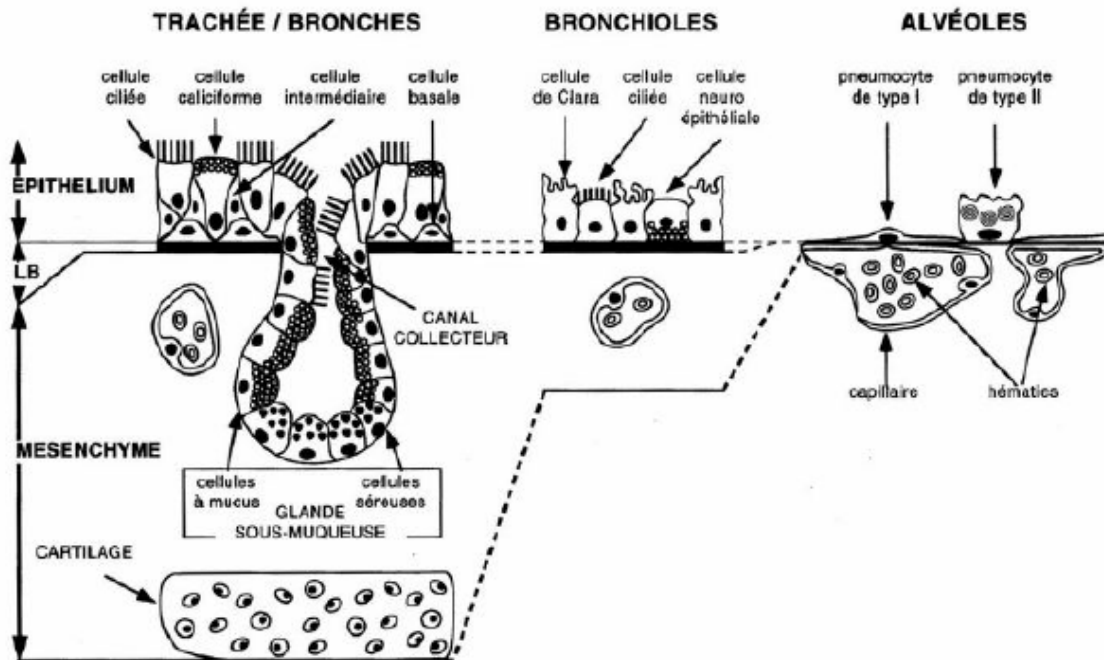


Figure 5 : Les différents épithéliums respiratoires de surface en fonction du site anatomique

II.1.b. Fonctions

Les épithéliums de revêtement possèdent de nombreuses fonctions, parmi lesquelles on peut citer l'épuration mucociliaire, une fonction de barrière, l'immunorégulation et enfin un rôle dans l'inflammation. L'épithélium alvéolaire constitue une surface d'échanges entre l'air et le sang. L'épithélium bronchique assure aussi un rôle de protection vis-à-vis du milieu extérieur qui peut être mécanique grâce à la cohésion des cellules entre elles. Toutefois, cette protection peut également être physico-chimique grâce au mucus synthétisé par les cellules épithéliales. Ainsi, les cellules épithéliales bronchiques (CEB) sont impliquées dans la clairance muco-ciliaire, grâce aux mouvements des structures de surface à l'aide de cils vibratiles. Le mucus capte les particules, alors que les cils vibratiles les mobilisent et les rejettent vers l'extérieur du fait des battements coordonnés des cils. Par ailleurs, l'ensemble de l'arbre trachéo-bronchique et de la surface des alvéoles est recouvert d'un film liquidien dont

l'épaisseur décroît de la trachée aux alvéoles. Il permet le maintien des échanges thermiques et hydriques, et le fonctionnement de l'ascenseur muco-ciliaire vis-à-vis des particules et des bactéries inhalées. Ce fonctionnement est perturbé dans de nombreuses pathologies pulmonaires (mucoviscidose, asthme, broncho-pneumopathie obstructive chronique, ...). Ce film liquidien a également un rôle très important à l'étage alvéolaire. L'ouverture des alvéoles est liée à la baisse de la tension superficielle du film qui les tapisse, une baisse due à la présence de surfactant.

De part ses fonctions sécrétoires, l'épithélium bronchique est à la fois impliqué dans les mécanismes de défense de l'hôte et dans la genèse de pathologies inflammatoires touchant les voies aériennes. En effet, les cellules épithéliales bronchiques sont capables de produire de nombreux médiateurs comme des dérivés lipidiques, des facteurs de croissance, des peptides broncho-constricteurs ou encore des cytokines et des chimiokines.

Le rôle de barrière intervenant dans la préservation de la muqueuse bronchique est assuré par la cohésion entre les cellules épithéliales permise par l'existence de jonctions intercellulaires.

II.1.c. Jonctions

Afin de préserver l'homéostasie au sein des organismes multicellulaires, l'isolation et la compartimentalisation de l'environnement interne sont essentielles. Les cellules épithéliales polarisées jouent non seulement un rôle de barrière, en limitant la diffusion intercellulaire de molécules, mais aussi un rôle dans la protection de l'organisme contre les micro-organismes, en plus de leur rôle dans la sécrétion de protéines et le transport d'ions et de nutriments.

Les différents systèmes de jonctions vont permettre non seulement la cohésion des cellules entre elles, mais également la cohésion des cellules avec les constituants de la matrice extracellulaire sous-jacente.

La cohésion des cellules épithéliales est établie grâce à plusieurs types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions gap (Figure 6). Seules les jonctions serrées et adhérentes sont reliées au cytosquelette d'actine et aux protéines intervenant dans les différentes voies de signalisation (Figure 7).

Nous nous focaliserons particulièrement sur les jonctions serrées et adhérentes.

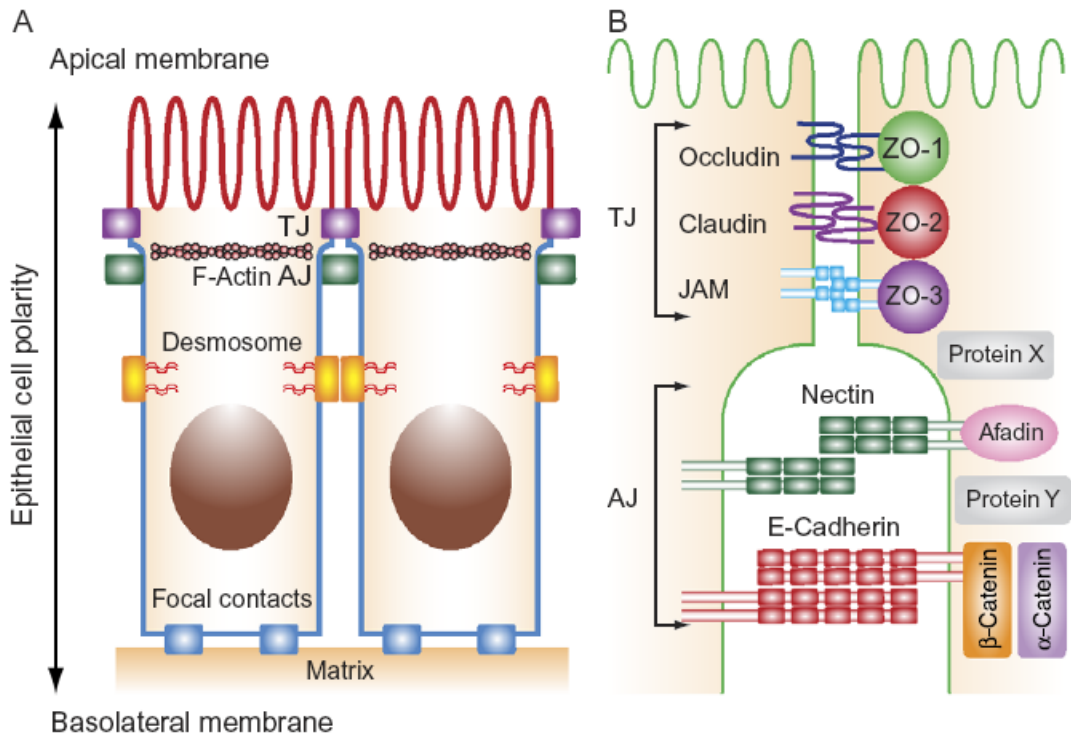


Figure 6 : Organisation d'un épithélium cylindrique simple. **A.** Représentation des jonctions serrées et adhérentes entre deux cellules épithéliales adjacentes. **B.** Détail des jonctions serrées et adhérentes entre deux cellules adjacentes. TJ : Tight Junction ; AJ : Adherens Junction. D'après Miyoshi (Miyoshi 2005).

The apical junctional components

Junctional components	Binding partners	Function and properties
TJs		
Occludin	ZO-1, ZO-2, ZO-3, JEA	Sealing neighboring cells
Claudins	ZO-1, ZO-2, ZO-3, Afadin ^a , Cingulin ^a	Regulation of paracellular permeability
JAMs	ZO-1, ZO-2, ZO-3, PAR3/PAR6/aPKC, MAGI-1, Afadin ^a , Cingulin	Regulation of cell polarity, permeability, and transendothelial migration Homophilic and heterophilic <i>trans</i> -dimers
AJs		
Cadherins	α -Catenin, β -Catenin, γ -Catenin, P120 catenin	Ca ²⁺ -dependent cell adhesion Homophilic <i>trans</i> -dimers
Nectins	Afadin PAR3/PAR6/aPKC	Homophilic and heterophilic <i>trans</i> -dimers Regulation of cell polarity Formation of primordial junctions
Non-junctional region in the basolateral membrane		
Necls	Pals2, Lin-7 ^a , DAL-1, MPP3 (all for Necl-2)	Homophilic and heterophilic <i>trans</i> -dimers Formation of primordial junctions Regulation of cell migration Regulation of extracellular signaling mediated by growth factors and cytokines

^a The binding is indirect.

Figure 7 : Protéines impliquées dans les complexes jonctionnels apicaux. TJ : Tight Junction ; AJ : Adherens Junction. D'après Miyoshi (Miyoshi 2005)

II.1.c.i. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées ont été décrites pour la première fois en 1963 par Farquhar et Palade en observant des coupes ultrafines d'épithélium par microscopie électronique à transmission. Les jonctions serrées consistent en un réseau de fils/brins parallèles ou interconnectés où les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes sont fusionnées/en contact intime, oblitérant ainsi l'espace intercellulaire.

Les jonctions serrées jouent un rôle majeur dans l'établissement de la polarité de l'épithélium. Elles forment une ceinture apicale séparant la cellule en un compartiment apical et un compartiment basolatéral, empêchant ainsi la diffusion latérale des composés lipidiques et protéiques apicaux et baso-latéraux de la membrane plasmique. Elles constituent une barrière semi-perméable pour les ions et solutés en régulant leur diffusion par la voie paracellulaire (Miyoshi 2005). Elles sont composées de 3 groupes de protéines de jonctions proprement dites qui sont associées par l'intermédiaire de protéines adaptatrices.

II.1.c.i.. Occludine

L'occludine est constituée de 4 domaines transmembranaires, et 2 boucles extracellulaires (Figure 6B). Ses extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques (Feldman 2005). L'occludine est exprimée au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales et des cellules endothéliales (Furuse 1993). Elle est également exprimée par les DC (Rescigno 2001). Son rôle au niveau des jonctions serrées n'est pas clairement défini. Des expériences *in vitro* montrent qu'elle participe au maintien de la résistance électrique transcellulaire ainsi qu'à la régulation du flux paracellulaire. En effet, de façon contradictoire, la surexpression d'Occludine dans des cellules MDCK augmente la résistance électrique transcellulaire ainsi que le flux paracellulaire. Dans cette étude, l'expression de l'Occludine est induite par l'IPTG. Les auteurs expliquent la contradiction par le fait qu'au début de l'expérience, le niveau d'expression de l'Occludine est faible, et que toute l'occludine exprimée peut s'associer avec les protéines Zonula Occludens-1 (ZO-1) des cellules MDCK, ce qui est en corrélation avec une résistance transépithéliale élevée et un faible flux de mannitol. En revanche, lorsqu'on allonge la durée de l'expérience, le niveau d'expression de l'Occludine est tel que la protéine ZO-1 est en quantité insuffisante pour s'associer à l'Occludine, ce qui corréle avec une résistance transépithéliale et un flux de mannitol élevés (McCarthy 1996). En outre, des études *in vivo* ont montré qu'elle n'était pas indispensable à l'établissement des

jonctions serrées, puisque des cellules souches embryonnaires dépourvues des 2 allèles du gène de l'Occludine sont capables d'établir des jonctions serrées entre elles (Saitou 1998).

Il existe une corrélation entre le niveau d'expression de l'Occludine et les propriétés de la barrière jonctionnelle dans divers tissus. Notamment, l'occludine est exprimée à un niveau d'expression protéique 18 fois plus élevé dans les cellules endothéliales artérielles que dans les cellules endothéliales veineuses, ce qui a pour conséquence de limiter la perméabilité aux solutés (Kevil 1998).

Enfin, au niveau des complexes jonctionnels, l'Occludine hyperphosphorylée s'associe à la protéine ZO-1.

Certains facteurs ont une action sur l'intégrité de la barrière jonctionnelle. L'interleukine-1 β diminue l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, réduisant ainsi la transmigration des neutrophiles, en induisant la dissociation de l'Occludine et de ZO-1 (Bolton 1998). De la même manière, la barrière épithéliale pulmonaire peut être rompue et la perméabilité paracellulaire augmentée par clivage de l'Occludine par l'activité cystéine-protéase de l'allergène Der p1 (Wan 1999).

En dehors de son rôle structural dans les jonctions serrées, l'Occludine peut interagir avec des protéines régulatrices. Par exemple, l'Occludine interagit avec c-Yes, une tyrosine kinase responsable de sa phosphorylation (Chen 2002b). Enfin, l'Occludine est régulée par ubiquitination, puisqu'elle s'associe *in vitro* et *in vivo* à Itch (E3 ubiquitin-protein ligase (Traweger 2002)).

II.1.c.i.. Claudines

Les Claudines constituent une famille de petites protéines de 20-24kDa, composées de 4 domaines transmembranaires, 2 domaines extracellulaires, et dont les extrémités C- et N-terminales sont cytoplasmiques (Figure 6B). De la même manière que l'Occludine, elles interagissent avec ZO-1, mais aussi avec ZO-2 et 3.

Les différentes Claudines décrites ont une distribution tissulaire et des propriétés physiologiques spécifiques. En effet, la surexpression de la Claudine-1 dans des cellules MDCK augmente la résistance transépithéliale (TER) (Inai 1999), alors que la surexpression de la Claudine-2 dans des cellules MDCK diminue ce TER (Furuse 2001). On observe un effet similaire en situation pathologique, en particulier dans le cas de rectocolite hémorragique. L'augmentation de la production d'IL-13, une cytokine de type Th-2 par les cellules mononucléées de la lamina propria induit une diminution de la résistance

transépithéliale au niveau de l'épithélium intestinal, due à l'augmentation de l'expression de la Claudine-2 (Heller 2005). Par ailleurs, les Claudines jouent un rôle important dans la régulation des flux d'ions par la voie paracellulaire. On note l'absence de jonctions serrées au niveau des feuillettes de myéline constitués par les oligodendrocytes chez des souris n'exprimant pas la Claudine-11 (Gow 1999).

Les différents membres de la famille des Claudines peuvent s'associer entre eux. Par exemple, la Claudine-3 peut s'associer aux Claudines-1 et -2, alors que la Claudine-1 ne peut pas s'associer à la Claudine-2 (Furuse 1999).

Enfin l'interaction des Claudines avec ZO-1 est nécessaire à leur localisation et leur rétention au niveau des jonctions serrées (Kobayashi 2002).

II.1.c.i. JAM

Les JAM (Junctional Adhesion Molecules) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines (Martin-Padura 1998). Elles ont une double fonction, participant non seulement à la polarisation des cellules épithéliales et endothéliales, mais régulant également les interactions des leucocytes et des plaquettes avec l'endothélium ainsi que la migration transendothéliale (Ebnet 2004). On dénombre 4 protéines JAM. JAM-1 établit des liaisons homophiliques et facilite ainsi l'adhésion cellulaire (Figure 7B). Il régule la perméabilité des jonctions serrées ainsi que le trafic des lymphocytes grâce à sa capacité à lier LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1). JAM-2 est exprimé par les cellules endothéliales et les lymphocytes. Il joue un rôle central dans la migration transendothéliale. JAM-3 est exprimé par les plaquettes, et permet l'interaction entre plaquettes et leucocytes en liant Mac-1. Enfin JAM-4 est localisé au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales du jéjunum, de l'iléon et des tubules rénaux proximaux. Il joue un rôle dans la régulation de la perméabilité des jonctions serrées (Miyoshi 2005).

II.1.c.ii. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes forment une ceinture adhérente située au dessus et en dessous des jonctions serrées (Figure 6). Contrairement aux jonctions serrées où les membranes plasmiques fusionnent, il existe un espace intercellulaire d'environ 15 à 20nm. On note la présence de nombreuses protéines impliquées dans la liaison au cytosquelette, mais aussi dans la transduction de signaux intra- et extracellulaires. Les jonctions adhérentes jouent un

rôle important dans la stabilisation des jonctions serrées de par leur localisation, mais aussi dans la coordination de nombreux processus cellulaires.

II.1.c.ii.. Les Cadhérines

La famille des Cadhérines comporte plus de 80 membres (Figure 8). La E et la N-Cadhérine sont les membres les mieux caractérisés. Elles sont constituées de 5 domaines extracellulaires capables de lier le calcium et permettant ainsi la liaison homophile dépendante du calcium entre 2 Cadhérines de cellules adjacentes. Sa partie cytoplasmique est en relation avec le cytosquelette d'actine mais également avec des éléments de signalisation tels que les Caténines (Figure 7). C'est d'ailleurs le complexe E-Cadhérine/ β -Caténine qui permet le transport à la membrane de la E-Cadhérine nouvellement synthétisée.

La E-Cadhérine est impliquée dans la formation de l'épithélium polarisé, puisqu'elle initie, avec les Nectines, le développement des jonctions adhérentes de par son expression au niveau des lamellipodes et des filopodes (Miyoshi 2005).

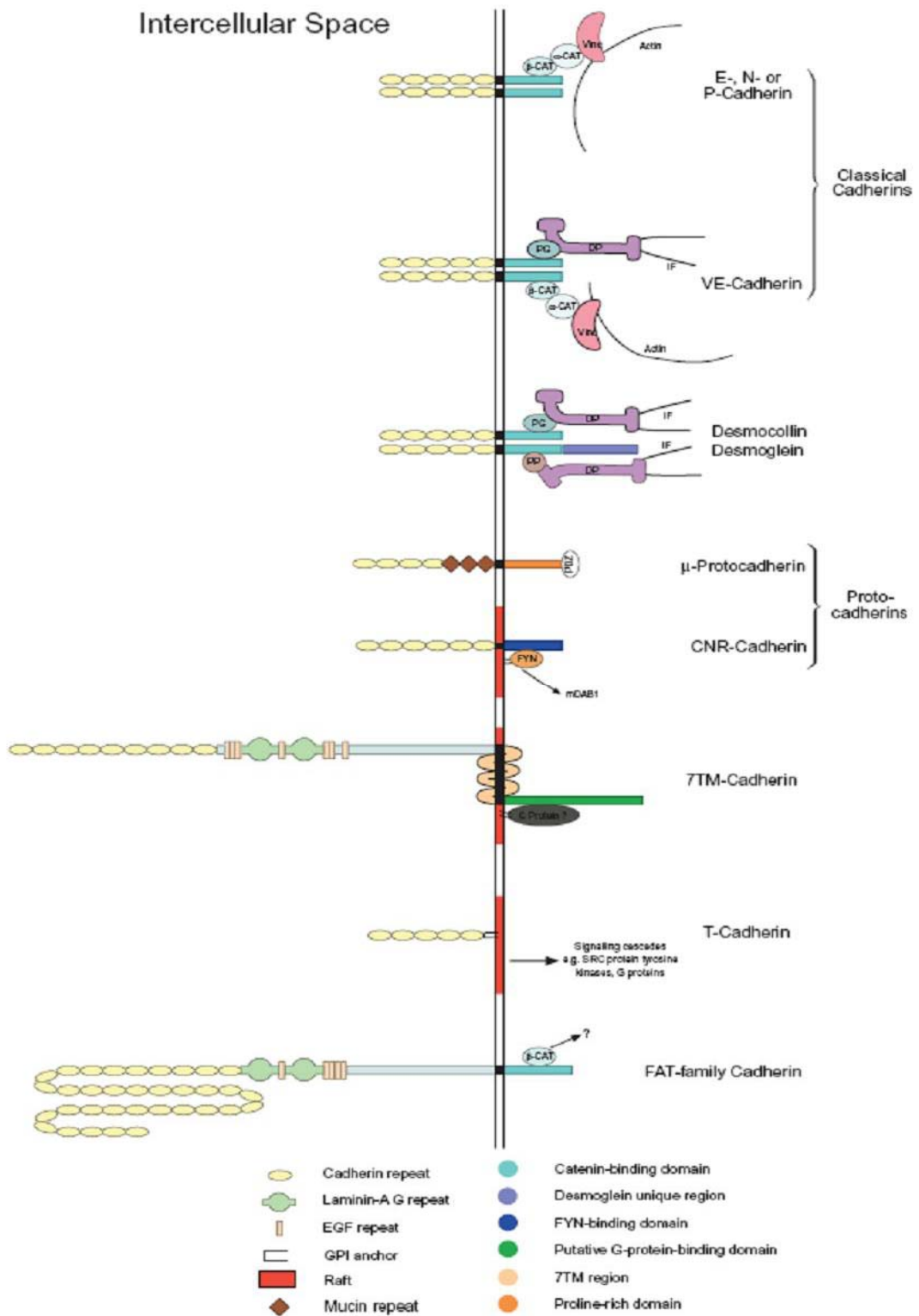


Figure 8 : Superfamille des Cadhérines. D'après Angst (Angst 2001).

La VE-Cadhérine a une structure similaire aux N- et E-Cadhérines. Elle est exprimée par les cellules endothéliales tout comme la N-Cadhérine. Cependant, contrairement à la N-cadhérine qui est distribuée sur toute la circonférence de la cellule endothéliale, la VE-Cadhérine n'est exprimée qu'au niveau des jonctions adhérentes (Dejana 1999). Au niveau de sa partie cytoplasmique, elle peut lier traditionnellement la β -Caténine, ou encore des protéines impliquées dans les desmosomes, à savoir la plakoglobine et la desmoplakine qui permettent la liaison de la VE-Cadhérine avec les filaments intermédiaires de vimentine (Kowalczyk 1998).

Les Cadhérines desmosomales sont des protéines transmembranaires présentes au niveau des desmosomes. Les desmosomes permettent une adhésion intercellulaire et sont particulièrement présents dans les tissus subissant d'importantes contraintes mécaniques comme l'épiderme, le myocarde ou le poumon. La famille des Cadhérines desmosomales se décompose en 2 sous-familles : la Desmocolline et la Desmogléine. La Desmocolline et la Desmogléine ont une structure similaire à la E-Cadhérine. Au niveau cytoplasmique, elles interagissent avec des protéines appartenant à la même famille que la β -Caténine, à savoir la plakoglobine, la plakophiline et la desmoplakine. Les interactions avec ces protéines permettent aux Cadhérines desmosomales d'être en relation avec les filaments intermédiaires du cytosquelette (Angst 2001).

Notons qu'il existe également des Protocadhérines, impliquées dans le développement, et exprimées au niveau du système nerveux chez les mammifères, des Cadhérines à 7 domaines transmembranaires qui semblent impliquées dans l'établissement de la polarité cellulaire, et enfin des T-cadhérines, qui semblent elles être davantage impliquées dans la signalisation cellulaire plutôt que l'adhésion intercellulaire (Angst 2001).

II.1.c.ii.. Les Nectines

Les nectines forment des jonctions indépendantes du calcium. Elles établissent et maintiennent des complexes jonctionnels qui peuvent se situer à proximité des Cadhérines (Figure 6B). La famille des nectines comporte 4 membres exprimés ubiquitairement, aussi bien au niveau des épithéliums que des neurones et des fibroblastes (Takai 2003). La Nectine-2 est exprimée par les cellules hématopoïétiques, la Nectine-3 par les spermatozoïdes, et la Nectine-4 est principalement exprimée au niveau du placenta humain alors que son panel d'expression est plus large chez la souris. Les nectines peuvent se décomposer en 3 régions : un domaine extracellulaire constitué de 3 boucles Ig-like jouant un rôle important dans

l'adhésion intercellulaire (Yasumi 2003), une région transmembranaire et une région C-terminale intracytoplasmique permettant la liaison au domaine PDZ de l'Afadin (Reymond 2000). De la même manière que le complexe Cadhérine-Caténine, le complexe Nectine-Afadin est en relation avec le cytosquelette d'Actine, et participe à l'organisation des jonctions adhérentes en collaboration avec les complexes Cadhérine-Caténine.

II.1.c.iii. Les protéines adaptatrices cytoplasmiques

Les protéines adaptatrices des complexes jonctionnels se lient à l'extrémité C-terminale des protéines d'adhésion cellulaire, permettant à ces dernières d'interagir directement ou indirectement avec le cytosquelette d'actine.

II.1.c.iii.. Les protéines ZO

ZO-1 est une phosphoprotéine de 220 kD constituée d'un domaine PDZ, d'un domaine Src-homology (SH)-3 et d'un domaine guanylate kinase inactif (Mitic 1998).

Les protéines adaptatrices de la famille ZO sont situées à la face cytoplasmique de la membrane plasmique au niveau des jonctions serrées. Les protéines ZO lient les protéines de jonctions serrées par leur extrémité N-terminale et la F-Actine par leur extrémité C-terminale (Gumbiner 1991; Haskins 1998; Stevenson 1986). Ce complexe forme une ceinture périjonctionnelle qui régule la perméabilité des jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales.

Par ailleurs, les protéines ZO-1 et -2 peuvent s'associer aux jonctions adhérentes dans les cellules ne formant pas de jonctions serrées telles que les fibroblastes ou les myocytes cardiaques (Itoh 1999).

Les protéines ZO peuvent interagir entre elles : une étude a montré que ZO-1 pouvait interagir avec ZO-2 et -3 via leur domaine PDZ (Haskins 1998; Wittchen 1999).

ZO-1 intervient indirectement dans l'interaction de la E-Cadhérine avec le cytosquelette d'Actine en interagissant avec l' α -Caténine (Itoh 1999). ZO-1 peut également interagir avec les connexines des jonctions gap (Giepmans 1998).

ZO-1 et -2 peuvent être impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que la génèse de certains cancers lorsqu'ils sont localisés dans le noyau des cellules qui n'ont pas encore atteint la confluence. Dans le noyau, ZO-1 interagit via son domaine SH3 avec le facteur de transcription ZONAB (ZO-1 associated nucleic acid-binding protein) et régule

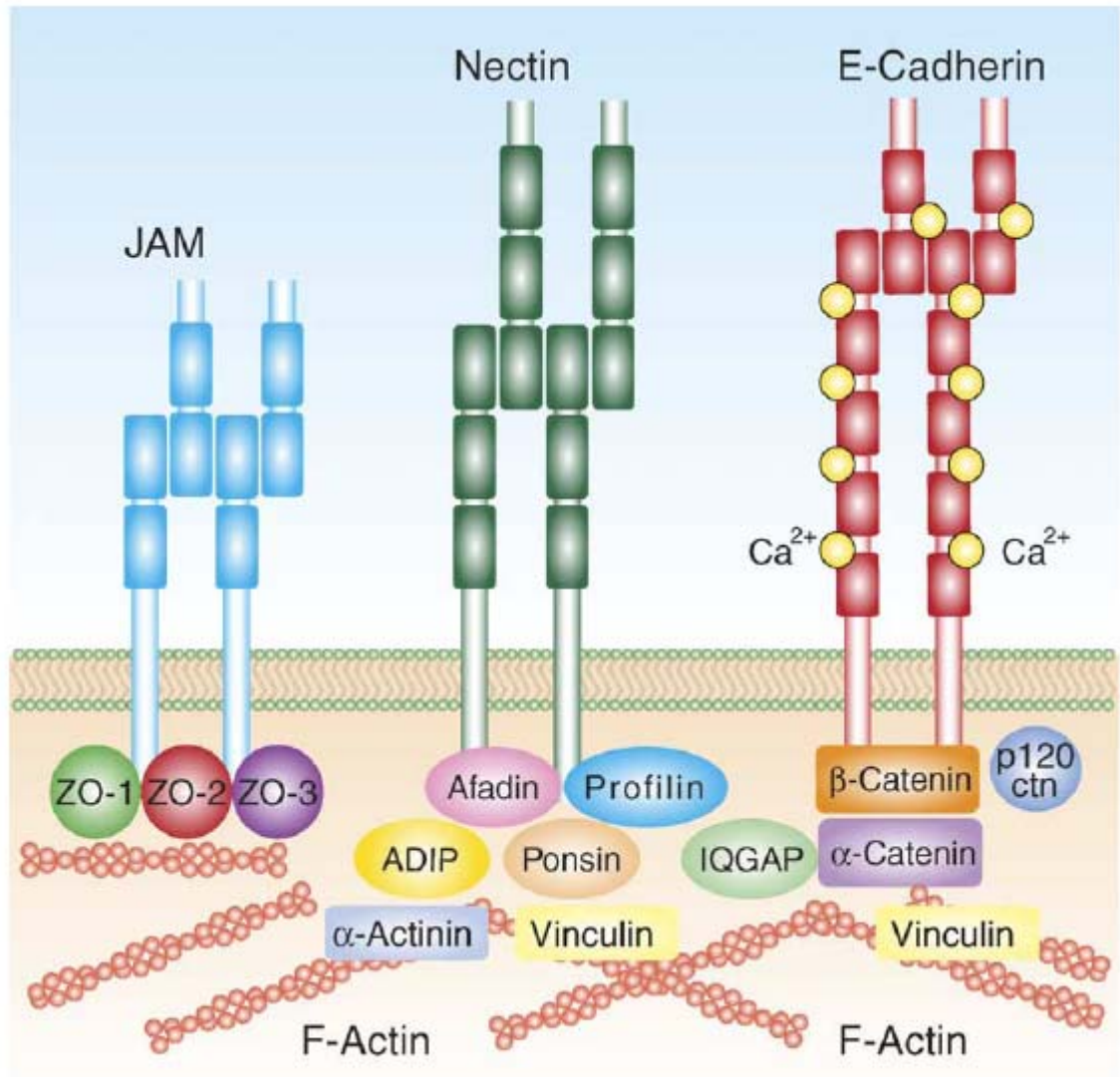


Figure 9 : Interactions entre le cytosquelette d'Actine et les différents composants des jonctions adhérentes et serrées. D'après Miyoshi (Miyoshi 2005).

l'expression de gènes tels que ErbB-2 (Balda 2000). De plus, des études suggèrent que les protéines ZO pourraient avoir un rôle de suppresseur de tumeurs, puisque l'expression de ZO-1 est réprimée dans de nombreux cancers du sein, et l'expression de ZO-2 est réprimée dans les adénocarcinomes pancréatiques (Chlenski 1999a; Chlenski 1999b; Hoover 1998).

Enfin, les protéines ZO peuvent réguler la différenciation cellulaire. En effet le mutant de ZO-1 ne contenant que son domaine PDZ N-terminal ne se localise pas au niveau des jonctions serrées dans des cellules MDCK et induit une transition épithélio-mésenchymateuse probablement en activant la voie de signalisation faisant intervenir la β -Caténine (Reichert 2000).

II.1.c.iii.. Les protéines PAR

Les protéines PAR ont d'abord été identifiées chez *C. elegans* comme étant des protéines impliquées dans la polarité. PAR-3 peut interagir avec JAM-1 (Figure 7) dans les cellules épithéliales (Itoh 2001), mais également avec les Nectines-1 et -3 dans les cellules neuroépithéliales embryonnaires (Takekuni 2003), avec la même affinité pour les 3 protéines. PAR-3 peut former un complexe ternaire avec PAR-6 et avec une PKC atypique (aPKC) (Joberty 2000; Lin 2000). Enfin, une étude a démontré la localisation de PAR-3 au niveau des jonctions serrées et adhérentes dans des cellules épithéliales (Muller 2000a).

II.1.c.iii.. Les Caténines

L' α -Caténine est impliquée dans la régulation de l'assemblage des complexes protéiques interagissant avec la E-Cadhérine ; la β -Caténine quant à elle, permet l'ancrage de ce complexe avec le cytosquelette d'Actine.

L' α -Caténine peut s'associer directement à la F-Actine par son domaine C-terminal, mais pas à l'Afadine ou à l' α -Actinine. Sa liaison avec l'Afadine permet de recruter des complexes protéiques faisant intervenir la E-cadhérine ainsi que des complexes faisant intervenir les Nectines au niveau des jonctions adhérentes (Pokutta 2002). Son interaction avec l' α -Actinine au niveau des jonctions adhérentes permet de renforcer et de stabiliser la liaison de la jonction adhérente avec le cytosquellette d'actine (Pokutta 2002; Vasioukhin 2000).

La β -Caténine se lie préférentiellement à l' α -Caténine et la E-Cadhérine au niveau de la membrane et non pas à la Cadhérine desmosomale. Elle intervient par ailleurs dans la voie

de signalisation Wnt. En dehors de son rôle dans l'adhésion des cellules, la β -Caténine intervient également dans le processus de cancérisation. Ainsi, on la trouve complexée aux molécules de la voie Wnt APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axine, GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) dans le cytoplasme. Ce complexe permet la phosphorylation de la β -Caténine et sa dégradation par le protéasome. Dans le processus de cancérisation, il n'est pas rare que la voie Wnt soit activée. Dans ce cas, la β -Caténine n'est plus complexée à APC/Axine/ GSK-3 β entraînant ainsi sa translocation nucléaire, où elle joue alors un rôle de facteur de transcription en se liant aux T-Cell factors, permettant ainsi la transcription de nombreux gènes comme c-Myc ou la Cycline D1 entre autres. Cette action de la β -Caténine, et plus généralement l'activation de la voie Wnt est fréquemment observée dans les cancers du colon, les cancers gastriques ou encore hépatiques pour ne citer que les cancers de la sphère intestinale (Doucas 2005). La β -Caténine joue également un rôle mineur dans les cancers pulmonaires, puisque son gène est très rarement muté. En revanche, trois études ont montré que la surexpression de la β -Caténine dans les cancers du poumon était liée à un bon pronostic (Hommura 2002; Kase 2000; Retera 1998).

La γ -Caténine se lie préférentiellement à la Cadhérine desmosomale. Notons que les Caténines β et γ peuvent se substituer l'une à l'autre lorsque l'une d'elles vient à manquer (Bierkamp 1999; Huelsken 2001).

Enfin, la p120-Caténine, d'abord identifiée comme substrat de tyrosine kinase, régule l'adhésion cellulaire médiée par la Cadhérine et notamment la solidité de cette adhésion, en maintenant un niveau correct de Cadhérine. De nombreux agents tels que l'histamine ou la thrombine peuvent induire une modulation de la phosphorylation de la p120-Caténine, et ainsi modifier l'adhérence intercellulaire (Xia 2003).

II.1.c.iii. L'Afadine

L'Afadine permet l'interaction de la Nectine avec le cytosquelette d'Actine (Figure 9) (Miyahara 2000). Par ailleurs l'Afadine peut se lier directement à l' α -Caténine (Asada 2003) et à ZO-1 (Halford 2000; Katata 2003), permettant ainsi de recruter des complexes protéiques de jonctions serrées (Claudines) et de jonctions adhérentes (Cadhérines) au niveau des complexes d'adhérence intercellulaires de Nectine. Enfin, l'Afadine joue un rôle clé dans l'organisation des jonctions serrées et adhérentes, et donc dans l'organisation propre des tissus lors de la morphogénèse (Ikeda 1999).

II.1.c.iv. Assemblage des jonctions

Les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont deux systèmes jonctionnels bien distincts. Cependant, les membres de ces deux systèmes peuvent interagir entre eux. Par exemple, ZO-1, protéine du complexe des jonctions serrées, peut s'associer à l'Afadin et à l' α -Caténine, protéines du complexe des jonctions adhérentes, dans des cellules non polarisées. Cependant, dans les cellules polarisées présentant des jonctions serrées, cette association n'est pas retrouvée : ZO-1 s'associe spécifiquement au complexe de jonctions serrées, et non pas aux jonctions adhérentes.

Les jonctions intercellulaires ont pour origine de simples complexes d'adhésion entre cellules, les jonctions primordiales, retrouvées lors de l'assemblage des jonctions dans les systèmes *in vitro*, ou au cours des stades précoces du développement. Ces complexes d'adhésion intercellulaires évoluent ensuite en jonctions adhérentes et en jonctions serrées (Mostov 2003). Des études laissent à penser que la formation des jonctions adhérentes précède celle des jonctions serrées. En effet, l'assemblage des jonctions serrées dépend à la fois de la formation et du maintien des jonctions adhérentes (Gumbiner 1986; Gumbiner 1988; Pasdar 1988a; Pasdar 1988b; Watabe-Uchida 1998).

Le modèle d'assemblage des jonctions proposé par Miyoshi et Takai (Miyoshi 2005) est le suivant : l'assemblage des complexes jonctionnels apicaux débute par l'initiation de l'adhésion intercellulaire par les Nectines et la E-Cadhérine, permettant de recruter les différents composants des jonctions adhérentes (Caténines et Afadin) ainsi que des jonctions serrées (JAM, Occludine, Claudines, ZO-1 et le complexe PAR3/PAR6/aPKC) (Figure 10).

Rappelons que les Nectines se situent au niveau des jonctions adhérentes avec la E-Cadhérine, que contrairement aux Cadhérines dont l'interaction homophile est dépendante du Calcium, les Nectines interagissent entre elles de façon hétérophilique et indépendamment de la concentration en calcium. L'interaction hétérophilique des nectines permet une cinétique d'association rapide comparativement aux Cadhérines dont l'interaction est homophile, et donc la formation de micro-clusters de nectine lors des premiers contacts intercellulaires. Ces clusters permettent de recruter les différents composants des jonctions adhérentes puis serrées. Des études ont montré que la surexpression de nectine accélérerait la formation des jonctions adhérentes et serrées dans des cellules épithéliales, et la formation des jonctions adhérentes dans des fibroblastes (Fukuhara 2002a; Honda 2003a). A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la nectine retardait la formation des jonctions adhérentes et serrées dans des

cellules épithéliales, et la formation des jonctions adhérentes dans des fibroblastes (Fukuhara 2002a; Fukuhara 2002b; Honda 2003b).

Au niveau du cytoplasme, ZO-1 joue un rôle important lors de l'assemblage des jonctions. ZO-1 s'associe au complexe Nectine-Afadine au niveau de l'extrémité N-Terminale de l'Afadine, indépendamment du système Cadhérine-Caténine (Yokoyama 2001), ce qui permet le recrutement de JAM au niveau des complexes Nectine-Afadine et Cadhérine-Caténine. Suit alors le recrutement des autres protéines de jonctions serrées, à savoir les Claudines et l'Occludine (Ebnet 2001; Fukuhara 2002a; Fukuhara 2002b).

Par ailleurs, des études montrent l'implication des protéines de la famille Rho Cdc42 et Rac dans l'assemblage des jonctions serrées. L'interaction des Nectines facilite la formation des jonctions adhérentes et serrées dans les cellules MDCK et induit l'activation de Cdc42 et de Rac. L'inhibition de Cdc42 par un inhibiteur spécifique retarde l'assemblage des jonctions serrées et adhérentes, alors que la surexpression de Cdc42 l'accélère (Fukuhara 2003).

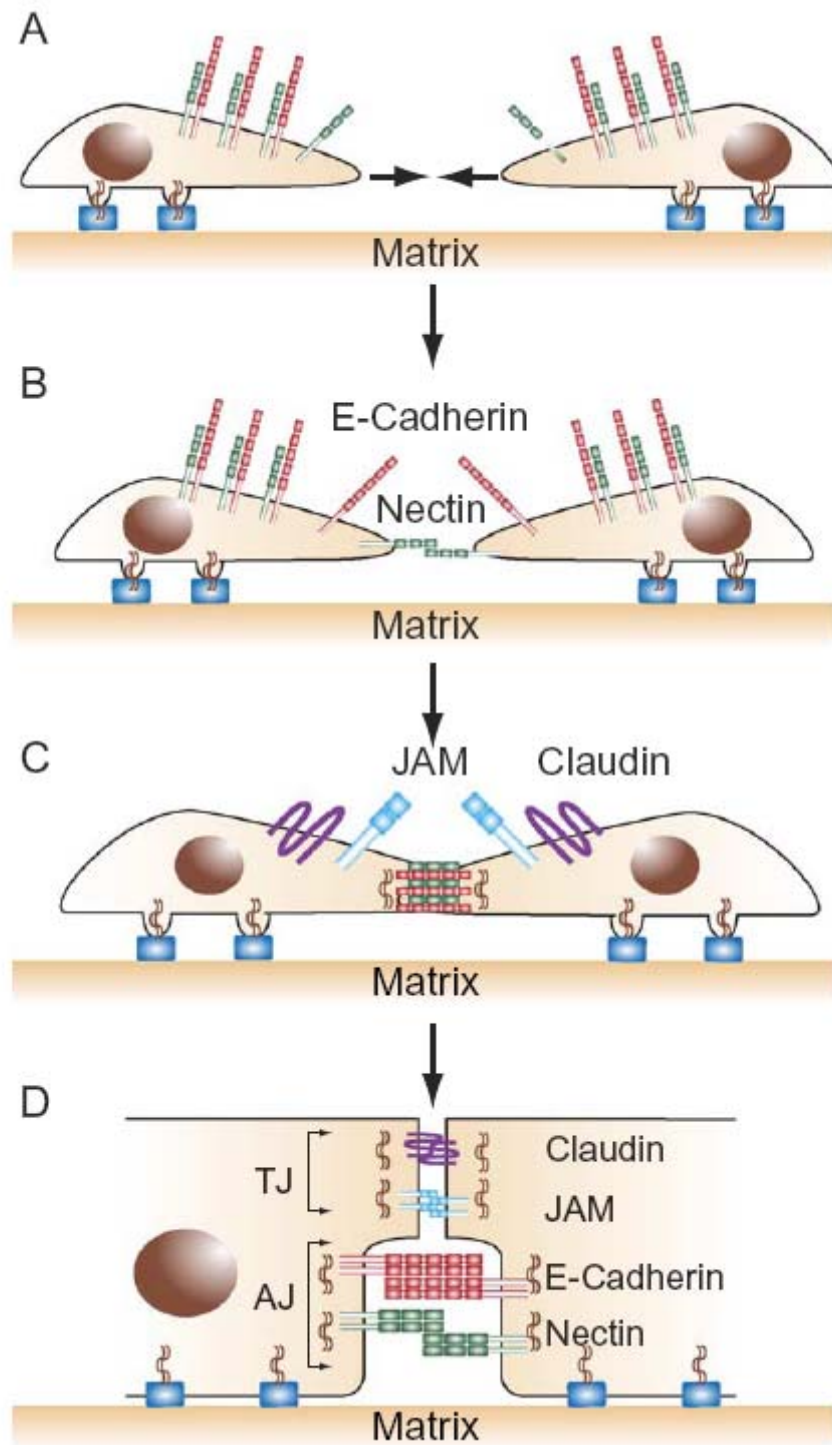


Figure 10 : Rôle et mode d'action des Nectines dans la formation des jonctions adhérentes et serrées dans les cellules épithéliales. D'après Miyoshi (Miyoshi 2005).

L'activation de Cdc42 lui permet d'interagir avec PAR-6, ce qui va faciliter le recrutement de l'aPKC, de PAR-3, et par conséquent de JAM au niveau du futur compartiment apical, c'est à dire au-dessus des jonctions adhérentes (Plant 2003; Yamanaka 2003). Ainsi Cdc42 semble impliqué dans l'assemblage des jonctions serrées ainsi que dans la polarité de l'épithélium en régulant la formation du complexe PAR3/PAR6/aPKC.

II.1.c.v. Désassemblage des jonctions

Le désassemblage des jonctions intervient dans divers processus physiologiques et pathologiques comme, entre autre, le passage de leucocytes, de microorganismes à travers la barrière épithéliale, l'interaction des cellules de Sertoli avec les spermatocytes, la transition épithélio-mésenchymateuse ou encore l'invasion des cellules cancéreuses.

Les conséquences du désassemblage des jonctions sont une augmentation de la perméabilité transépithéliale et la délocalisation des protéines des complexes de jonctions serrées et adhérentes.

Plusieurs mécanismes peuvent causer le désassemblage des jonctions : la perte de fonction des différents composants des jonctions par mutation ou modification post-transcriptionnelle, l'augmentation de l'activité protéolytique d'enzymes qui vont cliver certaines protéines des complexes jonctionnels au niveau extracellulaire mais aussi intracellulaire, et ainsi rompre les jonctions, ou encore l'augmentation de la production de cytokines telles que le TGF- β au niveau du microenvironnement des cellules cancéreuses.

II.1.c.v.. Perte de fonction

Une étude a montré que la phosphorylation de la β -Caténine au niveau de la Tyrosine Y654 entraînait une diminution de l'affinité de la E-Cadhérine pour la β -Caténine, cette tyrosine étant le site d'action de tyrosines-kinases impliquées dans les voies de signalisation de récepteurs de facteurs de croissance (Huber 2001).

De la même manière, la protéine ZO-1 peut être phosphorylée par c-Src, induisant le désassemblage des jonctions serrées dans la lignée cellulaire intestinale Caco-2 (Gomez 1999).

II.1.c.v.. Clivage

Lee *et al* ont montré que l'exposition des cellules cancéreuses d'estomac au HGF (Hepatocyte growth factor) induisait la sécrétion de MMP-7 par les cellules cancéreuses, ceci ayant pour conséquence le clivage de la E-Cadhérine, et donc la perte d'adhésion des cellules. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans les processus d'invasion *in vitro* et dans les métastases (Lee 2007).

Dans une autre étude, il a été montré que la E-Cadhérine pouvait être clivée par le complexe Préséniline-1 (PS-1)/ γ -Sécrétase, la protéine PS-1 étant impliquée dans la maladie d'Alzheimer, ce qui a pour conséquence la dissociation de la E-Cadhérine du complexe formé avec les Caténines et donc le désassemblage des jonctions adhérentes (Marambaud 2002).

II.1.c.v.. Voies de signalisation impliquées

Le désassemblage des jonctions adhérentes et serrées implique des voies de signalisation telles que la voie des protéines G (Rho, Rac, Cdc42, Ras, ARF6) ou encore la voie des protéines kinases (PKC, PKA, c-Src). Par ailleurs, le désassemblage des jonctions serrées et adhérentes est contrôlé par des voies distinctes.

Ainsi, l'activation de la protéines G ARF6 par des cytokines ou l'activation des MAP Kinases et de la PI3 Kinase par le HGF/SF provoquent le désassemblage des jonctions adhérentes sans perturber les jonctions serrées et la polarité cellulaire (Palacios 2001; Potempa 1998).

Lors d'une déplétion en ATP, les jonctions serrées sont spécifiquement protégées par la voie RhoA alors que c'est la voie de Rac1 qui semble protéger spécifiquement les jonctions adhérentes (Gopalakrishnan 2002).

II.1.c.v.. Implications physiologiques et pathologiques de la rupture des jonctions serrées

Les processus d'assemblage/désassemblage interviennent physiologiquement, et de façon régulée. C'est le cas notamment lors du passage trans-épithélial des leucocytes, et plus particulièrement des neutrophiles. Cette migration trans-épithéliale met en jeu des molécules d'adhésion comme l'intégrine CD11b/CD18 au niveau du neutrophile, dont le récepteur au niveau de la cellule épithéliale n'est pas encore clairement défini. Cependant, il existe plusieurs candidats comme ICAM-1, ou encore les molécules retrouvées dans les complexes jonctionnels comme JAM. Des leucocytes particuliers, les DC sont capables d'ouvrir les

jonctions adhérentes et serrées entre les cellules épithéliales intestinales et d'envoyer des pseudopodes afin de capturer des bactéries sans rompre l'intégrité de l'épithélium, et ce, grâce à l'expression de protéines de jonctions serrées à leur surface (Rescigno 2001).

La rupture des jonctions peut également intervenir de façon pathologique, notamment lors d'infections bactériennes et virales, lors de la réaction allergique, ou encore dans le cancer et la formation de métastases.

Les bactéries et les virus interagissent avec les cellules épithéliales en utilisant différentes stratégies leur permettant de traverser la barrière des jonctions serrées et de désorganiser la structure de tissus.

Le virus herpès simplex utilise les Nectines comme récepteur, ce qui lui permet de s'attacher, d'entrer et de se propager dans la cellule de l'hôte (Krummenacher 2003).

Le virus respiratoire syncytial (Respiratory syncytial Virus RSV) induit la production de VEGF par les cellules épithéliales bronchiques, induisant la formation de jonctions Gap, ce qui a pour conséquence une diminution de la résistance transépithéliale et donc une augmentation de la perméabilité. La formation de jonctions Gap entraîne la fusion des cellules épithéliales bronchiques entre elles, caractéristique connue sous le nom d'effet syncytial (Kilani 2004).

Les infections bactériennes peuvent également être à l'origine de la rupture des jonctions serrées. Par exemple, la bactérie pathogène *Clostridium difficile* produit des toxines responsables de l'inhibition de RhoA qui a pour conséquence une réorganisation de la F-Actine, la dissociation de ZO-1 du cytosquelette d'Actine, la dissociation de l'Occludine, de ZO-1 et -2 des jonctions serrées, et la diminution de la résistance transépithéliale (Gruenheid 2003).

Certains allergènes ont la capacité de rompre les jonctions intercellulaires grâce à une activité protéolytique. C'est notamment le cas de l'allergène majeur de la poussière de maison Der p1 qui possède une activité cystéine-protéase (Chua 1988). Cette activité enzymatique permet à l'allergène de rompre les jonctions serrées entre les cellules épithéliales bronchiques issues de patients allergiques asthmatiques mais également de patients allergiques non asthmatiques lorsque l'exposition à Der p1 est réalisée de manière prolongée. Cette rupture des jonctions serrées a pour conséquence une diminution de la résistance transépithéliale, et donc une augmentation de la perméabilité de l'épithélium bronchique. L'allergène est alors en contact direct avec les cellules présentatrices d'antigènes ce qui pourrait favoriser le développement de la réaction inflammatoire (Mattoli 2001). *In vitro*, l'exposition de cellules épithéliales bronchiques à Derp 1 induit le clivage de l'Occludine ainsi que la délocalisation

de ZO-1 en dehors de la ceinture jonctionnelle, ayant pour conséquence l'augmentation de la perméabilité de la barrière épithéliale et le détachement de certaines cellules (Wan 1999).

Par ailleurs, la rupture des jonctions serrées par Der p1 pourrait favoriser la pénétration d'autres allergènes dépourvus d'activité protéolytique.

Une étude chez la souris a montré que la provocation allergénique (Lipopolysaccharide ou LPS) entraînait une perte d'expression ponctuelle de la E-Cadhérine proportionnelle à l'importance de la provocation. Cette perte d'expression est due au clivage de la E-Cadhérine par les neutrophiles : en effet, la quantité de E-Cadhérine clivée retrouvée dans le lavage broncho-alvéolaire est proportionnelle au nombre de neutrophiles qui ont afflué dans la lumière bronchique. Par ailleurs, la perte d'expression de la E-Cadhérine déstabilise les jonctions adhérentes et serrées, puisque l'expression de l'Occludine et de ZO-1 est perdue ponctuellement et proportionnellement à l'importance de la provocation. A plus long terme, on pourra assister à une diminution progressive de l'intégrité de l'épithélium et à des altérations morphologiques ayant pour conséquence le transit paracellulaire de pathogènes et d'antigènes (Evans 2002).

La perte des jonctions intercellulaires et de la polarité de l'épithélium est un des facteurs pouvant favoriser une prolifération excessive des cellules épithéliales, et par conséquent une architecture pluristratifiée puis potentiellement la formation de tumeurs. De nombreuses tumeurs humaines perdent progressivement leur caractère épithélial lors de la transition épithélio-mésenchymateuse. Bien souvent, il s'agit d'une mutation de Ras, protéine jouant un rôle important dans les processus d'assemblage/désassemblage des jonctions. (Mercer 2000).

II.1.d. Réparation

Toute lésion de la muqueuse bronchique déclenche une série complexe de mécanismes de réparation (Zahm 1991) tels que la ré-épithélialisation d'une surface luminale dénudée. En situation pathologique, le mécanisme peut être altéré. Ainsi la régénération de l'épithélium asthmatique est vraisemblablement inefficace.

Au cours de l'asthme, ou d'autres maladies chroniques inflammatoires, les réponses immunitaires et inflammatoires induites sont associées à des changements structuraux (remodelage) du tissu pulmonaire. L'asthme est caractérisé par un épithélium endommagé dont la réparation est incomplète, conduisant à un état de « desquamation » chronique

accompagné de la sécrétion de facteurs de croissance intervenant dans le remodelage de l'épithélium.

Chez le sujet sain, l'épithélium bronchique constitue une barrière grâce entre autre à l'existence de jonctions serrées formant une ceinture apicale autour des cellules épithéliales. Ces jonctions permettent aux cellules de communiquer entre elles et de réguler le transport intercellulaire (Roche 1993). Chez le sujet asthmatique, la fonction de barrière de l'épithélium est endommagée, avec notamment la rupture des jonctions serrées et l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium. Par ailleurs, l'inflammation chronique induit la production d'espèces réactives de l'oxygène, qui ne sont pas éliminées par des enzymes anti-oxydantes contrairement à l'épithélium du sujet sain (Bucchieri 2002; Comhair 2001). Ces espèces réactives diminuent l'efficacité de la barrière épithéliale en rompant les jonctions serrées, prédisposant ainsi les cellules à l'apoptose.

Chez le sujet sain, les dommages de l'épithélium stimulent des voies intrinsèques de réparation comme l'engagement des récepteurs à l'EGF (EGFRs) par la sécrétion autocrine de leurs ligands (EGF, Amphiréguline), ce qui a pour conséquence la migration des cellules au niveau du site endommagé, leur prolifération et leur différenciation (Tesfaigzi 2003). En revanche, chez le sujet asthmatique, la prolifération des cellules basales est altérée (Fedorov 2005; Puddicombe 2003).

Au cours du processus de remodelage de l'épithélium du sujet asthmatique, on peut observer une accumulation de protéines matricielles au niveau de la sous-muqueuse (Fibronectine, Collagènes de type I, III, VI, protéoglycanes) ainsi qu'un épaissement du muscle lisse dont la conséquence est le rétrécissement du diamètre de la lumière bronchique de l'épithélium (Pepe 2005; Pini 2007). Enfin, les fibroblastes jouent un rôle clé lors du remodelage dans l'asthme. Les cellules épithéliales bronchiques elles-mêmes sont capables de se transdifférencier en fibroblaste puis en myofibroblastes qui participent à l'hyperplasie du muscle lisse observée au cours de l'asthme, sous l'influence de facteurs profibrotiques tels que le TGF- β dans le processus appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Willis 2007). Les fibroblastes peuvent également se différencier à partir de fibrocytes circulants provenant de progéniteurs CD34+ de la moëlle osseuse (Nihlberg 2006). Deux études ont en effet montré que la provocation allergénique répétée d'un épithélium asthmatique induit le recrutement à partir du torrent circulatoire de ces fibrocytes au niveau du tissu pulmonaire et au niveau des lavages bronchoalvéolaires, contribuant ainsi au remodelage pulmonaire (Bellini 2007; Schmidt 2003).

II.2. Epithélium et immunité muqueuse

L'épithélium des voies respiratoires est capable de se défendre face aux diverses agressions quotidiennes. Pour cela, il dispose dans un premier temps d'un système de défense inné, basé sur des propriétés physiques et antimicrobiennes. Il s'agit notamment de la clairance mucociliaire et de la sécrétion de peptides antimicrobiens (Figure 11). En plus de cette première ligne de défense les cellules résidentes peuvent recruter des cellules phagocytaires, en premier lieu des granulocytes et secondairement des cellules de l'immunité, et ainsi une réponse inflammatoire est mise en place. En effet, certains médiateurs produits par les CEB sont connus pour moduler les fonctions de cellules de l'immunité et en particulier des cellules dendritiques, cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, et les lymphocytes.

<p>Peptides anti-microbiens</p>	<p>β-défensines LL-37/CAP-18 Lysozyme Lactoferrine SLPI</p>	<p>Elafine Calprotectine Phospholipase A2 SP-A, SP-D Peptides anioniques</p>
<p>Médiateurs de l'inflammation</p>	<p>Cytokines : <i>IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-11, IL-10, IL-16, TNF-α</i> Chimiokines : <i>CXCL1, 5, 8, 10, CCL2, 3, 5, 7, 8, 11, 13, CCL17, 20, 22</i></p>	<p>Médiateurs lipidiques : <i>LTB/C/D, PGE2, 15-HETE, PAF</i> Facteurs de croissance : <i>GM-CSF, G-CSF, TGF-β, EGF, FGF, PDGF</i> Calprotectine NO, Endothéline-1</p>
<p>Médiateurs chimiotactiques</p>	<p>hLL-37/mCAP-18 β-défensines Chimiokines Leukotriènes</p>	

Figure 11 : Panorama des médiateurs sécrétés par l'épithélium bronchique, participant aux mécanismes de défense de l'hôte. D'après Takizawa, Message et Johnston, et Bals et Hiemstra (Bals 2004; Message 2004; Takizawa 1998).

II.2.a. La clairance mucociliaire

L'épithélium respiratoire compris entre les voies aériennes supérieures et les bronchioles terminales est recouvert d'un film de mucus dont l'épaisseur varie entre 0,5 et 2 μ m. Les mouvements ciliaires entraînent la mobilisation des particules piégées au niveau du film de mucus, des bronchioles terminales au carrefour aérodigestif.

Le mucus est constitué de deux phases : une phase aqueuse périciliaire ou phase sol de faible viscosité, et une phase gel superficielle caractérisée par une viscosité élevée (Sleigh 1988).

Le mucus est composé de glycoprotéines (sialo- et sulfoglycoprotéines) et de protéoglycanes sécrétés par les cellules caliciformes à mucus et les cellules séreuses entre le larynx et les bronchioles, par les cellules ciliées et les cellules de Clara au niveau des bronchioles terminales. Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire, qui sont soit sécrétées, soit ancrées à la membrane des cellules épithéliales. Beaucoup de bactéries se lient aux mucines et sont ainsi éliminées par la clairance mucociliaire.

Par exemple *P. aeruginosa* est éliminée par la clairance mucociliaire chez les individus sains, sans mise en jeu d'une réponse inflammatoire. C'est son flagelle qui se lie à des mucines bien spécifiques, dont l'expression est augmentée par les cellules épithéliales en réponse aux ligands de cette bactérie (Li 1997).

Les protéines A et D du surfactant participent elles aussi à la clairance des bactéries. Ces protéines appartiennent à la famille des collectines. Une étude a montré que des souris invalidées pour la protéine A du surfactant étaient particulièrement sensibles aux infections par *P. aeruginosa* (LeVine 1998).

Enfin, les protéines SP-A et SP-D du surfactant participent elles aussi à la réponse immunitaire en la modulant. SP-A et -D peuvent être considérées comme des PRR puisqu'elles sont capables de reconnaître des PAMP comme le LPS (Van Iwaarden 1994), le polysaccharide de la capsule de *Klebsiella* (Kabha 1997) ou encore le lipoarabinomannane de *Mycobacterium* (Ferguson 1999; Sidobre 2000). Ces protéines du surfactant sont capables de moduler la réponse inflammatoire en interagissant avec d'autres PRR. SP-A interagit en effet avec le CD14 des macrophages alvéolaires, ce qui a pour conséquence d'inhiber la liaison du LPS au CD14 et donc d'inhiber la production de TNF- α (Sano 1999). De la même manière, SP-A peut se lier au TLR2 et inhiber l'interaction du peptidoglycane ou du zymosan avec le TLR2 (Murakami 2002).

II.2.b. Sécrétion d'agents antimicrobiens

Le mucus des voies aériennes est caractérisé par la présence d'agents antimicrobiens à large spectre, tels que le lysosyme, la lactopéroxydase, la lactoferrine, les protéines du surfactant, les peptides antimicrobiens ou encore les défensines (Figure 11).

Le lysosyme et la lactoferrine sont particulièrement abondants et permettent l'élimination efficace des bactéries à Gram positif et négatif (Travis 1999). Une étude a démontré que la lactopéroxydase était exprimée dans les voies aériennes et qu'elle inhibait la croissance de nombreux microorganismes (Gerson 2000).

Les peptides antimicrobiens, parmi lesquels les défensines, s'intercalent entre le lipopolysaccharide de la paroi des bactéries à Gram négatif, entraînant la formation de pores dans la membrane cytoplasmique et à terme la lyse des bactéries. La classification des défensines a d'abord été réalisée dans un modèle bovin, puis les homologues humains ont été identifiés. Les cellules épithéliales respiratoires produisent des β -défensines de type 1 et 2. D'autres peptides antimicrobiens ont été découverts comme le LL-37/CAP-18 (Bals 1998).

II.2.c. Sécrétion de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance

Les cellules épithéliales bronchiques sont également impliquées dans l'induction et le contrôle de l'inflammation au travers du recrutement des leucocytes. Elles sont capables de s'activer et d'exprimer ICAM-1 ou des molécules du CMH (Krunkosky 1996; Striz 1999) à leur surface, et de recruter des cellules phagocytaires en sécrétant tout un panel de médiateurs de l'inflammation, de cytokines et de chimiokines.

In vitro, des cellules épithéliales bronchiques mises en présence de stimuli tels que l'IL-1, le TNF- α , le TGF- β , des motifs bactériens (LPS, poly(I:C)) ou même l'histamine, produisent de façon dose-dépendante de l'IL-6, du CXCL8 et du GM-CSF (Takizawa 1995). De même, des cellules épithéliales bronchiques exposées à *H. influenzae* produisent davantage d'IL-6, de CXCL8, de TNF- α et ont une expression accrue d'ICAM-1 (Khair 1996). En situation pathologique telle que l'asthme, on observe une activation chronique de l'épithélium, avec en particulier une augmentation des taux d'IL-1, d'IL-6 et de GM-CSF dans les lavages broncho-alvéolaires (Mattoli 1991). Sousa *et al* ont démontré une expression accrue de la protéine GM-CSF dans l'épithélium bronchique de patients asthmatiques, qui est diminuée par des corticoïdes inhalés (Sousa 1993). Le CXCL8 est un facteur chimioattractant pour les neutrophiles (Leonard 1990), les cellules T (Larsen 1989), les éosinophiles activés et les basophiles (Dahinden 1989). Ainsi, ces cytokines vont jouer un rôle important dans l'initiation des réponses inflammatoires locales, et sur leur pérennisation.

Les CEB sont capables de produire des médiateurs lipidiques, tels que le 15-HETE. Ce médiateur influence la réponse inflammatoire, en stimulant le chimiotactisme des cellules inflammatoires, en influençant l'activité de la 15-lipoxygénase leucocytaire et en renforçant la broncho-constriction précoce notamment en réponse à l'inhalation d'un allergène chez les asthmatiques atopiques. Dans l'asthme, les cellules épithéliales obtenues par brossage bronchique libèrent une plus grande quantité de 15-HETE, spontanément ou après stimulation (Campbell 1993). Par ailleurs, les CEB produisent de la PGE₂, après activation des récepteurs

PAR-1, -2 et 4 (Asokanathan 2002a), en réponse à l'élastase du neutrophile, à la bradykinine ou aux allergènes (Chung 1999). Par ailleurs, ce médiateur endogène a des effets broncho-protecteurs (Pavord 1995). La PGE₂ participe à l'initiation de la réponse immune en modulant le recrutement des DC et leur maturation (Kabashima 2003), afin d'orienter la réponse vers un profil de type 2, dans certaines conditions de stimulation (Kalinski 1997).

Par ailleurs, les cellules épithéliales bronchiques peuvent produire du TSLP, une cytokine apparentée à l'IL-7, qui va induire une polarisation préférentielle de type Th-2 de la réponse immunitaire lors de la présentation de l'antigène aux lymphocytes par les DC. Le TSLP active les processus de costimulation de la DC en empêchant la production d'IL-12 par cette dernière, induisant par conséquent une polarisation des lymphocytes de type Th-2. La production de TSLP par les cellules épithéliales bronchiques et la polarisation Th-2 sont notamment induites par les ligands de TLR3, le rhinovirus et les cytokines de type Th-2 (Kato 2007).

En plus de son rôle myorelaxant, le monoxyde d'azote (NO) a un rôle établi dans les mécanismes de défense contre les infections bactériennes et exerce ses actions modulatrices à la fois sur les réponses inflammatoires et les réponses immunes (Ayyagari 2004; Darling 2003). Au niveau des DC, le NO réduit l'expression du CD86, alors que le CD80, le CD83 et les molécules du CMH ne sont pas modulés. De plus, le NO diminue la production d'IL-10 par les DC matures, et augmente leur sécrétion de TNF- α . Ainsi, le NO renforce la capacité des DC à induire une réponse de type 1 (Corinti 2003).

Au final, l'épithélium bronchique est un protagoniste actif impliqué dans les mécanismes de régulation des réponses immunes et inflammatoires locales, via l'expression et la production de cytokines. Ainsi, les CEB pourraient représenter une cible pour le traitement des pathologies inflammatoires affectant le tractus respiratoire, et en particulier des stéroïdes.

II.2.d. Implication dans le recrutement des leucocytes

Dans les pathologies inflammatoires affectant les voies respiratoires, des leucocytes, comme des éosinophiles, des neutrophiles, des lymphocytes T et des DC, peuvent infiltrer la muqueuse bronchique (Bals 1999; Whitsett 2002). La plupart de ces cellules sont recrutées depuis le torrent circulatoire et traversent la paroi vasculaire avant de gagner la muqueuse. Ainsi, les CEB représentent une source importante de facteurs chimiotactiques pour ces cellules.

II.2.d.i. Recrutement de neutrophiles

En condition inflammatoire, les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans la destruction des agents pathogènes, mais aussi dans les dommages épithéliaux (Lyczak 2002). Ceux-ci sont rapidement recrutés vers le site inflammatoire en présence de chimiokines liant le CXCR2 (Mueller-Ortiz 2004). Ainsi, des instillations de *P. aeruginosa* ou de *Klebsiella pneumoniae* à des souris induisent une accumulation de neutrophiles au niveau des voies respiratoires, avec un maximum à 36 heures, puis déclinant progressivement après l'infection (Morimoto 2001). Une autre étude sur des souris montre que l'instillation par voie intranasale de la protéine de la membrane externe de *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA) induit un afflux transitoire de neutrophiles à 24h dans les lavages bronchoalvéolaires ainsi qu'au niveau de sections de poumon (Pichavant 2003). *S. aureus* et *P. aeruginosa* activent la voie de signalisation NF- κ B au niveau des CEB conduisant notamment à la production de chimiokines se liant au CXCR2 dont CXCL8, CXCL1 et CXCL5 (Ratner 2001). De plus, un nombre accru de neutrophiles associé à une augmentation de la production de CXCL8 a été mis en évidence chez des patients asthmatiques ou en état de mal asthmatique, par rapport à des sujets sains (Lamblin 1998; Pizzichini 1998). Chez certains patients souffrant d'asthme sévère à évolution lente, des neutrophiles ont également été observés. Leur rôle dans l'asthme sévère n'est pas clairement défini, mais il est vraisemblable qu'ils participent à l'amplification du processus de remodelage. En effet, ces leucocytes sécrètent de très nombreux enzymes protéolytiques parmi lesquels l'élastase et les métalloprotéases de la matrice (MMP).

II.2.d.ii. Recrutement d'éosinophiles

Les éosinophiles sont des granulocytes caractéristiques des réponses Th2 et des pathologies allergiques. Ces cellules s'accumulent dans les voies respiratoires sous l'influence de l'IL-5, du GM-CSF, de CCL11/Eotaxine, de CXCL8/IL-8 et de CCL5/RANTES (Gleich 2000). Parmi ces différents facteurs, seule l'IL-5 n'est pas produite par les CEB *in vitro* après stimulation par un pathogène, suggérant une forte participation des cellules de structure au recrutement de ces polynucléaires. Par ailleurs, on observe une augmentation de la production de CCL11/éotaxine et de CCL17/TARC après exposition à un allergène relevant, ce qui a pour conséquence l'afflux d'éosinophiles dans l'épithélium bronchique de biopsies de patients asthmatiques (Fraenkel 1995; Ricciardolo 2003). Ce nombre est augmenté avec la sévérité de l'asthme, certains auteurs suggérant que l'afflux de ces cellules pourrait participer au

développement de l'hyperréactivité bronchique. Un traitement par les glucocorticoïdes diminue cet infiltrat éosinophilique (Laitinen 1995).

II.2.d.iii. Recrutement de lymphocytes

Différents types de lymphocytes T peuvent infiltrer la muqueuse épithéliale bronchique (Gibson 1993). En effet, il a été montré un nombre accru de cellules intra-épithéliales positives pour les marqueurs CD3, CD4 et CD8, au niveau de biopsies bronchiques de sujets sains et de patients asthmatiques après exposition à un pathogène (Fraenkel 1995; Ricciardolo 2003). Le recrutement des cellules T dans les voies respiratoires est au moins en partie sous le contrôle des chimiokines, potentiellement produites par les CEB, comme le CXCL10, CCL5, CCL17 et le CCL22 en particulier dans l'asthme. Ainsi, il existe une corrélation positive entre les taux de CCL17 et CCL22 produites dans la muqueuse bronchique et les infiltrats de lymphocytes T, notamment Th2 chez les patients asthmatiques.

Par ailleurs, les CEB peuvent agir comme cellules présentatrices d'Ag. Ces cellules expriment des molécules du CMH de classe I et II, ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86, dont l'expression peut être augmentée par des micro-organismes (Papi 2000). Dans l'asthme, l'étude des cellules obtenues par brossage ou par biopsie a montré une expression accrue des antigènes de classe II. Ainsi, les CEB sont capables de présenter des Ag aux lymphocytes T, de les activer et d'induire une réponse immune locale (Rossi 1990). Cependant, l'importance *in vivo* de ce mécanisme n'a pas été précisée.

II.2.d.iv. Recrutement de cellules dendritiques

L'éducation, le développement et la maturation des lymphocytes T auxiliaires naïfs sont des processus nécessitant l'intervention des cellules présentatrices d'Ag professionnelles, telles que les DC. Le système immunitaire muqueux de l'appareil respiratoire repose sur un réseau d'immuno-surveillance principalement formé de DC (Banchereau 2000; van Haarst 1994). Le plus souvent, celles-ci sont localisées au sein même de la couche épithéliale, au contact de la lame basale. Du fait de ce contact étroit, l'épithélium bronchique pourrait être impliqué dans le recrutement des DC, ou de leurs précurseurs. Les auteurs pensent que les CEB jouent un rôle important dans le recrutement et la survie locale des DC puisqu'elles produisent la chimiokine CCL20 et la cytokine GM-CSF, qui permettent respectivement ces processus (Reibman 2003; Sha 2004). Dans le contexte de la réaction allergique, l'exposition

de CEB de sujets sains ou atopiques à Der p1 induit le recrutement de précurseurs de DC via la sécrétion par les CEB de chimiokines telles que CCL2, CCL5 et CXCL10. En outre, l'exposition de CEB provenant de sujets asthmatiques à Der p1 induit le recrutement de cellules de Langerhans via la sécrétion de CCL20 (Pichavant 2005). L'impact des PAMP sur ce mécanisme de recrutement par les CEB n'a pas été analysé.

III. Les cellules dendritiques

Les DC ont été décrites pour la première fois au milieu des années 1970 par Ralph Steinman, qui observa une sous-population de cellules présentant des dendrites dans la rate. Il décrit ces cellules comme étant non-phagocytaires et peu adhérentes. Par la suite, les DC, cellules dérivées de la moëlle osseuse, furent décrites non seulement dans tous les tissus lymphoïdes, mais également dans les tissus non lymphoïdes. Steinman et collaborateurs poursuivent ensuite leur étude phénotypique et fonctionnelle des DC, montrant qu'elles expriment constitutivement le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II. De ce fait, elles sont capables d'interagir avec les cellules T spontanément et indépendamment de la présence d'un antigène (les molécules exprimées à la surface des lymphocytes T et des DC sont complémentaires), de stimuler les lymphocytes T CD4 et CD8 de manière spécifique d'antigènes et ainsi d'induire une réponse immunitaire contre ces alloantigènes plus efficacement que toutes les cellules présentatrices d'antigènes décrites précédemment (Steinman 1975; Steinman 1973; Steinman 1974).

III.1. description

Les DC représentent une famille relativement hétérogène comportant différents types cellulaires, des localisations anatomiques différentes, et par conséquent des fonctions différentes. Malgré ces différences, les sous-populations de DC partagent des caractères communs (Banchereau 1998; Hart 1997).

Premièrement, les précurseurs de DC issus de cellules souches de la moëlle osseuse passent du flux sanguin vers les tissus où ils deviennent des DC immatures parmi lesquelles des cellules de Langerhans ou des DC interstitielles.

Deuxièmement, les DC immatures ont la capacité de capturer des antigènes par des mécanismes qui dépendent de récepteurs de reconnaissance, de dégrader les antigènes dans

des vésicules d'endocytose permettant la production de peptides antigéniques capables de se lier au CMH de classe I ou II.

Troisièmement, les DC vont maturer en réponse à un signal de danger comme des dommages tissulaires générant des éléments du soi modifié ou des protéines de stress, des produits issus de pathogènes ou encore des cytokines inflammatoires. Ce processus de maturation leur permet de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires où elles vont présenter l'antigène aux cellules T spécifiques afin d'initier des réponses immunitaires (De Smedt 1997; Kalinski 1998; Kuroda 2000; Liu 1997; Liu 2001; Peguet-Navarro 1995; van der Pouw Kraan 1998; Vieira 2000).

Quatrièmement, ces différences de localisation selon le stade de différenciation sont à mettre en relation avec des modifications du profil d'expression de récepteurs de chimiokines. Différentes chimiokines permettent ainsi de réguler leur trafic selon leur stade de différenciation ou de maturation (Cyster 1999; Homey 1999; Sallusto 1994; Zlotnik 2000).

Cinquièmement, la maturation des DC induit des changements phénotypiques, et notamment une augmentation de l'expression du CMH de classe I et II permettant la reconnaissance de l'épitope T par le TCR (T-Cell Receptor) exprimé à la surface des cellules T CD4 ou CD8, ainsi que des molécules costimulatrices et des cytokines immunorégulatrices qui vont permettre de stimuler les cellules T et d'induire leur prolifération.

Ainsi, les facteurs environnementaux influent très fortement sur le destin de la DC, notamment lors de sa maturation et orientent la polarisation de la réponse T. Ce sont par exemple des facteurs qui vont favoriser la production d'IL-12 par la DC et permettre par conséquent le développement de réponses de type Th-1, ou au contraire des facteurs qui vont inhiber la capacité des DC à produire de l'IL-12 tels que des parasites et qui vont donc favoriser le développement d'une réponse de type Th-2 (Vieira 2000).

III.1.a. Ontogénèse

Le progéniteur commun CD34+, cellule souche hématopoïétique pluripotente, présent dans la moelle osseuse, le sang de cordon ombilical et en faible quantité dans le sang périphérique donne naissance à deux grandes lignées (Katz 1979; Reid 1990; Strunk 1996) :

-La lignée myéloïde : selon la présence dans l'environnement de différents facteurs solubles, tels que les facteurs de croissance et de différenciation (c-kit-ligand, l'interleukine (IL)-1, le GM-CSF (Granulocyte Monocyte Colony-Stimulating Factor) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor)) les précurseurs CD34+ peuvent se différencier soit en cellules de

Langerhans, soit en DC interstitielles, soit en monocytes/macrophages (Caux 1992; Reid 1992).

-Les progéniteurs lymphoïdes : ils se différencient en DC immatures appelées DC plasmacytoïdes (pDCs). La génération de ces pDCs est principalement assurée par le Flt3-Ligand et, dans une moindre mesure, par le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) (Pulendran 2000), et leur survie par l'IL-3, dont le récepteur CD123 est fortement exprimé sur ces cellules (Robinson 1999).

III.1.b. Les différents phénotypes

Chez l'homme et la souris, les phénotypes des populations de DC d'origine myéloïde et lymphoïde diffèrent soit par la liste des marqueurs de différenciation (CD), soit par leur panel de PRR présents à leur surface (cf partie PRR).

III.1.b.i. Chez la souris

Les DCs myéloïdes et lymphoïdes murines diffèrent par leur phénotype, leur localisation splénique et leurs fonctions (Salomon 1998b)

L'expression des marqueurs CD4 et CD8 permet de distinguer 5 populations :

-DCs myéloïdes CD11c⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD205⁻ CD11b⁺

-DCs myéloïdes CD11c⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD205⁻ CD11b⁺

-DCs myéloïdes CD11c⁺ CD4⁻ CD8⁻ CD205⁺ CD11b⁺

-Cellules de Langerhans (LCs) CD4⁻ CD8^{low} CD205^{high} CD11b⁺

-DCs lymphoïdes CD4⁻ CD8⁺ CD205^{high} CD11b⁻, SIGLEC H, PDCA1

Le marqueur CD8 est exprimé sous la forme d'un homodimère $\alpha\alpha$ dans les DC, alors qu'il est sous la forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ dans les lymphocytes T. Le marqueur CD8 α n'est pas présent sur les DC humaines, contrairement à CD4.

III.1.b.ii. Chez l'homme

L'hétérogénéité des populations de DC humaines est générée à trois niveaux :

-Les facteurs de différenciation : en fonction des facteurs de croissance, la cellule progénitrice donnera un précurseur myéloïde ou lymphoïde.

-L'environnement tissulaire engendrera les différents types de DC (DC interstitielles, cellules de Langerhans, DC plasmacytoïdes).

-Les facteurs de maturation

La figure 12 illustre les différentes voies de génération de DC humaines à partir des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ de la moelle osseuse, permettant de distinguer quatre types de DCs : cellules de Langerhans (LCs), DC interstitielles (intDCs), DC dérivées de monocytes (moDCs) et DC plasmacytoïdes (pDCs).

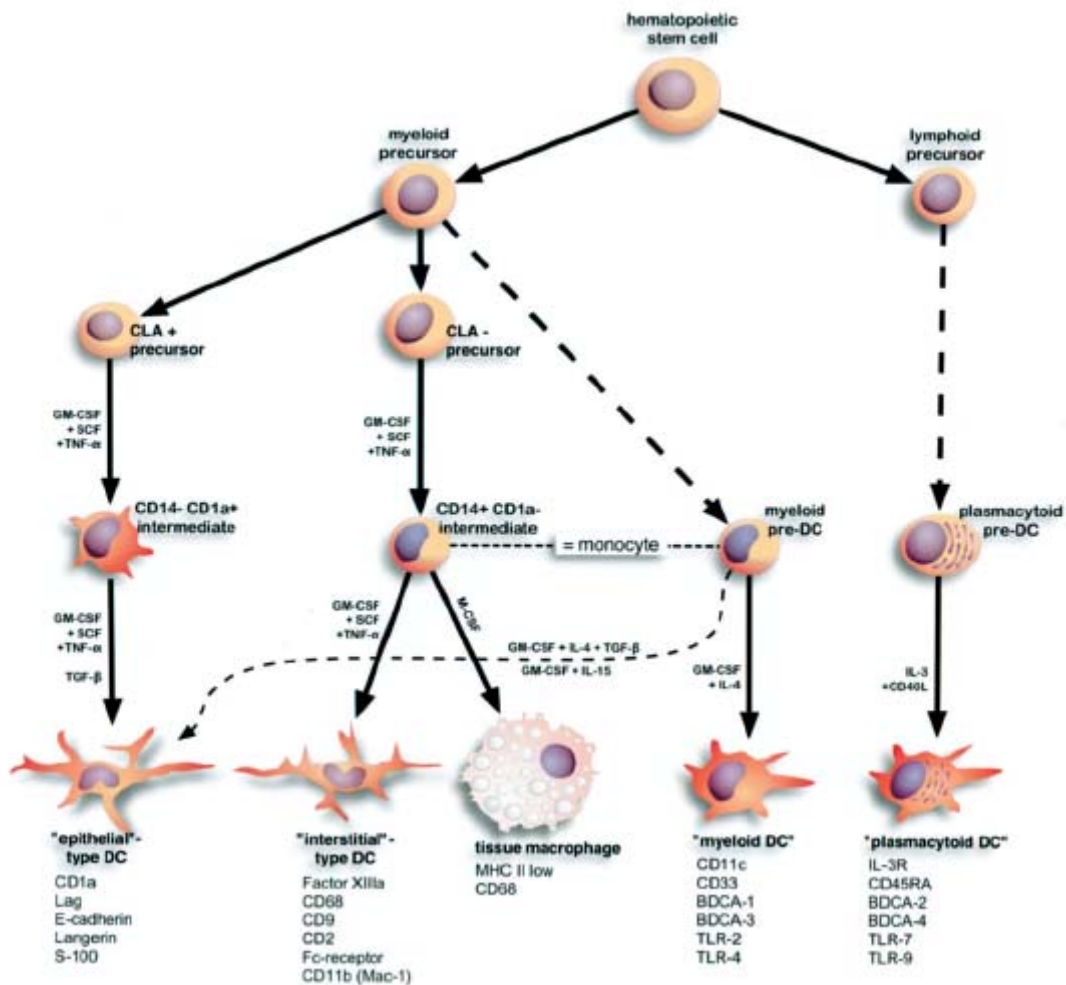


Figure 12 : Développement des populations de DCs humaines. D'après Vermaelen (Vermaelen 2005). Les DC épithéliales sont assimilables aux cellules de Langerhans.

Chez l'Homme, les différentes populations de DC sont caractérisées par le phénotype : Lin- CMH+ CD80+ CD86+. Les quatre populations de DC sont identifiables grâce à l'expression de différents marqueurs (Figure 13).

	LCs	intDCs	moDCs	pDCs
CD1a	+	+	+	-
CD1d	-	+	+	
CD11b	-	+	+	-
CD11c	+	+	+	low
CD52	-	-	+	+/-
CD83	-/+++	-/+++	-/+++	+ /+++
E-cadhérine	+	-	-	-
CD207/Langerin	+	-	-	-
CD208/DC-LAMP	+ /+++	+ /+++	+ /+++	-
CD123	+	+	+	++
BDCA-2			-	+
BDCA-4			+	+

Figure 13 : Phénotype des différentes populations de DC humaines. LC : cellules de Langerhans ou épithéliales; intDCs : DC interstitielles ; MoDCs : DC dérivées de monocytes ; pDCs : DC plasmacytoïdes. Lors de la maturation, CD83 et CD208/DC-LAMP apparaissent chez presque toutes les populations de DC. CD1a, E-cadhérine et Langérine décroissent à la surface des LCs après maturation. D'après Rossi (Rossi 2005).

III.1.c. Les différentes sous-populations

III.1.c.i. Les cellules de Langerhans

Les LC (Figure 14) sont principalement retrouvées dans les couches basales de l'épiderme, mais aussi dans l'épithélium des muqueuses orales (Allam 2003). Elles appartiennent à la lignée myéloïde. Les LC expriment différents marqueurs, communs aux DC myéloïdes ou spécifiques des LC, comme la Langérine, l'E-cadhérine ou Lag (Langerhans cell associated antigen). De plus, les LC présentent un marqueur ultrastructural cytoplasmique : les granules de Birbeck.

La différenciation des précurseurs myéloïdes en LC est dépendante du facteur de croissance TGF- β , chez la Souris comme chez l'Homme (Borkowski 1996).

Malgré une capacité de phagocytose limitée, les LC sont de véritables CPA après activation (Schuler 1985) qui semblent plus efficaces dans l'activation des LT CD8⁺ que dans l'activation des LT CD4⁺ (Mommaas 1999). Les LC sont également capables de répondre à un stimulus viral via la production d'IFN- β et, par la suite, des chimiokines CXCL9/MIG et CXCL11/ITAC, impliquant les LC dans une réponse anti-virale directe (Renn 2006).

Cependant, leur fonction semble différente selon leur localisation, les LC orales semblant plus propices à développer une réponse régulatrice (Bieber 2007).

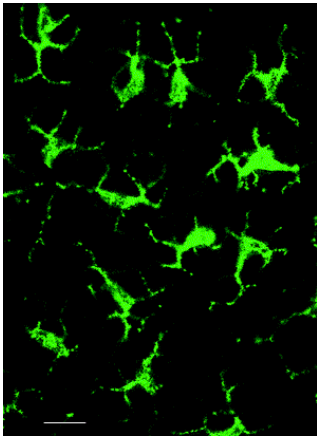


Figure 14 : Cellules de Langerhans dans la peau. Observation par microscopie confocale d'explants épidermiques d'oreilles de souris marqués par immunofluorescence pour les molécules du CMH de classe II. D'après Mellman (Mellman 1998).

III.1.c.ii. Les DC interstitielles

Retrouvées dans les zones sub-épithéliales de la peau et des muqueuses, et dans la plupart des tissus interstitiels de nombreux organes comme le poumon, les reins, le coeur ou le foie, les DC interstitielles dérivent d'un précurseur myéloïde. Elles forment un véritable réseau de surveillance, et représentent un important réservoir de DC immatures, facilement mobilisables lors d'une réaction inflammatoire. En cas de signal de danger ou d'inflammation, le nombre de ces DC augmente au niveau des muqueuses.

III.1.c.iii. Les DC plasmacytoïdes

Les pDC sont retrouvées dans de nombreux organes (foie, poumons, rate), ainsi que dans le sang périphérique (Barchet 2005). D'autre part, l'expression constitutive de CD62L leur permet de coloniser les tissus lymphatiques, comme les ganglions où les pDC résident alors dans la zone T (Facchetti 2003; Grouard 1997).

Les pDC immatures circulantes sont des cellules sphériques pauvres en dendrites, présentant un réticulum endoplasmique très développé et un noyau excentré, mais après activation, elles acquièrent rapidement la morphologie dendritique de leurs soeurs myéloïdes (Figure 15) (Grouard 1997). Ce changement de morphologie s'accompagne d'un changement de fonctions : les pDC immatures sont spécialisées dans la synthèse protéique et la sécrétion

d'IFN, alors que les pDC matures sont de véritables CPA capables de stimuler des LT *in vitro* et *in vivo* (Asselin-Paturel 2001; Soumelis 2006).

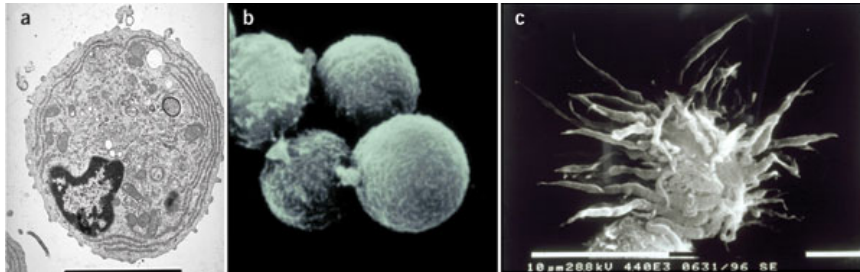


Figure 15: Morphologies des pDC. Observation de pDC immatures par microscopie électronique à transmission (a). Observations par microscopie électronique à balayage de pDC immatures (b) ou matures (c). D'après Grouard (Grouard 1997)

A l'état immature, elles sont de phénotype Lin-1⁻ CD123⁺ HLA-DR⁺ CD11c^{low} CD11b⁻ (Barchet 2005). Les pDC expriment de nombreux marqueurs lymphoïdes, tels que CD4 et CD45RA et des ARNm pré-TCR α , alors qu'elles n'expriment pas de marqueurs myéloïdes. De nombreux marqueurs spécifiques ont été identifiés, tels que l'antigène reconnu par l'anticorps 120G8 et SIGLEC-H chez la souris, BDCA2 et BDCA4 chez l'Homme (Asselin-Paturel 2003; Blasius 2006; Dzionek 2002; Zhang 2006). Cependant, certains lymphocytes expriment également le BDCA4 et le 120G8.

Ces cellules ont été initialement désignées comme "cellules productrices d'interféron" (natural Interferon Producing Cells, IPC), "cellules T plasmacytoïdes" ou encore "monocytes plasmacytoïdes". En effet, elles ont la capacité de produire de grandes quantités d'IFN- α et - β en réponse à différents stimuli (Siegal 1999), et jouent un rôle majeur dans l'immunité antivirale (Gurney 2004).

En référence aux cellules Th1/Th2, ces pDC ont été initialement appelées DC2 (comparativement aux DCs myéloïdes dites DC1) (Rissoan 1999), du fait de leur capacité à induire une réponse de type Th2. Mais de nombreux travaux récents sont venus bouleverser cette classification. En effet, les pDC tout comme les mDC sont capables de polariser la réponse adaptative vers des profils Th1, Th2 et Treg, selon leur état d'activation ainsi que la nature et la dose de l'Ag rencontré (Boonstra 2003; de Heer 2004; Liu 2001).

III.1.c.iv. Les DC du sang périphérique

Les différentes populations de DC sont présentes dans le sang périphérique : précurseurs, DC myéloïdes et plasmacytoïdes (MacDonald 2002).

Les DC présentes dans le sang (Lin-1- CMH II+) ne représentent que 1% des PBMC chez l'homme. De plus, des PBMC mises en culture avec des facteurs de différenciation tels que le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-4 génèrent différentes populations de DC, ce qui montre la présence dans le sang de précurseurs des DC. Les cellules souches hématopoïétiques CD34+ circulantes et les monocytes font partie de ces précurseurs.

III.1.d. Fonctions

III.1.d.i. La capture des antigènes

Les DC immatures ont une capacité à phagocyter les antigènes plus importante que les DC matures, qui ont régulé négativement cette fonction (Steinman 1995).

La capture des antigènes par la DC est médiée par des récepteurs d'endocytose (voir chapitre PRR) et est réalisée par phagocytose, par pinocytose ou par des vésicules de clathrine. Il faut noter que de nombreux récepteurs mis en jeu lors de la capture des antigènes sont régulés négativement lors de la maturation des DC (Mannose Receptor ou MR, DC-SIGN), parallèlement à la perte de leur capacité à phagocyter. Les DC sont capables de capturer des cellules entières comme les cellules nécrotiques et apoptotiques. Elles peuvent également capturer des antigènes sur des cellules vivantes afin des les présenter aux cellules T cytolytiques (transcytose) ou de libérer des vésicules comportant l'ensemble des éléments nécessaires à la présentation d'Ag, les exosomes (Harshyne 2001).

Deux voies de présentation des antigènes phagocytés par les DC existent : la voie endogène ou protéosomale faisant intervenir le CMH de classe I, et la voie exogène ou endosomale faisant intervenir le CMH de classe II.

III.1.d.ii. L'apprêtement des antigènes

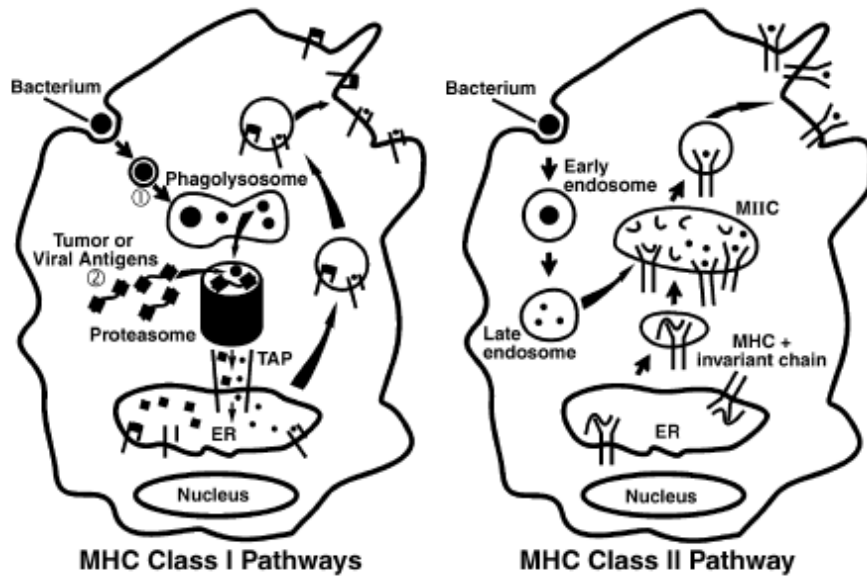


Figure 16 : L'apprêtement des antigènes dans la DC, d'après Lipscomb (Lipscomb 2002)

III.1.d.ii.. Le CMH de classe II

Les antigènes exogènes gagnent les compartiments endosomaux acides précoces et tardifs dont les protéases vont initier la dégradation des antigènes protéiques (Figure 16). Les fragments peptidiques ainsi obtenus vont alors s'associer aux molécules de CMH de classe II préformées dans le MIIC (MHC class II-rich vesicular compartment) puis traverser le cytoplasme et gagner la membrane plasmique au sein de vacuoles d'exocytose qui vont fusionner avec la membrane cytoplasmique afin d'être présentés aux lymphocytes T CD4.

Les molécules de CMH de classe II se trouvant à la surface de la DC peuvent être recyclées via la voie d'endocytose et se complexer à de nouveaux peptides antigéniques dans le MIIC.

Les DC immatures accumulent les molécules de CMH de classe II ainsi que les peptides antigéniques dans des vésicules lysosomales jusqu'à ce que les cellules soient activées. Lorsque les DC sont activées, les complexes CMH de classe II/peptide antigénique s'accumulent dans des vésicules non-lysosomales qui vont migrer à la surface de la cellule. Une étude a récemment montré que des molécules costimulatrices appartenant à la famille B7

sont ancrées dans des vésicules qui migrent en surface associées aux vésicules contenant les complexes CMH de classe II/peptide antigénique (Turley 2000).

III.1.d.ii.. Le CMH de classe I

Afin que le CMH de classe I présente les peptides antigéniques endogènes aux lymphocytes T CD8⁺, les DC vont dégrader des protéines cytoplasmiques dans le protéasome (Figure 16). Le transport des peptides obtenus vers le réticulum endoplasmique est assuré par les protéines TAP (Transporter associated with Antigen Processing) et avec l'aide de protéines chaperonnes que sont les HSP (Heat Shock Protein) (Pamer 1998). Au sein du réticulum endoplasmique, les chaînes α du CMH de classe I nouvellement synthétisées vont s'associer à la β 2-Microglobuline. Le peptide antigénique va s'associer aux complexes de CMH de classe I/ β 2-Microglobuline à l'aide de diverses protéines chaperonnes (Basu 1999; Rescigno 1999). Finalement, les complexes CMH Classe I/peptide antigénique vont gagner la membrane plasmique dans des vésicules d'exocytose.

Puisque les Ag exogènes passent obligatoirement par la voie endosomale, seules les protéines synthétisées au sein de la cellule présentatrice d'antigènes étaient destinées à être présentées par le CMH de classe I. Cependant, des antigènes exogènes peuvent échapper à la voie endosomale et emprunter la voie de dégradation des antigènes endogènes, pour être finalement présentés via le CMH de classe I. Ce processus est nommé « cross-présentation » ou présentation croisée ; la réponse immunitaire qui en découle, nommée « cross-priming », peut aboutir à une réponse effectrice des cellules T CD8, ou à la tolérance (Pfeifer 1993; Reis e Sousa 1995). Les antigènes ainsi présentés peuvent provenir de cellules du Soi modifié, néoplasiques ou infectées, de cellules allogéniques provenant d'une greffe ou de molécules du non Soi (Larsson 2001).

Les DC sont les seules cellules à pouvoir pratiquer ce processus de présentation croisée des antigènes (Kurts 2001).

III.1.d.ii.. Le CD1

Les DC sont également capables de présenter les antigènes glycolipidiques sur les molécules de CD1, qui sont des molécules non polymorphiques contrairement aux molécules de CMH. Tout comme le CMH de classe I, les molécules de la famille CD1 s'associent à la β 2-Microglobuline (Brenner 1997; Shinkai 2000). Les molécules de CD1 sont présentes à la

surface des DC myéloïdes, et le CD1a permet souvent d'identifier ces cellules. Le CD1c (BDCA3) a été utilisé pour caractériser une sous-population de DC circulantes. Cinq isoformes de CD1 ont été identifiées chez l'homme, CD1a-e, mais seulement 2 homologues sont exprimées chez la souris et le rat, CD1d1 and CD1d2. Une étude concernant la structure du CD1d1 murin a montré que cette molécule pouvait potentiellement lier des ligands très hydrophobes, compatibles avec la présentation d'antigènes lipidiques (Zeng 1997). En fait, les molécules de CD1 présentent uniquement des antigènes lipidiques et glycolipidiques endogènes et exogènes.

La présentation d'antigènes lipidiques endogènes via le CD1d et la reconnaissance du complexe CD1d/antigène par un type restreint de cellules, à savoir les cellules T Natural Killer (NK)1.1 a d'abord été découverte chez la souris (Bendelac 1995). Les cellules T NK1.1 ont en effet un répertoire restreint de TCR. La reconnaissance du complexe CD1/antigène lipidique par la cellule T NK1.1 induit la production d'IL-4 ou IFN- γ , les impliquant plus largement dans la reconnaissance des agents infectieux, de tumeurs et d'autoantigènes. Leur production de cytokines semble être régulée par la sécrétion d'IL-12 par les DC CD11c+ (Yang 2000). Une autre sous-population de cellules T reconnaissant le CD1d sur les cellules présentatrices d'antigènes a été décrite, mais cette population cellulaire n'exprime pas le NK1.1. Ces cellules T ont également un répertoire de TCR restreint et peuvent produire de l'IL-4 ou de l'IFN- γ ou encore être cytotoxiques (Chiu 1999; Wang 2001).

L'apprêtement et la présentation des antigènes par le CD1 diffèrent des CMH de classe I et II. Les molécules de CD1 sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique et sont dirigées vers la membrane plasmique dans des vésicules de transport. Les molécules de CD1 sont incorporées dans des endosomes, s'associent aux ligands lipidiques et sont alors recyclées au niveau de la membrane plasmique. Différents homologues de CD1 peuvent s'associer aux antigènes dans des compartiments endosomaux distincts (Sugita 1999).

L'expression de ces molécules non polymorphiques a probablement été maintenue au cours de l'évolution afin de surveiller les voies intracellulaires de métabolisme des lipides plutôt que dans le but de développer une réponse immunitaire protectrice (Shinkai 2000). C'est ainsi qu'une hypothèse a été émise selon laquelle certains microorganismes pourraient usurper la voie du CD1 dans leur propre intérêt. Par exemple, certaines mycobactéries présentent leurs lipides via le CD1 à des cellules T, permettant ainsi de générer une réponse inflammatoire granulomateuse et nécrotique. Ce genre de processus permet alors à ces microorganismes d'éviter leur éradication complète jusqu'à ce qu'ils soient transmis à un autre hôte. Par ailleurs, les DC ou d'autres cellules présentatrices d'antigènes sont capables de générer un

ligand endogène du CD1d, qui pourrait être l'iGB3, dont la production par les DC est induite par une activation des TLR4 et 9 (Paget 2007).

III.1.d.iii. La costimulation

DC	T Cell
<i>B7 family and receptors</i>	
B7-1 (CD80)	CD28, CTLA-4 (CD152)
B7-2 (CD86)	CD28, CTLA-4 (CD152)
B7RP-1	ICOS
PD-L1 (B7-H1)	PD-1
PD-L2	PD-1
B7-H3	Not known
<i>TNF family ligand and receptors</i>	
CD40	CD40L (CD154)
OX40L	OX40 (CD134)
4-1BBL	4-1BB (CD137)
TRANCE (RANK)	TRANCE (RANK-L)
CD27	CD27L (CD70)
CD30L (CD153)	CD30
<i>Miscellaneous</i>	
ICAM-1 (CD54)	LFA-1 (CD11a/CD18)
DC-SIGN (CD209)	ICAM-3 (CD50), ICAM-2 (CD102)
SLAM* (CD150)	SLAM (CD150)
CD58	CD2

TNF, tumor necrosis factor; ICAM, intracellular adhesion molecule.
* SLAM binds to itself.

Figure 17 : Molécules costimulatrices, d'après Lipscomb (Lipscomb 2002)

III.1.d.iii.. La famille des protéines B7

La costimulation est un évènement requis à l'initiation d'une réponse immunitaire. Elle constitue le second signal délivré par la DC après l'antigène.

La première molécule costimulatrice découverte et la plus importante est le CD28, exprimée par les cellules T naïves (Figure 17). Ses ligands, le CD80 (B7-1) et le CD86(B7-2) sont exprimés à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et sont régulés positivement lors de la maturation (Coyle 2001; Schwartz 2001). CD80 et CD86 qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, sont les deux premiers membres de la sous-famille B7, et jouent un rôle clé dans l'activation des cellules T naïves.

Par la suite, d'autres membres furent identifiés, comme l'homologue de CD28 le CTLA-4, qui est régulé positivement à la surface des cellules T activées. Il lie le CD80 et le CD86 avec plus d'affinité que le CD28, mais contrairement à ce dernier, il régule négativement la réponse lymphocytaire T (Walunas 1994).

B7RP-1 (ICOSL ou ICOS ligand), autre membre de la famille B7 a une expression prédominante à la surface des cellules B, mais il est également exprimé à la surface des macrophages, des DC ou encore de cellules non lymphoïdes comme les cellules épithéliales. B7RP-1 lie ICOS (the inducible immune costimulator) (Kopf 2000; Swallow 1999; Yoshinaga 1999). ICOS est un homologue de CD28, et de même que CTLA4, il est régulé positivement à la surface des cellules T activées (Hutloff 1999). Une étude réalisée chez des souris déficientes pour ICOS suggère que l'interaction d'ICOS avec son ligand faciliterait en aval l'interaction de CD40 avec son ligand CD40L requise pour les réponses des cellules B dépendantes des cellules T (McAdam 2001). De plus, Akbari *et al* ont montré que des DC pulmonaires matures exposées à un allergène induisaient le développement de lymphocytes T régulateurs via la voie ICOS/ICOS ligand (Akbari 2002).

PD-L1 (encore appelé B7-H1), autre membre de la famille B7, est exprimé constitutivement sur les DC, et se lie à PD-1 (Programmed Cell Death 1), récepteur exprimé sur les cellules T (Coyle 2001). L'interaction de PD-L1 avec PD-1 inhibe la prolifération des cellules T ainsi que la production de cytokines.

PD-1 peut également interagir avec PD-L2 (B7-DC), ce qui a également pour conséquence l'inhibition de la prolifération des cellules T et de la production de cytokines. Contrairement à PD-L1 qui participe à la réaction inflammatoire de type Th1, PD-L2 semble préférentiellement participer à la réaction inflammatoire de type Th2 (Coyle 2001).

Enfin, B7-H3 a été récemment identifié et cloné (Chapoval 2001). Il est fortement exprimé à la surface des DC immatures et son expression est régulée négativement lors de la maturation des DC, contrairement à l'expression de la majorité des protéines de la famille B7. Son ligand est à ce jour inconnu, et cette protéine ne se lie pas aux autres protéines citées plus haut. B7-H3 joue un rôle amplificateur dans la costimulation des cellules T CD4 et CD8, ainsi que dans l'induction de la production d'IFN- γ .

III.1.d.iii.. La famille du TNF et de ses récepteurs

Les ligands et récepteurs appartenant à la famille du TNF sont au nombre de 50 (Figure 17). Ce sont d'importantes molécules costimulatrices lors de l'interaction entre les DC et les cellules T.

CD40 est exprimé à la surface des DC et interagit avec CD40L (CD154) exprimé à la surface des cellules T. CD40 fut identifié pour la première fois sur les cellules B, et son interaction avec CD40L à la surface des cellules T permet le switch isotypique. Lors de

l'interaction DC/cellules T, le CD40L est régulé positivement à la surface des cellules T afin d'interagir avec son récepteur CD40. Cette interaction permet d'amplifier le processus de maturation des DC et notamment d'augmenter la production d'IL-12 et ainsi la polarisation Th1 (Caux 1994; Cella 1999).

OX40, autre membre de la famille TNF, est exprimé à la surface des cellules T et se lie à son ligand OX40L exprimé à la surface des DC. Ce couple joue un rôle important et complémentaire dans l'induction de la prolifération des cellules T et dans la production de cytokines (Weinberg 1998) ainsi que dans l'induction et le développement de réponses immunitaires de type Th2 (Jenkins 2007). D'autres molécules exprimées par la DC telles que 4-1BBL, TRANCE, CD30L ont un rôle moins spécifique dans l'activation des cellules T.

III.1.d.iii.. Autres molécules costimulatrices

Enfin, il reste un dernier groupe hétérogène de molécules costimulatrices régulant les interactions entre DC et cellules T (Figure 17). Il s'agit de l'intégrine $\beta 1$ LFA-1 (encore appelé CD11a /CD18), exprimée à la surface des cellules T, qui interagit avec ICAM-1 (CD54) exprimé sur les DC. L'interaction de ces deux molécules stabilise les interactions entre la DC et la cellule T. La rupture de cette adhérence réduit la prolifération des cellules T induite par la DC (Bachmann 1997; Masten 1997). Une étude a montré que l'interaction LFA-1/ICAM-1 et 2 jouait un rôle clé dans la génération des réponses de type Th1. Ainsi, si l'on bloque cette interaction, la résultante est un shift vers une réponse de type Th2 vraisemblablement du fait du degré moindre de mobilisation du TCR (Salomon 1998a).

DC-SIGN (DC specific, ICAM-3 grabbing nonintegrin) est une protéine membranaire de type 1 de 44kDa contenant un domaine lectine de type C liant le mannose dans sa partie extracellulaire (Steinman 2000). L'interaction de DC-SIGN sur la DC avec ICAM-3 sur la cellule T semble requise et suffisante à l'initiation de l'interaction entre le complexe CMH de classe II/peptide antigénique sur la DC avec le TCR de la cellule T (Geijtenbeek 2000b). DC-SIGN peut également lier ICAM-2, et cette interaction semble importante à la diapédèse des DC à travers l'endothélium, en conditions physiologiques ou après activation (Geijtenbeek 2000a).

III.1.d.iv. Interface DC/cellule T : la synapse immunologique

Lors d'une réponse immunitaire acquise, le phénotype et la fonction de la DC jouent un rôle important dans l'initiation de la tolérance, de la mémoire et des réponses polarisées de type Th1, Th2 ou Th17. Les différentes sous-populations de DC jouent des rôles différents dans l'initiation de la réponse immunitaire, et chacune d'entre elles peut avoir une influence tolérogénique ou polarisante sur la réponse immunitaire induite (Patterson 2000).

De nombreux facteurs interviennent, soit directement produits par la DC (cytokines, molécules de costimulation), soit en modifiant les fonctions des DC, soit en agissant sur d'autres cibles (Lymphocytes T, cellules NK, NKT) (Figure 18).

Après l'engagement du TCR (T Cell Receptor), correspondant au « signal 1 », des molécules accessoires à la surface de la DC, les molécules costimulatrices, sont nécessaires à la prolifération et la différenciation des cellules T. L'absence ou l'insuffisance de costimulation conduit à l'anergie ou à l'apoptose des cellules T. Il s'agit ici du « signal 2 ». Enfin, le « signal 3 » correspond à la sécrétion de facteurs solubles par la DC. Ce troisième signal va finaliser le choix de la réponse vers un profil Th1, Th2 ou Th17. Parmi les facteurs solubles de polarisation (Figure 19), on peut citer l'IL-12, dont la présence ou l'absence va conduire à une réponse de type Th1 ou Th2 respectivement. La présence d'IL-10 pourra conduire à une réponse de type T régulatrice. La présence de TGF- β et d'IL-6 va induire la différenciation des lymphocytes en cellules de type Th17 (Bettelli 2007).

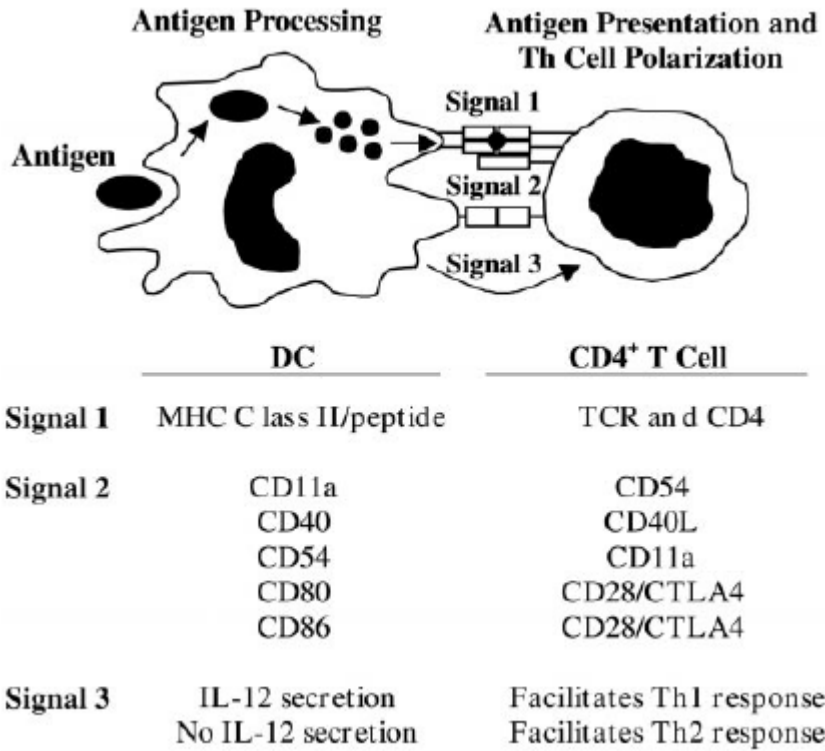


Figure 18 : la synapse immunologique. D'après Lipscomb (Lipscomb 2002)

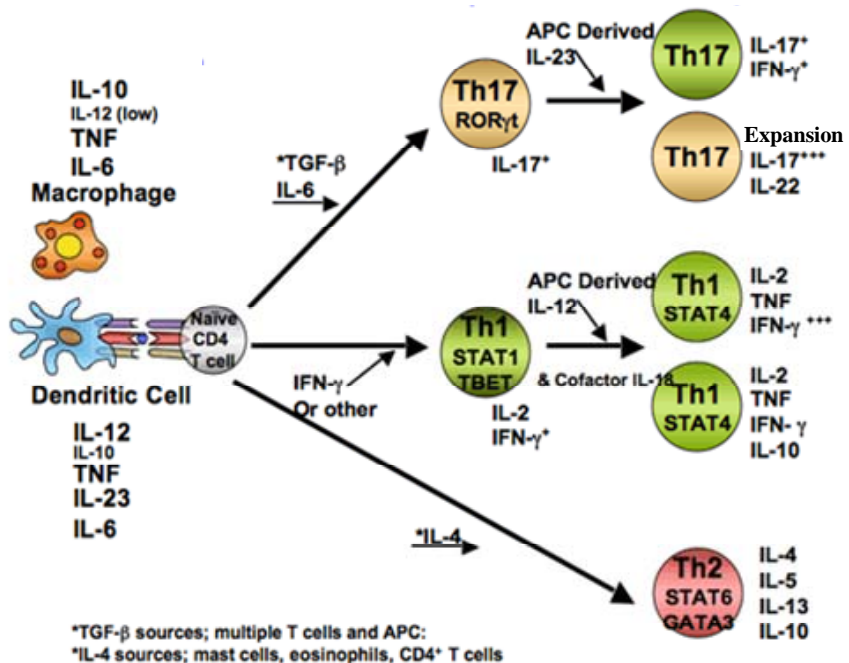


Figure 19 : Facteurs de polarisation. D'après O'Garra, National Institute for Medical Research.

III.2. DC dans le tractus respiratoire

III.2.a. Répartition des DC pulmonaires

Les DC ont été identifiées au niveau du tractus respiratoire (Figure 20) comme principales cellules présentatrices d'Ag résidentes, initialement retrouvées dans les pathologies chroniques du poumon (Kawanami 1981; Munro 1987; Soler 1985). D'autres études plus récentes ont démontré la présence de DC fonctionnelles chez des sujets sains et dans des modèles animaux expérimentaux à la fois dans les septa alvéolaires, dans la muqueuse respiratoire et dans la couche épithéliale (Holt 1987; Holt 1988; Schneeberger 1986; Sertl 1986). Ces cellules ont une morphologie caractéristique avec des dendrites et expriment le CMH II. Elles ont la capacité d'induire la prolifération de lymphocytes T (Holt 1990; Schon-Hegrad 1991). Ainsi, les DC se retrouvent aussi bien dans les tissus parenchymateux du poumon que dans l'épithélium des bronches, où elles forment un réseau d'immuno-surveillance comparable à celui formé par les LC dans l'épiderme. Dans les voies respiratoires de rat, on retrouve de 500 à 800 DC par mm² de surface épithéliale, densité comparable à celle observée chez la souris, le porc ou dans les bronchioles de poumon humain (Holt 1990; Schon-Hegrad 1991).

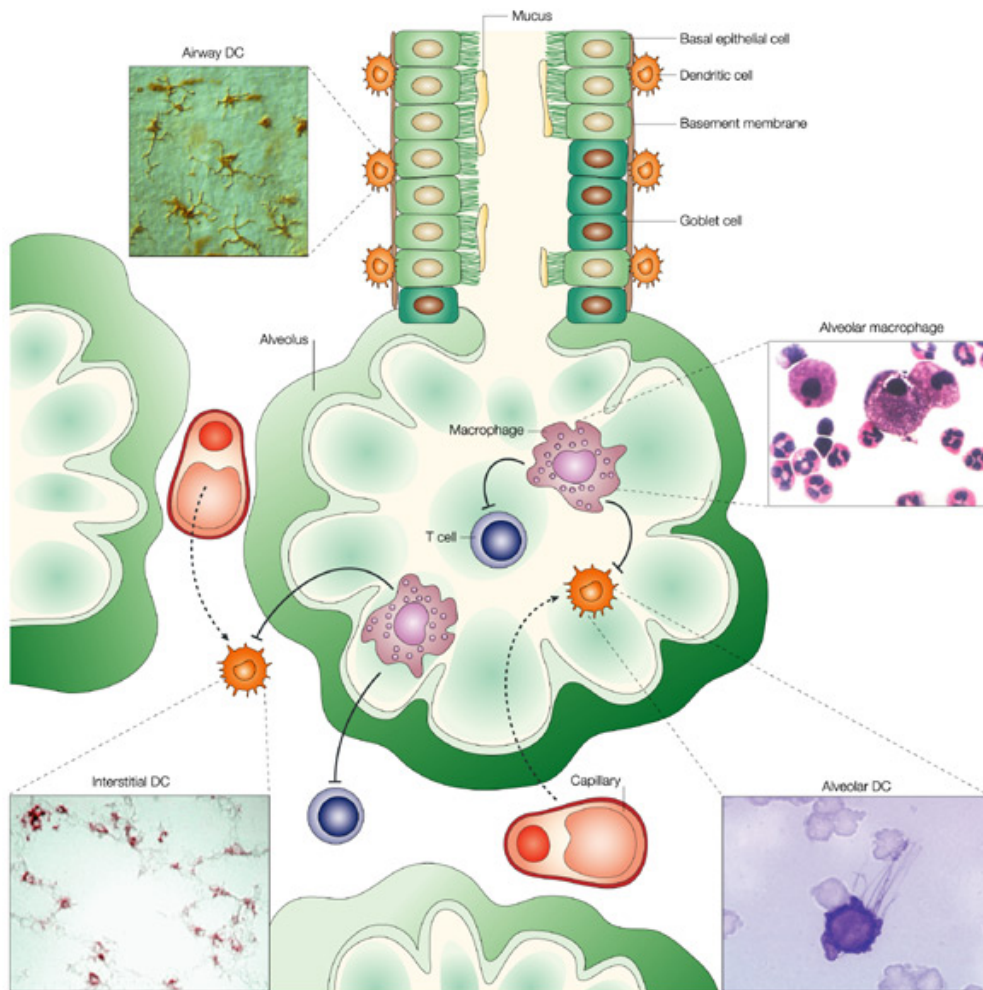


Figure 20- Répartition des DC dans le poumon. D'après Lambrecht et Hammad (Lambrecht 2003).

Les DC myéloïdes et plasmacytoïdes sont retrouvées au niveau du compartiment pulmonaire. Chez la souris, les DC plasmacytoïdes représentent environ 1,3% des cellules totales, alors que les DC myéloïdes représentent 0,7% (de Heer 2004). Ainsi, les DC plasmacytoïdes constituent la principale population de DC dans le poumon, à l'état basal.

III.2.b. Homéostasie et dynamique du pool de DC pulmonaires

En conditions physiologiques, les populations de DC intraépithéliales se renouvellent toutes les 36 à 48 heures, alors que celles du parenchyme pulmonaire ont une demi-vie d'environ 7 jours. La majorité des DC est donc sans cesse renouvelée, et ceci principalement à partir de précurseurs médullaires, bien qu'il ait été démontré la présence de précurseurs dans le poumon. Des études ont montré que seules les DC du tractus intestinal ont un

renouvellement aussi rapide, tandis que les LC de l'épiderme sont renouvelées en 21 jours minimum (Holt 2000). Ces données démontrent le dynamisme de ce réseau de surveillance et l'importance de l'homéostasie de ce pool cellulaire.

En conditions de stress, ou d'inflammation, le renouvellement des populations de DC pulmonaires est accéléré, reflétant ainsi leur rôle capital dans la surveillance et la défense de l'hôte. Ainsi, l'inhalation de stimuli microbiens, comme le LPS bactérien ou des bactéries *Moraxella catarrhalis* tuées par la chaleur (McWilliam 1994), provoque un large afflux de DC vers les tissus pulmonaires, en plus des polynucléaires neutrophiles. Ces DC repartent rapidement (en 24h) vers les ganglions drainants où elles vont interagir avec les lymphocytes T afin d'initier une réponse immunitaire adéquate. D'autres études ont confirmé ce recrutement massif de DC au niveau de la muqueuse respiratoire après exposition à des bactéries vivantes, des virus, ou des allergènes, suggérant le rôle de ces cellules dans les mécanismes de défense au niveau local (Lagranderie 2003; McWilliam 1997; McWilliam 1996). Ainsi, après exposition à un allergène relevant, le nombre de DC CD1a⁺ est significativement plus élevé dans la muqueuse bronchique de patients allergiques que de sujets sains, tout comme le nombre de DC plasmacytoïdes dans la muqueuse nasale (Jahnsen 2000; Jahnsen 2001). Par ailleurs, il est important de noter que les DC sont plus nombreuses au niveau de l'arbre bronchique chez des patients asthmatiques que chez des sujets sains à l'état basal (Bertorelli 2000) et que l'utilisation régulière de budésonide ou de fluticasone (corticoïdes stéroïdiens) est associée à une forte diminution du nombre de DC CD1a⁺ HLA-DR⁺ dans la muqueuse bronchique de patients asthmatiques (Bocchino 1997; Hoogsteden 1999; Lawrence 1998; Moller 1996).

De plus, des études *in vivo* sont venues renforcer ces approches *in vitro* et *ex vivo*. Ainsi, dans un modèle d'asthme chez le rat, le nombre de DC dans le LBA est multiplié par 60, après sensibilisation et exposition à l'OVA. De plus, l'exposition à l'allergène induit une augmentation du nombre de précurseurs de DC au niveau de la moelle osseuse, donnant un pool plus important de DC circulantes (Lambrecht 1999). Par ailleurs, des souris sensibilisées à l'ovalbumine et exposées au virus de la grippe ont davantage de DC CMH II⁺ CD11c⁺ dans les voies respiratoires et l'interstitium pulmonaire (Yamamoto 2000). De même, dans un modèle murin d'asthme, la maturation, le trafic et l'élimination des DC pulmonaires sont accélérés (Vermaelen 2003).

Ainsi, le recrutement rapide de DC dans la muqueuse respiratoire, sous l'influence de divers stimuli, suggère que le rôle premier des DC pulmonaires serait de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité spécifique dans les mécanismes de défense de l'hôte (Janeway

1992; Matzinger 1994). Cette migration est en partie contrôlée par les chimiokines, qui peuvent être produites par les autres cellules de l'inflammation recrutées sur le site-même, mais aussi par les cellules de structure comme les cellules épithéliales bronchiques (Holgate 2000; Reibman 2003). En effet, la réaction inflammatoire au niveau des voies aériennes chez le patient asthmatique est accompagnée par la production locale de chimiokines et de médiateurs, tels que le CCL2, le CCL5, le CCL7 et le PAF (Platelet Activating Factor), qui sont capables d'attirer des cellules inflammatoires et des DC *in vitro* et *in vivo* (McWilliam 1996; Sozzani 1995).

III.2.c. Fonctions des DC pulmonaires : tolérance versus immunité

Les DC sont les cellules présentatrices d'Ag les plus efficaces pour activer les cellules T naïves et mémoires. Toutefois, au niveau des tissus périphériques comme l'épiderme, ces fonctions de présentation sont faibles et nécessitent des signaux de maturation complémentaires pour être totalement opérationnelles, comme le GM-CSF en combinaison avec le TNF- α ou le CD40 ligand (Holt 1993; Nelson 1995; Steinman 1991). Ainsi, durant la période où les DC sont dans la muqueuse bronchique, celles-ci sont spécialisées dans la capture des Ag, et possèdent une faible capacité à présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T. Selon les facteurs responsables de leur maturation, ces DC acquièrent un phénotype plus ou moins mature et peuvent alors initier une réponse immunitaire en migrant depuis l'interface épithéliale jusqu'aux ganglions drainants (Figure 21).

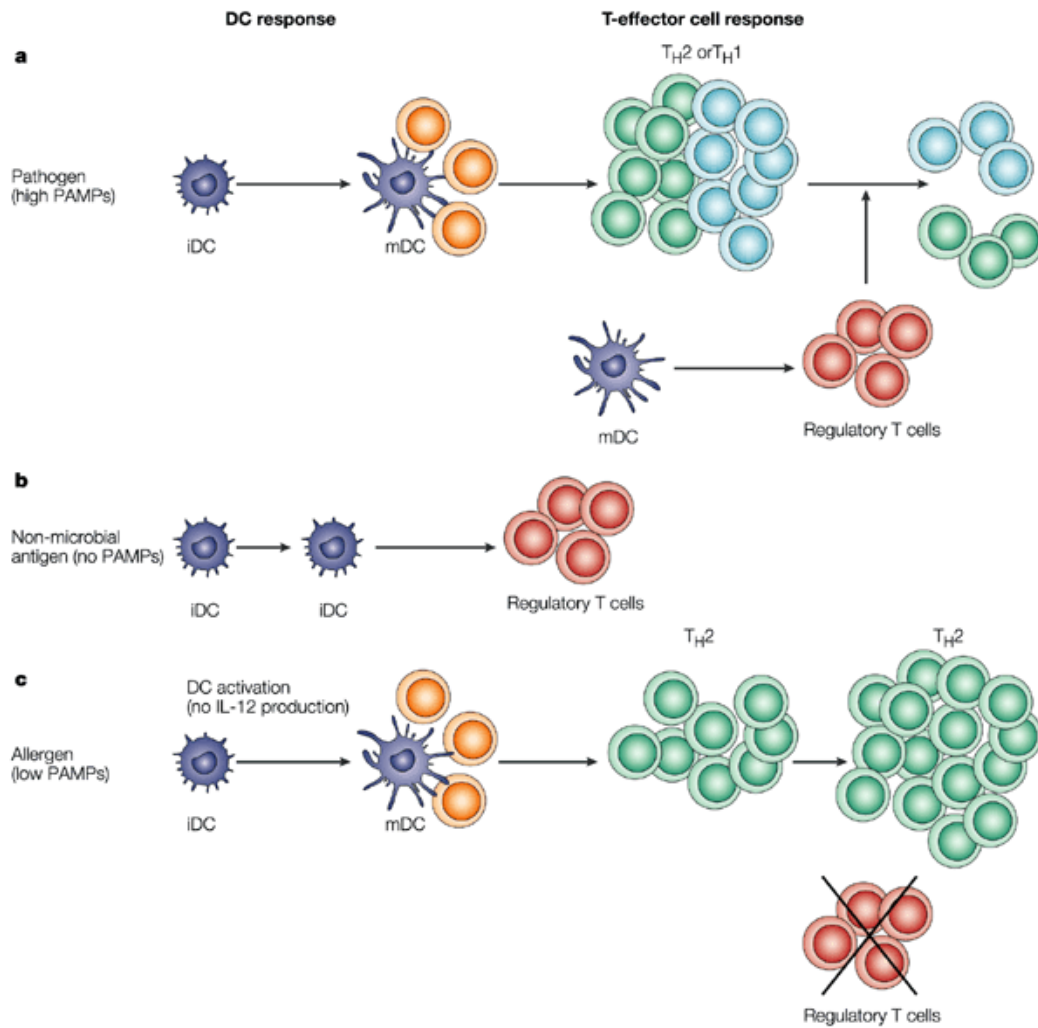


Figure 21- Différenciation des lymphocytes T régulateurs. (a) Une forte stimulation microbienne (fortes concentrations de PAMP) des DC conduit au développement de lymphocytes T CD4+ effecteurs (Th1 ou Th2), et à l'induction de T régulateurs. (b) Des DC exposées à un Ag, sans contamination par des PAMP, induisent la génération de T régulateurs. (c) Des DC exposées à des allergènes, ou de faibles concentrations de PAMP, génèrent des lymphocytes Th2, sans induction de T régulateurs. iDC: DC immature; IL-12, interleukin-12; mDC, DC mature; TH: lymphocyte T helper. D'après Herrick et Bottomly, (Herrick 2003).

En conditions physiologiques, les DC pulmonaires sont continuellement exposées à tout un panel de stimuli ; or l'organisme n'élabore pas de manière systématique une réaction immunitaire spécifique contre ceux-ci. Même si les macrophages alvéolaires ont un rôle inhibiteur de la réaction inflammatoire, les DC pulmonaires sont impliquées dans les phénomènes de tolérance (Shortman 2002). Des DC myéloïdes produisant de l'IL-10 sont

responsables d'une réponse régulatrice après exposition de la muqueuse à un antigène anodin (Akbari 2002). De plus, les DC plasmacytoïdes sont également capables d'induire une tolérance spécifique d'antigène et d'empêcher l'initiation d'une réponse allergique. Cet effet est lié à leur capacité à capturer l'antigène dans la muqueuse et ensuite à migrer vers les ganglions drainants (de Heer 2004). Cependant, cet état de tolérance peut être rompu, notamment suite à l'exposition à des PAMP. Selon le contexte, cette exposition conduira à une polarisation de la réaction immune vers une réponse de type Th1 ou Th2 (Eisenbarth 2002). De plus, cette modification du phénotype des DC conduisant à la polarisation de la réponse immune associée à une augmentation du nombre de DC dans l'arbre trachéo-bronchique participe très activement au développement de pathologies inflammatoires pulmonaires telles que l'asthme (Lambrecht 2003).

IV. Les Pattern Recognition Receptors ou PRR

Il est important de rappeler avant toute chose qu'un pathogène « complet » contient différents PAMP et induit donc la stimulation de plusieurs TLR différents et de PRR (Epelman 2004).

IV.1. Les Toll-Like Receptors TLR

Les Toll-like receptors (TLR) sont des protéines transmembranaires de type I, hautement conservées au cours de l'évolution (Anderson 2000). A l'origine, la protéine Toll est une molécule essentielle au développement embryonnaire de la Drosophile. Par la suite, il s'est avéré que cette protéine était également impliquée dans la réponse anti-microbienne contre les champignons et les bactéries Gram+ (Hoffmann 2003; Lemaitre 1996). Une famille homologue aux récepteurs Toll a été décrite chez les mammifères : ce sont les Toll-like receptors. 11 TLRs ont été décrits à ce jour (Figures 22 et 23).

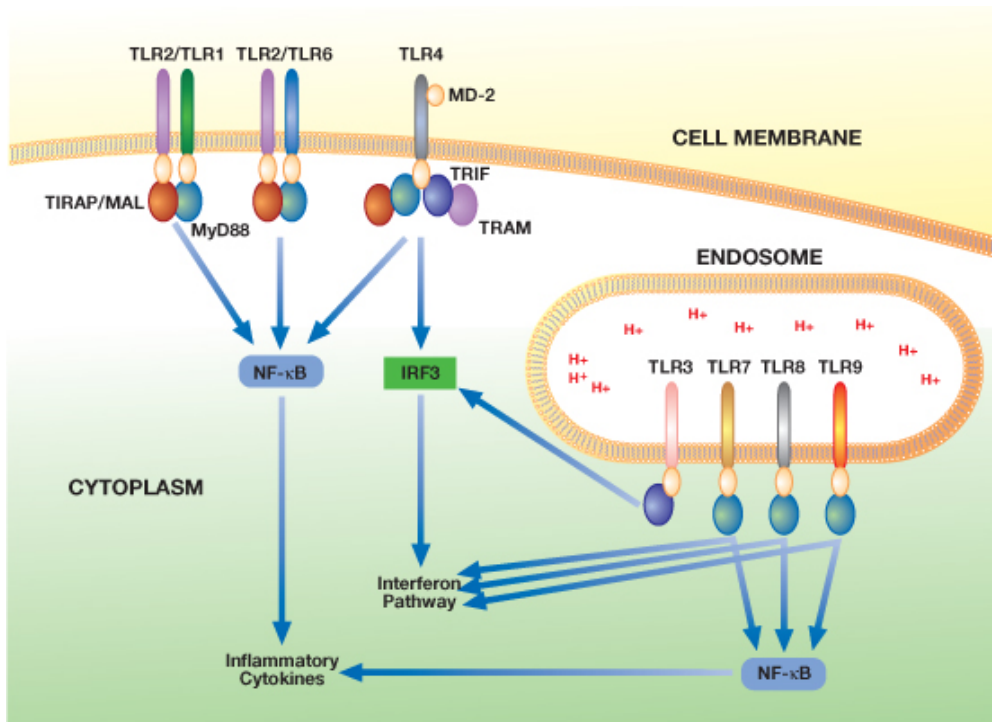


Figure 22 : Les TLR et leur signalisation. D'après MacKichan (MacKichan 2005).

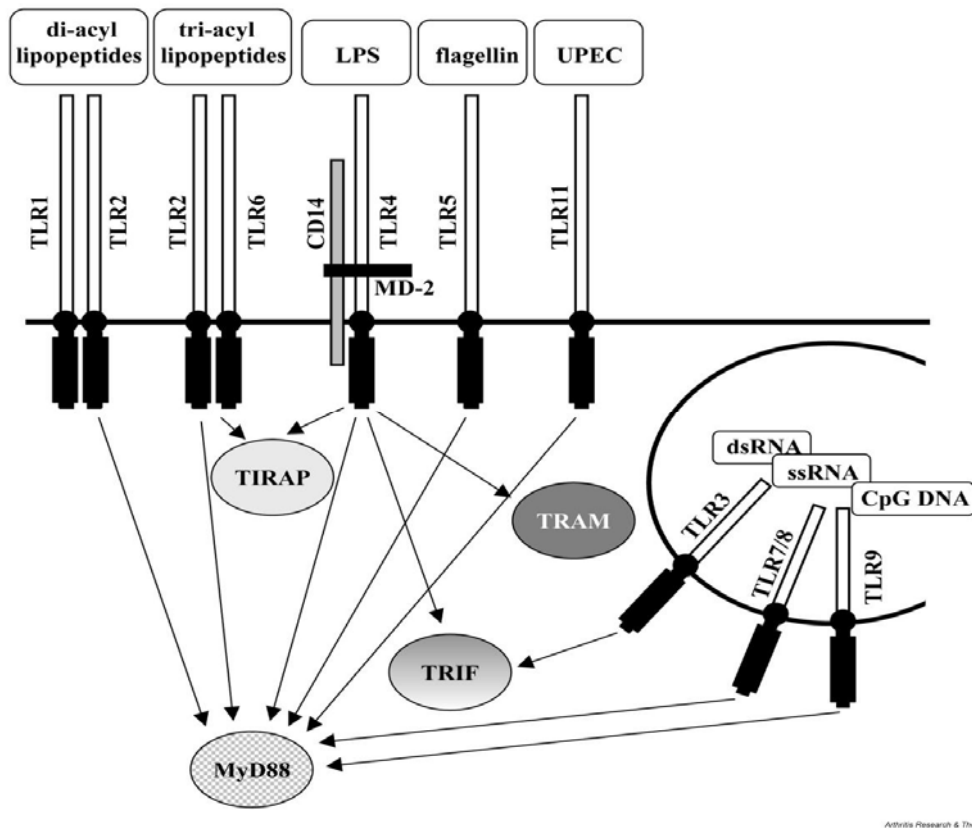


Figure 23 : Les TLR et leur signalisation. D'après Anders (Anders 2005)

IV.1.a. Structure

Les TLR sont des glycoprotéines de membrane. Ils sont constitués d'un domaine extracellulaire N-Terminal contenant des motifs LRR (leucine-rich repeat), et d'un domaine cytoplasmique C-Terminal ayant de fortes homologies avec celui du récepteur à l'IL-1, le domaine TIR (Toll/IL-1R). Le domaine LRR est impliqué dans l'interaction avec les PAMP (Pathogen-associated molecular pattern), alors que le domaine TIR assure la transduction du signal.

Le domaine TIR constitue une région particulièrement conservée, retrouvée chez un grand nombre de protéines transmembranaires et cytoplasmiques aussi bien chez les animaux que chez les plantes. De façon intéressante, les protéines contenant ce domaine jouent un rôle dans la défense de l'hôte. Le domaine TIR est présent dans diverses protéines telles que les TLR, les récepteurs de l'IL-1 et l'IL-18 (Torigoe 1997), mais aussi dans des protéines comme MyD88 et TIRAP (TIR domain-containing adaptor protein) impliquées dans la signalisation de ces trois types de récepteurs (Horng 2001; Medzhitov 1998). Le domaine TIR est une séquence homologue de 200 acides aminés, présentant trois boîtes particulièrement conservées : les boîtes 1, 2 et 3, contenant certains motifs consensus, et impliquées dans la signalisation. Le degré de conservation entre ces protéines et entre les espèces indique que la superfamille IL-1R/TLR représente un système de signalisation majeur dans la réponse immune.

Le domaine extracellulaire des TLR contient 19 à 25 copies en tandem de motifs LRR. Le domaine LRR des TLR adopte une forme de fer à cheval, dont la partie concave est impliquée dans la reconnaissance des différents pathogènes. La reconnaissance des différents ligands de TLR peut se faire directement au niveau de cette partie concave, ou indirectement par des corécepteurs comme c'est le cas pour le TLR4 (CD14 et LBP : LPS-binding protein) ou le TLR9 (CXCL16). Malgré le haut degré de conservation de ces domaines LRR, les TLR reconnaissent des motifs structurellement différents (Akira 2001).

IV.1.b. Les ligands

Chaque TLR possède une spécificité de ligand, qui est fonction de sa localisation. Les TLR extracellulaires comme les TLR1, 2, 4, 5, 6 vont reconnaître les motifs de pathogènes extracellulaires, alors que les TLR intracellulaires endosomaux comme les TLR3, 7, 8 et 9 reconnaîtront les motifs de pathogènes intracellulaires (acides nucléiques) (figures 23 et 24).

Les connaissances actuelles quant aux ligands des TLRs sont regroupées dans le tableau qui suit (Figure 24).

Les ligands de TLRs sont de deux origines :

- origine exogène : il s'agit de molécules de structure (LPS, PGN, ADN...), de facteurs de virulence (lipoarabinomannane) ou de motilité (flagelline), nécessaires au développement ou à la survie du pathogène,

- origine endogène : il s'agit alors de molécules dont la présence correspond à un signal de danger pour la cellule, comme les protéines de choc thermique (heat-shock protein HSP) ou les ADN modifiés.

A noter que certains ligands ne sont pas propres aux pathogènes : les ARN simple et double brin existent également dans les cellules des mammifères. Les TLR doivent donc discriminer le soi du non-soi. C'est pourquoi les TLR sont localisés de manière à ne reconnaître que des ligands/motifs pathogènes et non pas de l'hôte

D'autre part, il existe à présent des ligands synthétiques des TLRs, permettant l'étude de la signalisation cellulaire induite par un TLR donné.

Receptor	Ligand	Origin of Ligand
TLR1	-Triacyl Lipopeptides -Soluble Factors	Bacteria and Mycobacteria <i>Neisseria Meningitidis</i>
TLR2	-Lipoprotein/Lipopeptides -Peptidoglycan -Lipoteichoic acid -Lipoarabinomannan -Phenol-soluble modulins -Glycoinositolphospholipids -Glycolipids -Porins -Atypical Lipopolysaccharide -Atypical Lipopolysaccharide -Zymosan -Heat-shock protein 70* -Lysophosphatidylserine -Pam ₃ CysK ₄	Various pathogens Gram-positive bacteria Gram-positive bacteria Mycobacteria <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Treponema maltophilum</i> <i>Neisseria</i> <i>Leptospira interrogans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> Fungi Host <i>Schistosoma mansoni</i> Synthetic compounds
TLR3	-Double-stranded RNA -Double-stranded RNA -Polyinosinic-polycytidylic acid	Viruses <i>Schistosoma mansoni</i> Synthetic compounds
TLR4	-Lipopolysaccharide -Taxol -Fusion protein -Envelope protein -Heat-shock protein 60* -Heat-shock protein 70* -Type III repeat extra domain A of fibronectin* -Oligosaccharides of hyaluronic acid*	Gram-negative bacteria Plants Respiratory syncytial virus Mouse mammary-tumor virus <i>Chlamydia pneumoniae</i> Host Host Host

	-Polysaccharide fragments of heparan sulfate* -Fibrinogen*	Host Host
TLR5	-Flagellin	Bacteria
TLR6	-Diacyl Lipopeptides -Lipoteichoic acid -Zymosan	<i>Mycoplasma</i> Gram-positive bacteria Fungi
TLR7	-Imidazoquinoline -Loxoribine -Bropirimine -Single-stranded RNA	Synthetic compounds Synthetic compounds Synthetic compounds Viruses
TLR8	-Imidazoquinoline -Single-stranded RNA	Synthetic compounds Viruses
TLR9	-CpG-containing DNA	Bacteria and viruses
TLR10	-N.D.	N.D.
TLR11	-N.D.	Uropathogenic bacteria

Figure 24 : Les ligands de TLR. *Les préparations de ligands de TLR2 et TLR4, surtout celles d'origine endogène, pouvant être contaminées par du LPS, des analyses plus précises sont requises. ND : not determined. D'après Akira, Aksoy, van der Kleij (Akira 2004; Aksoy 2005; van der Kleij 2002).

IV.1.c. La signalisation

L'interaction du TLR avec son ligand spécifique induit sa dimérisation ainsi qu'un changement conformationnel requis pour le recrutement des différentes molécules de signalisation, et en premier lieu des protéines adaptatrices possédant un domaine TIR, à savoir TIRAP (TIR-domain-containing adaptor protein) encore appelée MAL (MyD88-adaptor-like protein), TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) encore appelée TICAM1 (TIR-domain-containing molecule 1), et TRAM (TRIF-related adaptor molecule) encore appelée TICAM2 (TIR-domain-containing molecule 2) (Akira 2004). Ces différentes molécules adaptatrices sont regroupées dans la figure 25. A partir de cette étape s'offrent deux voies de signalisation possibles : une voie dépendante de la protéine adaptatrice MyD88 et une voie indépendante de MyD88.

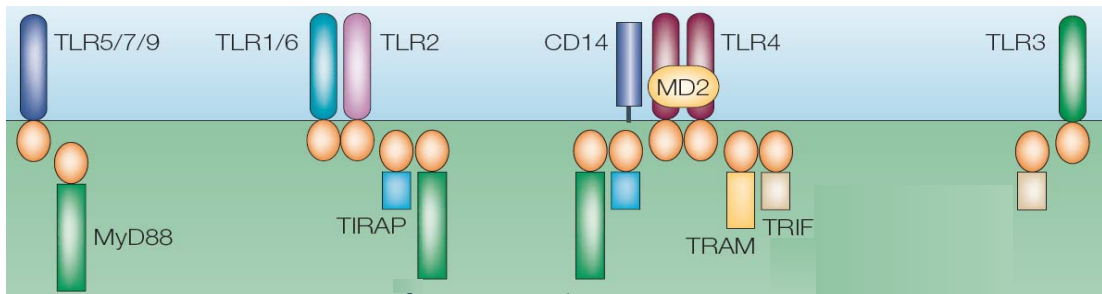


Figure 25 : Les différentes protéines adaptatrices. Modifié d'après Akira (Akira 2004).

IV.1.c.i. La voie dépendante de MyD88

La voie de signalisation dépendante de MyD88 est résumée dans la figure 26.

Le gène MyD88 fut initialement découvert dans les cellules myéloleucémiques M1 qui l'exprimaient lors de leur différenciation en macrophage induite par l'IL-6 (Lord 1990). Par la suite, des études ont démontré son implication dans la signalisation par les TLR et l'IL-1R (Burns 1998; Muzio 1997; Wesche 1997).

MyD88 possède un domaine de mort DD (Death Domain) à son extrémité N-Terminale, et un domaine TIR à son extrémité C-Terminale.

Après stimulation du TLR par son ligand, MyD88 interagit de façon homotypique par son domaine TIR avec le TLR (ou l'IL-1R ou l'IL-18R). Cette première interaction permet le recrutement d'IRAK4 par interaction homotypique entre les domaines DD de MyD88 et d'IRAK4, permettant le recrutement d'IRAK1. IRAK4 induit la phosphorylation d'IRAK1. TRAF6 (TNF-receptor-associated factor 6) est alors recruté au niveau de ce complexe protéique et s'associe à IRAK1 phosphorylé. IRAK1 et TRAF6 se dissocient pour former un nouveau complexe à la membrane avec TAK1, TAB1 et TAB2, ce qui induit la phosphorylation de TAK1 et TAB2. IRAK1 est dégradée au niveau de la membrane plasmique et le complexe TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 migre vers le cytosol où il s'associe avec les ubiquitine-ligases UBC13 et UEV1A. TRAF6 est alors ubiquitinylé induisant l'activation de TAK1. La kinase TAK1 phosphoryle les MAPK (mitogen-activated protein kinases) ainsi que le complexe IKK inhibitor of nuclear factor- κ B-kinase complex. Le complexe IKK phosphoryle I κ B entraînant son ubiquitylation et par conséquent sa dégradation. La translocation nucléaire de NF- κ B est alors observée, induisant l'expression des gènes cibles. Parallèlement, la MAPK JNK (JUN N-terminal kinase) induit l'expression de gènes via AP-1. Cette voie de signalisation est celle induite par l'IL-1 et l'IL-18.

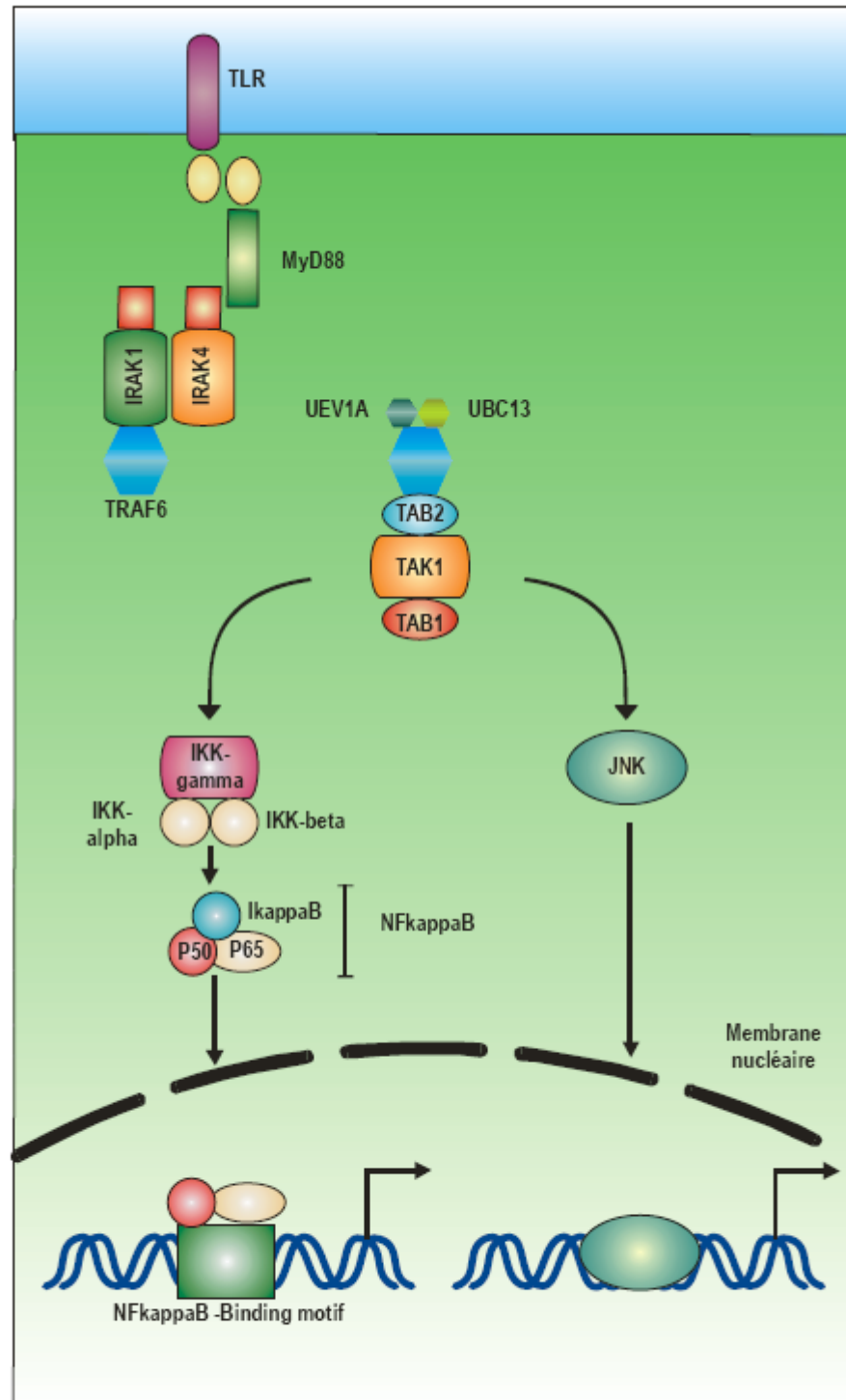


Figure 26 : Voie de signalisation dépendante de MyD88. D'après Akira Nature Rev Immunol 2004.

IV.1.c.ii. La voie indépendante de MyD88

La voie de signalisation indépendante de MyD88 fut mise en évidence dans les études mettant en jeu des cellules ou des animaux déficient en MyD88 (Figure 27).

Des souris MyD88-déficientes ne produisent pas de TNF ou d'IL-6 lorsqu'elles sont exposées à l'IL-1 ou à des ligands de TLR2, -4, -5, -7 et -9 (Adachi 1998). Dans une autre étude assez proche, Kawai *et al* ont mis en évidence les voies dépendante et indépendante de MyD88 en exposant des cellules déficientes en MyD88 au LPS, montrant une activation tardive mais présente de NF- κ B (Kawai 1999), ainsi que la production des ISG (Interferon-stimulated genes) (Kawai 2001).

La voie indépendante de MyD88 intervient dans la signalisation via les TLR3 et 4, et conduit également à la production d'Interféron- β .

Dans cette voie, deux molécules adaptatrices interviennent : TRIF et TRAM.

La protéine TRIF joue un rôle clé dans la voie indépendante de MyD88. En effet, la surexpression de TRIF dans des cellules HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 Cells) conduit à l'activation de NF- κ B ainsi qu'à la production d'IFN- β , alors que le dominant négatif de TRIF inhibe l'activation du promoteur de l'IFN- β induite par le TLR3 (Yamamoto 2002). Une étude *in vivo* conduite chez des souris déficientes pour TRIF montre qu'en réponse aux ligands de TLR3 et -4, ces souris ont un défaut d'expression de l'IFN- β ainsi qu'un défaut d'activation d'IRF-3. Par ailleurs, ces souris présentent un important défaut de production de cytokines inflammatoires en réponse au ligand de TLR4 (Yamamoto 2003a).

La protéine TRAM quant à elle joue un rôle important dans la voie de signalisation indépendante de MyD88. En effet, des souris invalidées pour TRAM montrent, tout comme les souris déficientes pour TRIF, un défaut d'activation d'IRF3 (Interferon Regulatory factor 3), une réduction de l'expression des ISG, ainsi qu'un défaut de production de cytokines inflammatoires en réponse au ligand de TLR4. Cependant, les souris invalidées pour TRAM montrent une réponse normale lors de la stimulation du TLR3. TRAM est donc impliqué dans la signalisation du TLR4 indépendante de MyD88 mais dépendante de TRIF (Fitzgerald 2003; Yamamoto 2003b).

Ainsi, l'activation des TLR3 et -4 permet le recrutement de TRIF. A partir de là, deux voies s'ouvrent : TRIF recrute TBK1 (TRAF-family-member-associated nuclear factor- κ B activator (TANK)-binding kinase) conduisant à la phosphorylation d'IRF3 ; ou TRIF recrute

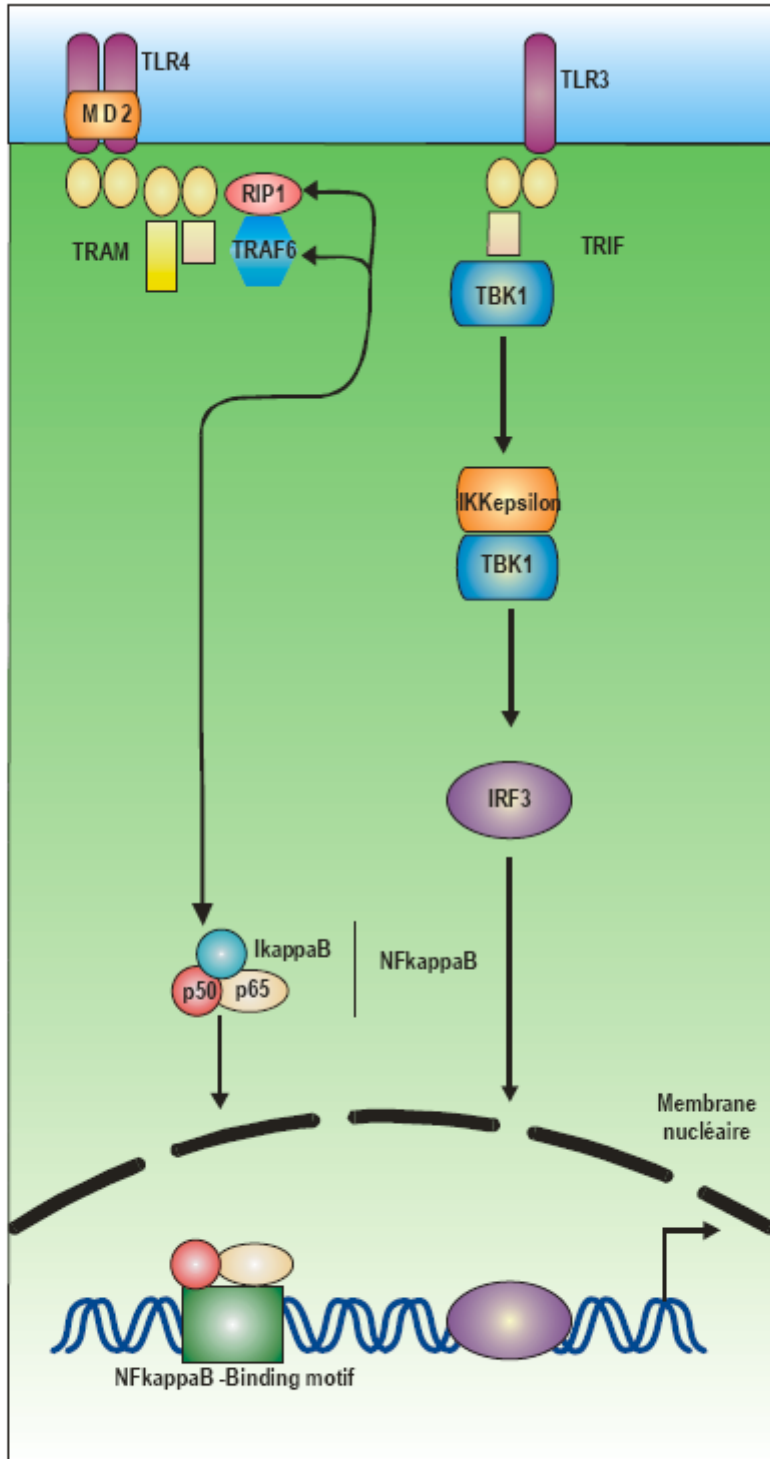


Figure 27 : Voie de signalisation indépendante de MyD88. D'après Akira Nature Rev Immunol 2004.

TRAF6 et RIP1 (receptor-interacting protein 1), ce qui conduit à l'activation de NF- κ B. Ces deux voies contribuent à l'expression de l'IFN- β .

La phosphorylation d'IRF3 induit sa dimérisation ayant pour conséquence sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, IRF3 recrute les co-activateurs de transcription p300 et CBP (cAMP-responsive-element-binding protein(CREB)-binding-protein), ce qui a pour conséquence l'activation de la transcription des gènes IFN de Type I. Une fois sécrété, l'IFN- β va agir de façon auto- et paracrine, se lier à son récepteur (IFN type IR) et permettre l'induction de l'expression des ISG par la voie JAK(Janus activated kinase)-STAT (signal transducer and activator of transcription). La phosphorylation des protéines STAT-1 (signaling transducer and activator of transcription) induit leur dimérisation et leur migration vers le noyau où elles se fixent aux éléments de réponse ISRE (IFN stimulated response elements), conduisant finalement à l'activation des ISG (Taniguchi 2002).

La voie indépendante de MyD88 joue un rôle clé dans la maturation des DC induite par le LPS. Une étude a montré que l'exposition au LPS de DC déficientes en MyD88 issues de la moëlle osseuse induit une augmentation de l'expression de molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) et de leur potentiel de stimulation et de prolifération des lymphocytes T (Kaisho 2001). Par ailleurs, l'expression des molécules de costimulation par la voie indépendante de MyD88 est secondaire à la production d'IFN- β (Hoshino 2002).

Enfin, chaque TLR possède des spécificités dans la voie de signalisation, en plus de la voie commune dépendante de MyD88, permettant d'expliquer le développement de réponses biologiques distinctes en fonction des TLR impliqués. En effet, l'activation des TLR2 et 4 par leur ligand respectif n'induit pas le même panel de cytokines et de chimiokines alors que dans les deux cas, l'activation de NF- κ B et des MAPK est comparable (Re 2001).

IV.1.d. Expression dans les DC

	Cellules purifiées			Différenciées <i>in vitro</i>				
	mDC	pDC	MDDC	CD4 ⁺	CD8 ⁺	DN	pDC	BMDC
TLR1	++	+	++	++	++	++	++	
TLR2	++	-	++	++	++	++	++	
TLR3	++	-	++	-	++	++	-	
TLR4	-	-	++	++/-	++/-	++/-	++/-	++
TLR5	+	-	+/-	++	-	++	+	
TLR6	++	++	++	++	++	++	+	
TLR7	+/-	++	-	++	-	++	++	
TLR8	++	-	++	++	++	++	++	
TLR9	-	++	-	++	++	++	++	++
TLR10	+	+						

Figure 28 : Expression des TLR par les différents types de DC humaines et murines. Modifié d'après Iwasaki (Iwasaki 2004).

Etant donné que les TLR jouent un rôle clé dans la reconnaissance des pathogènes, les différents membres de la famille des TLR sont exprimés par les cellules impliquées en première ligne de défense, à savoir les DC mais aussi les neutrophiles, les macrophages ainsi que les cellules endothéliales dermales et les cellules épithéliales des muqueuses. A noter que les lymphocytes B et T expriment les TLR2 et 4 (Imler 2001).

Il faut savoir que l'expression des TLR est variable selon les espèces. Ainsi on observe des différences d'expression des TLR entre les DC myéloïdes humaines et murines (Figure 28). Par exemple, le TLR8 est exprimé par les DC myéloïdes humaines mais pas murines. A l'inverse, on retrouve le TLR9 dans les DC myéloïdes murines mais pas humaines.

De plus, l'expression des TLR varie également en fonction du type de DC (DC myéloïde, plasmacytoïde), mais il faut également prendre en compte leur mode de préparation, soit elles sont isolées à partir du sang ou des tissus, soit elles sont différenciées à partir de cellules souches ou de monocytes.

Concernant leur localisation, des études ont montré que les TLR3, 7, 8 et 9 nécessitaient un environnement acide pour leur activation et la maturation des endosomes, alors que les TLR1, 2, 4, 5 et 6 ne nécessitaient pas de maturation des endosomes et étaient donc localisés à la surface de la cellule (Ahmad-Nejad 2002; Heil 2003; Lee 2003; Matsumoto 2003).

Les TLR jouent un rôle clé dans la polarisation de la réponse immune, dans la mesure où leur activation va permettre dans un premier temps la production de cytokines inflammatoires, influençant ainsi la réponse immunitaire acquise. En effet, l'activation des TLR représente un des événements les plus efficaces pour induire la maturation des DC (Takeda 2003).

De nombreuses études ont montré l'implication des TLR dans le développement d'une réponse immune de type Th1. Cependant, des études récentes montrent que l'activation des TLR peut dans certaines conditions induire des réponses de type Th2 mais aussi T régulatrices. Dans une étude *in vivo*, par exemple, le LPS à faible dose va induire préférentiellement une réponse de type Th2, alors que s'il est administré à forte dose, il induira une réponse de type Th1 (Eisenbarth 2002). En revanche, la lysophosphatidylsérine de *Schistosoma mansoni* va plutôt permettre aux DC d'induire une réponse T régulatrice (van der Kleij 2002).

IV.1.e. Expression dans les cellules épithéliales bronchiques

Les cellules épithéliales bronchiques sont capables de reconnaître les nombreux pathogènes inhalés, et d'activer des voies de signalisation conduisant à une réponse inflammatoire. Elles expriment des TLR tout comme les cellules du système immunitaire. Cependant, leur distribution et leur localisation sont différentes.

Des études ont montré que les ARNm des TLR1 à 10 étaient détectés dans des cellules épithéliales pulmonaires humaines en culture (Greene 2005; Muir 2004). Il a également été montré que les protéines TLR1-5 et TLR9 étaient exprimées dans des lignées d'épithélium trachéal et bronchique (Greene 2005). Les TLR2, 4 et 5 sont exprimés dans les cellules épithéliales des voies aériennes (Hauber 2005; Hertz 2003; Zhang 2005). L'expression du TLR2 a également été détectée au niveau de l'épithélium alvéolaire (Droemann 2005b).

IV.1.e.i. TLR2

Un autre acteur important de la reconnaissance des microorganismes au niveau du poumon est le TLR2, puisqu'il est fonctionnel et localisé à la surface des CEB.

Des études ont montré que des ligands synthétiques de TLR2 (Armstrong 2004; Gon 2004) et la bactérie *M. pneumoniae* (Chu 2005) activaient des cultures primaires ou des lignées de cellules épithéliales bronchiques humaines via le TLR2. Une étude de Soong *et al*

montre que des complexes de TLR2 et d'asialoGM1 associés aux radeaux lipidiques localisés à la surface des cellules épithéliales bronchiques forment des complexes induisant des réponses inflammatoires efficaces face à des pathogènes à tropisme pulmonaire comme *P. aeruginosa* ou *S. aureus* (Soong 2004). Le TLR2 s'hétérodimérise avec le TLR6 permettant ainsi la reconnaissance des lipoprotéines diacylées (Takeuchi 2001).

A noter que l'expression du TLR2 peut être régulée positivement par les pneumocoques dans les cellules épithéliales bronchiques (Schmeck 2006).

IV.1.e.ii. TLR3

Le TLR3 est exprimé constitutivement par les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques et participe à la reconnaissance du virus influenza A (Guillot 2005), du rhinovirus (Hewson 2005) et du ligand synthétique, l'ARN double brin poly (I :C) (Hewson 2005; Ritter 2005). Les études concernant sa localisation montrent des différences de localisation selon le degré d'activation des cellules et le type cellulaire. Ritter et collaborateurs ont montré que le TLR3 avait une localisation intracellulaire dans les cellules primaires SAEC (Small Airway Epithelial Cell) sans stimulation et après stimulation par le poly (I :C) (Ritter 2005). Deux autres études ont été menées sur des lignées de cellules épithéliales alvéolaires A549 et de cellules épithéliales bronchiques BEAS-2B, montrant qu'en l'absence de stimulation, le TLR3 était intracellulaire dans ces deux lignées ; en revanche, il devient membranaire après stimulation par le Rhinovirus (Guillot 2005; Hewson 2005).

L'étude de Ritter *et al* sur des cultures primaires de SAEC (small airway epithelial cells) montre que l'expression du TLR3 est régulée positivement par le poly(I :C) aussi bien au niveau des ARN que des protéines (Ritter 2005).

Enfin, une étude *in vivo* a montré que le TLR3 n'était pas indispensable à la clairance des virus, mais qu'il jouait un rôle important dans la réaction inflammatoire consécutive à l'exposition au virus ; le TLR3 semble réguler la balance des cytokines, régulant positivement la production d'IFN- γ et régulant négativement la production d'IL-5 et d'IL-13 entre autres. En effet, des souris TLR3^{-/-} exposées au RSV développent une réaction inflammatoire inappropriées, à savoir une surproduction de mucus et un important recrutement d'éosinophiles, consécutifs à la production d'IL-13 et d'IL-5 respectivement (Rudd 2006).

IV.1.e.iii. TLR4

De la même manière que pour le TLR3, la localisation du TLR4 est controversée : une étude réalisée sur la lignée de cellules épithéliales trachéobronchiques BEAS-2B et la lignée de cellules épithéliales alvéolaires A549 a montré que ces cellules répondent à des doses plus importantes de LPS comparativement aux macrophages, suggérant une localisation intracellulaire du TLR4 (Guillot 2004). Une étude contradictoire a montré que le TLR4 était localisé à la surface des lignées 16HBE14o⁻ (cellules respiratoires normales) et CFTE29o⁻ (cellules épithéliales trachéales de mucoviscidose homozygotes pour la mutation du régulateur de conductance transmembranaire $\Delta F508$ CF) (Greene 2005). Une autre étude a montré dans un contexte inflammatoire (infection par le virus respiratoire syncytial), qu'en plus de l'augmentation de son expression, le TLR4 était relocalisé au niveau de la membrane plasmique (Monick 2003).

Une étude *in vivo* sur des souris TLR4^{-/-} a montré que le TLR4 était indispensable à l'activation des cellules épithéliales bronchiques lors de l'exposition à *H. influenza*, permettant la production par ces cellules de MIP1 α et de TNF- α (Wang 2002).

Le TLR4 permet également de reconnaître d'autres substrats que le LPS, comme la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*, bactérie à Gram positif, induisant la production d'IL-6 consécutive à l'activation de la voie MyD88 et NF- κ B, et induisant la production de TNF- α lorsqu'elle est associée au peptidoglycane, un ligand de TLR2 (Malley 2003). Par ailleurs, les TLR4 et le CD14 sont tous deux indispensables à la reconnaissance de la protéine de fusion RSV induisant la production des cytokines inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α . Cette protéine de fusion permet donc le développement d'une réponse immunitaire protectrice vis à vis du RSV (Kurt-Jones 2000). Enfin, une étude clinique a montré que les mutations du TLR4 (Asp299Gly et Thr399Ile) étaient associées à l'augmentation du risque de développer une bronchiolite sévère due au RSV chez les enfants, démontrant ainsi le rôle du TLR4 dans cette infection virale (Tal 2004). A noter qu'*in vivo* l'expression du TLR4 est régulée positivement dans l'épithélium bronchique et les macrophages après inhalation de LPS (Saito 2005).

En résumé, l'expression des TLR3 et 4 semble augmentée et les récepteurs relocalisés vers la membrane lors de l'activation des cellules épithéliales bronchiques.

IV.1.e.iv. TLR5

Les bactéries flagellées sont également capables d'activer les cellules épithéliales bronchiques via le TLR5. C'est notamment le cas de *Bordetella Bronchiseptica* (Lopez-Boado 2005), de *Pseudomonas aeruginosa* (Sadikot 2005; Zhang 2005) et de *L. pneumophila* (Hawn 2003). Cette activation est médiée par la liaison de la flagelline sur le TLR5 (Hayashi 2001) qui conduit à la production de chimiokines comme le CXCL8, chimiokine essentielle au recrutement des neutrophiles et le CCL20 (Ramos 2004).

IV.1.e.v. TLR7 et 8

On connaît peu de choses concernant l'expression et la fonctionnalité des TLR7 et 8 dans le poumon. En effet, les ligands de ces TLR (ARN simple brin) ne stimulent pas les cellules épithéliales bronchiques.

IV.1.e.vi. TLR9

Une étude sur la lignée de cellules épithéliales alvéolaires cancéreuses A549 a démontré l'expression et la fonctionnalité de ce récepteur (Droemann 2005a). *In vivo*, l'immunisation de souris avec des motifs CpG réduit la charge virale de *Cryptococcus neoformans* dans le poumon ; cependant, il semble difficile à l'issue de cette étude de savoir si cet effet est dû à l'expression et la fonctionnalité du TLR9 dans les cellules pulmonaires ou dans les cellules immunitaires (Edwards 2005).

La figure 29 résume l'expression des TLR dans les CEB.

TLR	Modèle cellulaire	Intracellulaire	Extracellulaire	Référence
TLR2	-16HBE		X	Soong 2004
TLR3	-SAEC -A549 et BEAS-2B -Beas-2B	X X (Sans stimulation) X (Sans stimulation)	X (stimulation)	Ritter 2005 Guillot 2005 Hewson 2005
TLR4	-A549 et BEAS-2B -16HBE14o- et CFTE29o- -A549	X	X X(inflammation)	-Guillot 2004 -Greene 2005 -Monick 2003

Figure 29 : Tableau récapitulatif de l'expression des TLR dans les cellules épithéliales bronchiques.

IV.2. Les Récepteurs d'épuration ou Scavenger Receptors

Les récepteurs scavenger ou récepteurs d'épuration appartiennent à une famille diversifiée sur le plan structural, mais dont la propriété commune est, à l'origine, de lier les lipoprotéines modifiées, les LDL (Low Density Lipoproteins). Ces récepteurs sont exprimés constitutivement par les cellules myéloïdes, mais peuvent également être induits sur de nombreux types cellulaires. Plus tard, d'autres propriétés leur ont été attribuées, comme la liaison et l'internalisation d'une grande variété de pathogènes, de même que des molécules endogènes ou modifiées dérivées de l'hôte (corps apoptotiques). Ils participent ainsi à une grande variété de processus physiologiques et pathologiques.

IV.2.a. Structure

La famille des récepteurs scavenger se décompose en 8 sous-classes de A à H ayant peu d'homologies de séquences mais qui cependant reconnaissent des ligands communs (Figure 30).

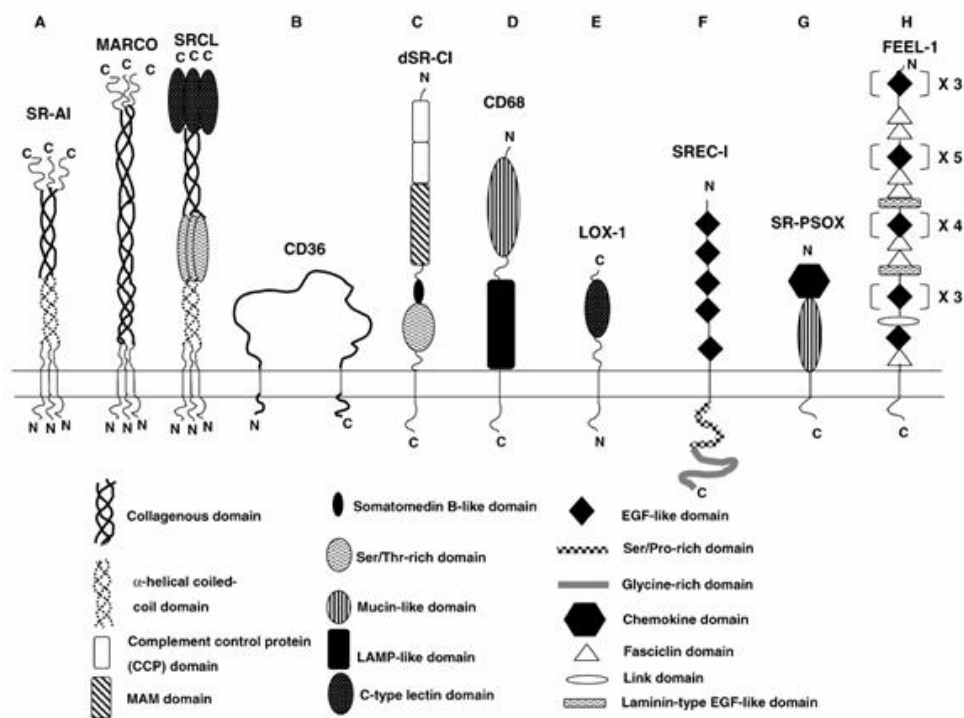


Figure 30 : Les différentes classes de récepteurs scavenger. D'après Murphy (Murphy 2005).

IV.2.a.i. Classe A

La classe A des récepteurs scavenger comprend les protéines SR-A1, SR-A2 et SR-A3 issues toutes trois de l'épissage alternatif du gène SR-A (Freeman 1990; Gough 1998), la protéine SRCL (Nakamura 2001) et la protéine MARCO (Macrophage Receptor with Collagenous structure) (Elomaa 1995). Les récepteurs scavenger appartenant à cette classe sont des glycoprotéines membranaires de type 2 (extrémité C-Terminale extracellulaire, simple région transmembranaire et extrémité N-Terminale intracellulaire) qui peuvent former des homotrimères. Elles contiennent toutes au niveau de leur partie extracellulaire un domaine de type collagène permettant la liaison du ligand. Les protéines SR-A1, SR-A2 et SR-A3 sont exprimées sur les macrophages, les cellules endothéliales et également les cellules musculaires lisses. A noter que SR-A3 n'est pas fonctionnel et est séquestré dans le réticulum endoplasmique. MARCO quant à lui est largement exprimé sur les macrophages de la zone marginale de la rate et des ganglions lymphatiques, et également sur les DC de la rate. Enfin, SRCL n'est exprimé que sur les cellules endothéliales.

IV.2.a.ii. Classe B

La classe B des récepteurs scavenger comprend les protéines CD36, LIMPII et les deux protéines issues de l'épissage alternatif du gène SR-B, SR-B1 (CLA-1) et SR-B2. Les récepteurs scavenger appartenant à la classe B sont des glycoprotéines membranaires de type 3 (multiples domaines transmembranaires) caractérisées par une structure en « épingle à cheveux ». Elles possèdent deux régions transmembranaires situées près des extrémités C- et N-Terminales cytoplasmiques (Greenwalt 1992). Le domaine central extracellulaire de CD36 contient des ponts disulfures intra-chaines qui sont requis pour la liaison du ligand (Gruarin 1997). CD36 et SR-B1 ont la capacité de former des dimères et des multimères (Greenwalt 1992; Reaven 2004; Thorne 1997). Tout comme les récepteurs scavenger de classe A, SR-B1 est exprimé sur les monocytes, les macrophages, mais il est en plus exprimé de façon importante dans les tissus adipeux et stéroïdogéniques (Cao 1997). L'expression du CD36 est restreinte aux lignées lymphoïdes et hématopoïétiques comme les monocytes, macrophages, les plaquettes, les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules musculaires lisses et certaines cellules épithéliales (Matsumoto 2000).

IV.2.a.iii. Classe C

La protéine dSR-C1 a été découverte chez *Drosophila melanogaster*. Cependant, aucune protéine équivalente n'existe à ce jour chez les autres eucaryotes. dSR-C1 est exprimée sur les hémocytes et les macrophages durant le développement embryonnaire de l'insecte (Pearson 1995). dSR-C1 est une protéine membranaire de type 1 (extrémité N-Terminale extracellulaire, une région transmembranaire unique et une extrémité C-Terminale cytoplasmique).

IV.2.a.iv. Classe D

La classe D comprend les récepteurs CD68 (macrosialine pour l'orthologue murin) et les protéines Lamp (Lysosomal membrane glycoprotein) -1, -2 et -3. CD68 et les protéines Lamp sont des glycoprotéines membranaires de Type 1 et sont associées aux endosomes et aux lysosomes, avec une extrémité N-Terminale extracellulaire et une extrémité C-Terminale intracellulaire. Ces protéines sont fortement N- et O-glycosylées au niveau du domaine mucin-like situé dans la partie extracellulaire. CD68 est exprimé sur les macrophages, les

cellules de Langerhans, les DC et les ostéoclastes (Jiang 1998) alors que Lamp-1 et -2 sont plus largement exprimés. L'expression de Lamp-3 est augmentée durant la maturation des DC, supposant que cette protéine pourrait avoir une fonction dans le système immunitaire (de Saint-Vis 1998). Enfin, CD68 est majoritairement exprimé au niveau des endosomes tardifs, avec 10-15% des protéines exprimées à la surface mais pouvant être rapidement internalisées (Kurushima 2000).

IV.2.a.v. Classe E

La classe E des récepteurs scavenger n'est constituée que d'une seule protéine : LOX-1 (Lectin-like Oxidized LDL receptor-1). A l'origine, LOX-1 fut identifié comme étant un récepteur scavenger spécifique des cellules endothéliales. Cependant, il a par la suite été détecté sur les macrophages, les cellules musculaires lisses et sur les plaquettes (Chen 2002a). LOX-1 est une glycoprotéine membranaire de type 2 (extrémité C-Terminale extracellulaire, simple région transmembranaire et courte extrémité N-Terminale intracellulaire) dont le domaine extracellulaire de type lectine contient 6 résidus de cystéine hautement conservés formant 3 ponts disulfures qui permettent de maintenir la structure tridimensionnelle de la protéine. Chez l'homme, LOX-1 peut exister sous forme de dimères ou de multimères liés de façon covalente (Xie 2004). Le domaine de type lectine permet la liaison du ligand. La N-glycosylation de ce domaine est nécessaire à la fois pour le transport du récepteur à la surface de la cellule mais aussi à l'obtention d'une liaison de haute affinité avec son ligand, en particulier les LDL oxydés (Kataoka 2000).

IV.2.a.vi. Classe F

La classe F comprend les récepteurs scavenger SREC (Scavenger Receptors expressed on the Endothelial Cells) -1 et -2. Chez l'homme, ces protéines sont exprimées sur les cellules endothéliales et les macrophages ; elles sont également retrouvées chez *Caenorhabditis elegans*. L'épissage alternatif de SREC-1 donne 5 isoformes différentes, membranaires et solubles (Adachi 2002a). SREC-1 et -2 sont des protéines membranaires de type 1. SREC-1 comporte un domaine N-Terminal extracellulaire contenant 10 répétitions riches en cystéines dont 5 forment des domaines EGF-like. Ces domaines EGF-like sont impliqués dans les interactions protéine-protéine et peuvent également permettre l'oligomérisation de ces récepteurs, ainsi que l'hétérodimérisation de SREC-1 et -2 (Ishii 2002). SREC-1 et -2

diffèrent au niveau de leur partie cytoplasmique. SREC-1 possède une région riche en sérines/prolines suivie d'une région riche en glycine alors que la partie cytoplasmique de SREC-2 est riche en sérines, prolines, et en résidus chargés positivement. Cependant, il faut noter que seul SREC-1 est fonctionnel.

IV.2.a.vii. Classe G

La classe G des récepteurs scavenger est composée de la chimiokine SR-PSOX/CXCL16 (Scavenger Receptor that binds Phosphatidylserine and Oxidized Lipoprotein). SR-PSOX/CXCL16 est exprimé sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages (Shimaoka 2000). SR-PSOX/CXCL16 est une protéine membranaire de type 1 et son domaine extracellulaire contient une région de type chimiokine adjacente à une région glycosylée de type mucine. Sa région extracellulaire peut être clivée et produit ainsi un fragment soluble (Abel 2004; Shimaoka 2000; Shimaoka 2003). Ce fragment soluble a une activité chimiotactique pour les lymphocytes T ainsi que pour les cellules NKT, deux types cellulaires exprimant le récepteur de CXCL16, le CXCR6 (Hase 2006; Johnston 2003).

IV.2.a.viii. Classe H

La classe H des récepteurs scavenger est composée des protéines FEEL (Fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor) -1 et -2 (Adachi 2002b). FEEL-1 fut indépendamment identifiée en tant que Stabilin-1 (Politz 2002) ou encore CLEVER-1 (Common Lymphatic Endothelial and Vascular Endothelial Receptor-1) (Irjala 2003) et FEEL-2 correspond à la Stabilin-2 (Politz 2002) FEEL-1 et -2 sont de grosses protéines membranaires de type 1 de 2570 et 2551 acides aminés respectivement. Le domaine N-Terminal extracellulaire de FEEL-1 est composé de 7 domaines Fasciclin, 16 domaines de type EGF, 2 domaines laminin-type EGF-like, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine C-Terminal cytoplasmique contenant le motif NPVF nécessaire à l'endocytose. FEEL-2 possède une structure similaire à FEEL-1, mais diffère par le nombre de domaines de type EGF qui est de 15, et par son domaine C-Terminal cytoplasmique qui contient le motif NPLY nécessaire lui aussi à l'endocytose (Adachi 2002b). Ces 2 récepteurs sont fortement exprimés dans le foie et les ganglions lymphatiques. FEEL-1 est exprimé dans les monocytes/macrophages ainsi que dans les cellules endothéliales alors que l'expression de

FEEL-2 dans ces types cellulaires est à peine détectable (Adachi 2002b). FEEL-1 et -2 ont des localisations différentes au niveau de la cellule. En effet, FEEL-1 est localisé au niveau des endosomes précoces, des endosomes recyclés et au niveau du réseau *trans*-golgien (Kzhyshkowska 2004; Prevo 2004). On retrouve également FEEL-2 au niveau des endosomes précoces et au niveau de la membrane plasmique, mais à une concentration plus importante que FEEL-1 au niveau de cette dernière.

IV.2.b. Les ligands

A l'origine, les récepteurs scavenger se sont vus attribuer la tâche de lier et d'internaliser le cholestérol (LDL, HDL et VLDL) modifié. Des études ont ensuite montré qu'ils pouvaient également lier des protéines endogènes telles que le collagène ou la fibronectine, mais également d'autres molécules modifiées telles que les phosphatidylsérines que l'on ne trouve qu'à la surface des cellules apoptotiques. Enfin, les récepteurs scavenger jouent un rôle dans la réponse immunitaire en liant des ligands d'origine bactérienne, virale, parasitaire ou encore fongique. La figure 31 résume les différents ligands de récepteurs scavenger.

SR	Host derived ligands		Microbe/pathogen derived ligands			
	Endogenous ligands	Modified host molecules	Bacterial	Viral	Parasitic	Fungal
SR-AI/A2	-Undefined serum proteins -Activated B Cells	- β -Amyloid protein -Apoptotic cells -AGE-modified proteins -Ox-LDL, Ac-LDL	-LPS -LTA -G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	Plasmodium berghei(?)	β -glucan(?)
MARCO	-Splenic B Cells -UGRP-1 in lung Clara cells	-Ox-LDL, Ac-LDL (?)	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	ND
SRCL	T and Tn antigen	-Ox-LDL	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	Yeast
SR-B1	ND	-Apoptotic cells -AGE-modified proteins -Ox-LDL	ND	ND	ND	ND
CLA-1/human SR-B1	ND	-Apoptotic cells -Ox-LDL	LPS	-Hepatitis C Virus E2 glycoprotein	ND	ND
CD36	-Thrombospondin -Collagen	-AGE -Apoptotic cells -Ox-LDL	ND	ND	PfEMP protein on plasmodium infected RBC	ND
dSR-C1	ND	Ac-LDL	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	β -glucan
CD68	ND	-Ox-LDL (?)	ND	ND	ND	ND
Lamp-1/2/3	ND	-Ox-LDL (?)	ND	ND	ND	ND
LOX-1	Fibronectin	-AGE -Apoptotic cells -Ox-LDL	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	ND
SREC	Advallin	-Ox-LDL -Ac-LDL -Polymosinic acid	ND	ND	ND	ND
SR-PSOX/CXCL16	Chemokine receptor CXCR6	-Phosphatidyl serine -Apoptotic cells -Ox-LDL	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	ND
FEEL-1/2	ND	-AGE -Ac-LDL	-G ⁻ and G ⁺ bacteria	ND	ND	ND

Figure 31 : Les Ligands des récepteurs scavenger. Modifié d'après Mukhopadhyay (Mukhopadhyay 2004; Murphy 2005).

IV.2.c. Trafic intracellulaire et signalisation

Les travaux étudiant la signalisation intracellulaire des récepteurs scavenger ont essentiellement analysé les événements qui suivent la liaison des récepteurs scavenger avec des ligands lipidiques endogènes. Peu d'études concernent la signalisation qui suit la liaison des récepteurs scavenger avec des motifs dérivés de pathogènes.

Néanmoins, quelques-unes existent, dont une très récente de Leppert *et al* qui montre que la protéine VSG (Variant Surface Glycoprotein) des Trypanosomes africains se lie à la

surface des macrophages murins RAW 264.7, entraînant l'activation de la voie NF- κ B indépendamment d'une activation des TLR. La liaison de VSG à la membrane est saturable, dépend des récepteurs scavenger et la protéine VSG est internalisée, étape nécessaire à l'activation de NF- κ B, de façon indépendante des vésicules de Clathrine, et est redirigée vers le compartiment endosomal (Leppert 2007).

IV.2.c.i. Classe A

Lorsque les trimères de récepteurs SR-A se lient aux OxLDL au niveau de la surface cellulaire, les complexes récepteurs/ligands se concentrent au niveau de puits de clathrine puis de vésicules de clathrine qui vont ensuite fusionner avec les endosomes. Le pH acide des endosomes va permettre la dissociation des complexes ligands/récepteurs. Les trimères de récepteurs SR-A1 et 2 sont ensuite recyclés à la membrane plasmique via le réseau *trans*-Golgien (Mori 1994). La liaison du ligand va activer différentes voies de signalisation. La liaison de SR-A à son ligand induit la phosphorylation de la phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) et de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) au niveau d'une tyrosine. SR-A active également la voie de la PKC, des protéines hétérotrimériques G_(i/o), des mitogen-activated protein kinases (MAPK), des caspases et induit la sécrétion de cytokines (Chao 2001; Collier 2001; Hsu 2001; Hsu 1998; Whitman 2000).

Un travail sur des souris SR-A déficientes a montré que les voies de signalisation induites par la fucoïdine et l'acide lipoteichoïque dans les macrophages étaient encore induites dans les macrophages des souris déficientes, et que cette voie de signalisation était probablement induite via le CD14 (Kim 2003).

Concernant l'implication des SR-A dans l'immunité innée, une étude a montré que ces protéines étaient impliquées dans la phagocytose des bactéries à Gram positif et négatif, ainsi que dans la clairance de l'endotoxine (Hampton 1991; Peiser 2000; Thomas 2000). Par ailleurs, une étude réalisée sur la lignée de macrophages RAW 264.7 a montré que la production de TNF- α induite par l'activation des récepteurs SR-A par le LTA et le poly I:C nécessitait une synthèse protéique de novo, l'internalisation des ligands dans des vésicules de clathrine, la polymérisation de l'actine, la phosphorylation de tyrosines et la mobilisation de la voie de signalisation des MAPK (Collier 2001).

Enfin, les protéines SR-A sont impliquées dans la régulation de l'adhésion cellulaire, directement ou indirectement par liaison des protéoglycanes de la matrice extracellulaire (Santiago-Garcia 2003).

MARCO est fortement exprimé sur les macrophages de la rate et des ganglions lymphatiques, et reconnaît les bactéries (Kraal 2000), ce qui l'implique dans la défense de l'hôte. Par ailleurs, MARCO est également exprimé par les macrophages pulmonaires où il est impliqué dans les réponses immunitaires contre les particules inhalées et les pathogènes environnementaux (Arredouani 2004). Enfin, MARCO semble agir comme un détecteur à la surface des cellules, puisqu'il peut moduler la dynamique non seulement du cytosquelette d'actine durant la maturation des DC (Granucci 2003) mais aussi de la membrane plasmique des macrophages durant la capture des pathogènes (Pikkarainen 1999).

Enfin, concernant SRCL, son domaine cytoplasmique contient un signal potentiel d'internalisation suggérant que les complexes récepteur/ligand pourraient être internalisés et pris en charge par le système endosome/lysosome (Nakamura 2001).

IV.2.c.ii. Classe B

Contrairement aux récepteurs appartenant à la classe A, le CD36 est associé aux radeaux lipidiques. La liaison avec les OxLDL entraîne l'internalisation du complexe récepteur/ligand par une voie dépendante des radeaux lipidiques mais indépendante de la Clathrine et de la Cavéoline dans des cellules CHO transfectées par CD36 (Zeng 2003).

SR-B1 est également associé aux radeaux lipidiques. Il permet l'internalisation des esters de cholestérol à partir des lipoprotéines par une voie indépendante de la cavéoline (Peng 2004). Une étude sur des cellules hépatiques a montré que la capture du cholestérol à partir des LDL était favorisée au niveau des radeaux riches en cholestérol non oxydé, alors que la capture du cholestérol à partir des HDL était elle au contraire favorisée au niveau des radeaux riches en cholestérol oxydé. Cette étude permet d'en conclure que l'oxydation des lipides composant les radeaux favorise l'oligomérisation de SR-B1, la liaison et l'internalisation des HDL. Enfin, la capture du cholestérol à partir des LDL et des HDL induit l'internalisation du complexe ligand/récepteur puis le recyclage du récepteur (Rhainds 2004). Enfin, une étude a montré que SR-B1 liait le LPS bactérien et qu'il le transportait vers le Golgi (Vishnyakova 2003).

Concernant SR-B2, une étude l'a localisé au niveau de cavéoles (Webb 1998). Par ailleurs, un motif au niveau de sa séquence cytoplasmique semble induire sa faible localisation à la surface de la cellule. Enfin, contrairement à la capture du cholestérol par SR-B1 où les HDL restent en surface, SR-B2 induit l'internalisation et l'accumulation des HDL dans les endosomes (Eckhardt 2004).

Concernant les différentes voies de signalisation impliquées, des études ont montré que la liaison de CD36 à l'apolipoprotéine fibrillaire C-2 activait la voie de Lyn, Fyn et/ou p44/42 MAP kinases, conduisant à l'augmentation de la production de TNF- α , alors que la liaison avec la protéine β -amyloïde entraînait la production d'espèces réactives de l'oxygène et la production de MCP-1 (Medeiros 2004; Moore 2002). La protéine SR-B1 quant à elle interagit par son extrémité cytoplasmique avec CLAMP, une protéine munie de domaines PDZ, permettant la régulation du transfert du cholestérol et du trafic du complexe ligand/récepteur (Ikemoto 2000). Par ailleurs, l'activation de SR-B1 stimule l'activité de l'enzyme eNOS et ainsi la production d'oxyde nitrique par une voie de signalisation impliquant c-Src et la PI-3-kinase, Akt et les MAP kinases (Mineo 2003). Enfin, peu de choses sont connues concernant la signalisation par SR-B2, mais une étude a montré que son domaine cytoplasmique C-Terminal contenait des motifs qui peuvent potentiellement être phosphorylés, et qui pourraient permettre le recrutement de la PLC γ 1 (Mulcahy 2004).

IV.2.c.iii. Classe E

La liaison de LOX-1 avec les OxLDL induit une augmentation de son ARNm et de sa protéine, mais également l'activation de NF- κ B, la production d'espèces réactives de l'oxygène, et permet l'ouverture du canal à potassium activé par le calcium au niveau des cellules endothéliales (Cominacini 2000; Kuhlmann 2003; Nishimura 2004). La liaison des OxHDL à LOX-1 peut également activer NF- κ B dans les cellules endothéliales (Matsunaga 2003). L'activation de LOX-1 peut conduire à l'augmentation de l'expression de l'ACE (angiotensin-converting enzyme), de la chimiokine MCP-1, et ce par une voie dépendante des MAP kinases (Li 2000a; Li 2003c). La mobilisation de LOX-1 peut également activer la voie de la PKC- α (Li 2003a) ou de la PKC- β (Li 2003b) entraînant dans le premier cas l'augmentation de l'expression de CD40, de son ligand CD40 ligand et leur voie de signalisation conduisant à l'expression de cytokines et chimiokines proinflammatoires, et dans le deuxième cas une augmentation de l'activité des métalloprotéases matricielles. Enfin, l'activation de LOX-1 déclenche la mort des cellules par apoptose (Li 2000b) en induisant une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (Kataoka 2001), une diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique c-IAP, une augmentation de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme par la mitochondrie et l'activation des caspases-3 et -9 (Chen 2004). En induisant ainsi la mort cellulaire, LOX-1 joue un rôle important dans la formation des plaques et lésions athérosclérotiques.

IV.2.c.iv. Classe G

SR-PSOX/CXCL16 peut lier les OxLDL et induire leur internalisation ainsi que leur dégradation (Shimaoka 2000). Au niveau des cellules musculaires lisses, SR-PSOX/CXCL16 peut induire différentes réponses parmi lesquelles l'activation de NF- κ B via les protéines G hétérotrimériques, la PI-3-kinase, c-Akt et IKK, induisant ainsi la prolifération des cellules musculaires lisses (Chandrasekar 2004). Une étude a montré que SR-PSOX/CXCL16 pouvait contribuer au recrutement de lymphocytes T CD8⁺ au niveau des valves cardiaques dans le contexte d'une maladie inflammatoire des valves cardiaques (Yamauchi 2004).

IV.2.d. Expression dans les DC

IV.2.d.i. Chez l'homme

CD36 est exprimé sur les DC et joue un rôle protecteur dans la pathologie de la malaria ; en effet, les souris CD36^{-/-} reconstituées avec des cellules hématopoïétiques de souris sauvages ne développent pas les symptômes encéphaliques et survivent plus longtemps. Ce rôle protecteur de CD36 n'est effectif que lorsque le CD36 n'est exprimé que sur les cellules hématopoïétiques, et est masqué chez les souris sauvages exprimant le CD36 à la fois dans les cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques (Cunha-Rodrigues 2007). Une autre étude concernant le CD36 a montré son rôle dans la régulation des fonctions de la DC, et notamment dans le maintien de la tolérance périphérique. Urban *et al* ont montré que l'exposition des DC à des anticorps anti-CD36 ou encore à des cellules apoptotiques inhibait la maturation des DC ainsi que la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse au LPS. En revanche, les DC sécrètent plus d'IL-10. Les auteurs suggèrent donc que les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* et les cellules apoptotiques engagent des voies de signalisation similaires permettant de réguler les fonctions de la DC, induisant préférentiellement une tolérance périphérique (Urban 2001). Enfin, une étude a montré que cette tolérance induite par le CD36 était permise grâce à sa régulation négative par le facteur de transcription RUNX3 qui empêche l'expression du gène CD36 (Puig-Kroger 2006).

Une étude a montré que SR-PSOX/CXCL16 était exprimé par les DC myéloïdes : le niveau d'expression est moindre dans les DC immatures, et augmente avec la maturation des DC. En revanche, les DC plasmacytoïdes ne l'expriment qu'à un faible niveau. Par ailleurs, ces cellules produisent la forme soluble de CXCL16, à un niveau soutenu par les DC

myéloïdes, suggérant un rôle dans le recrutement et la stimulation des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes (Tabata 2005). Le CXCL16 participe à l'activation des pDC par le TLR9 en transportant ce ligand vers le TLR (Gursel 2006).

Une étude menée par Pfistershammer *et al* a montré l'expression de SREC-1, SR-A1 et CLA-1 à la surface des DC. Les auteurs ont montré que la protéine THP (Tamm-Horsfall Protein), présente exclusivement dans le rein et l'urine et jouant un rôle important dans l'immunité anti-bactérienne au niveau du tractus urogénital, se liait à ces 3 récepteurs scavenger et pas au TLR4, et induisait une maturation des DC dépendante du TLR4 (Pfistershammer 2008).

Une étude de Delneste *et al* montre que LOX-1 est exprimé par les DC, qu'il est capable de lier les protéines HSP et de médier une présentation croisée de l'antigène, à savoir la présentation d'un antigène endogène par le CMH de classe I reconnu par les lymphocytes T CD8⁺ (Delneste 2002).

IV.2.d.ii. Chez la souris

Une étude réalisée par Palliser *et al* sur des DC dérivées de la moëlle osseuse a montré que la protéine de fusion Hsfp (composée de la protéine mycobactérienne hsp65 prolongée à sa partie C-Terminale d'un polypeptide) était présentée via le CMH de classe 1 par la DC aux lymphocytes T CD8⁺, et non pas via le CMH de classe 2 aux lymphocytes T CD4⁺, et ce, grâce à l'internalisation de la protéine de fusion par un récepteur scavenger. La liaison de Hsfp à la surface de la DC est inhibée par l'ajout de polymères polyanioniques, ligands de récepteurs scavenger. Les auteurs démontrent donc que la redirection de ligands exogènes vers les récepteurs scavenger permet leur présentation croisée via le CMH de classe 1 vers les lymphocytes T CD8⁺ (Palliser 2005).

L'équipe de Becker *et al* s'est attachée à analyser la distribution de SR-A sur les différentes sous-populations de DC murines. Ainsi, SR-A est exprimé à la surface des DC issues de la moëlle osseuse (BMDC) cultivées en présence de GM-CSF, exprimant le CD11c, le CD11b et DEC-205. En revanche, les BMDC cultivées en présence de Flt3L (DC plasmacytoïdes) n'expriment pas SR-A. Les auteurs se sont ensuite attachés à étudier la distribution de SR-A dans les DC spléniques où ils montrent que le SR-A est exprimé sur les DC CD11c⁺ CD11b⁺ CD4⁻ CD8 α ⁻. Ils montrent enfin que les cellules déficientes en SR-A expriment de façon plus importante que les cellules sauvages (wild type) les molécules de costimulation ainsi que les cytokines pro-inflammatoires en présence de LPS, suggérant ainsi

que les récepteurs scavenger, et notamment SR-A, limitent la maturation des DC, et pourraient jouer un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique (Becker 2006).

Dans le même ordre d'idées, Wang *et al* ont montré que SR-A régulait négativement la réponse immunitaire anti-tumorale spécifique d'un antigène. En effet, des souris déficientes pour SR-A développent une réponse immunitaire anti-tumorale plus efficace que les souris sauvages après provocation avec un antigène tumoral. Par ailleurs, les auteurs montrent que les DC issues des souris déficientes pour SR-A sont plus sensibles aux stimuli inflammatoires et présentent les antigènes plus efficacement que les DC issues des souris sauvages. Cette étude suggère donc que SR-A régule négativement l'immunité anti-tumorale spécifique d'un antigène (Wang 2007).

Une étude réalisée chez la souris a montré que les récepteurs scavenger SR-A1/2 participaient à la phagocytose des bactéries à Gram négatif par les DC. L'expression de SR-A1/2 est régulée positivement durant la différenciation des précurseurs issus de la moëlle osseuse, et est corrélée à l'acquisition de l'expression du CD11c. Le défaut de phagocytose observé dans les BMDC SR-A^{-/-} est non seulement dû à une diminution du nombre de cellules phagocytant mais également à une diminution du nombre de bactéries capturées par les cellules encore capables de phagocyter. SR-A1/2 n'est pas associé aux radeaux lipidiques à l'état basal. Cependant, sa présence au sein des radeaux lipidiques est indispensable à la phagocytose (Amiel 2007).

Plusieurs études impliquent le CD36 dans le processus de présentation croisée de l'antigène, et notamment d'antigènes présents à la surface des cellules apoptotiques. Cependant, un travail récent réalisé par Belz *et al* a montré que bien que CD36 soit fortement exprimé à la surface des DC spléniques CD8⁺, il n'est pas indispensable lors du processus de présentation croisée *in vivo*. En effet, des DC spléniques CD8⁺ issues de souris invalidées pour CD36 présentent la même capacité que les DC sauvages (wild type) à présenter des antigènes exogènes et endogènes de façon croisée (Belz 2002).

IV.2.e. Expression dans les cellules épithéliales bronchiques

Peu d'études décrivent l'expression des récepteurs scavenger dans les cellules épithéliales bronchiques.

Le travail de Darren *et al* sur la lignée cellulaire A549 démontre l'expression du CD36 par ces cellules et son implication (avec d'autres récepteurs) dans la reconnaissance et la phagocytose des éosinophiles apoptotiques (Sexton 2001).

Une autre étude concerne l'expression du CD36 dans les cellules épithéliales bronchiques. Mayer *et al* montrent que les cellules épithéliales bronchiques expriment différents récepteurs de l'immunité innée, entre autre les TLR2, -1 et -6 et le CD36. Cependant, ils montrent que le TLR2 et le CD36 sont exprimés à un faible niveau, entraînant une faible réponse aux bactéries à Gram positif, suggérant ainsi que les cellules épithéliales bronchiques régulent leur sensibilité vis-à-vis des pathogènes en régulant le niveau d'expression de leurs récepteurs (Mayer 2007).

Une dernière étude concerne l'effet de l'alcool et de la cigarette sur le processus de réparation de l'épithélium. L'alcool et la cigarette induisent la production de composés tels que le malondialdéhyde et l'acétaldéhyde qui ont la capacité d'activer la PKC (Protéine-Kinase C). Wyatt *et al* montrent que la BSA (Bovine SerumAlbumine) couplée au malondialdéhyde et à l'acétaldéhyde (BSA-MAA) ralentit le processus de réparation de l'épithélium bronchique. Ce ralentissement de la réparation est dû à l'activation de la PKC, qui est la conséquence de la liaison de la BSA-MAA sur un ou des récepteurs scavenger. Les auteurs ont au préalable montré l'expression des récepteurs scavenger CD36, SRA, SR-B1/2 dans les cellules épithéliales bronchiques humaines BEAS-2B et les cellules épithéliales bronchiques bovines primaires (Wyatt 2005).

IV.3. Collaboration entre PRR

Etant donné que les pathogènes comportent plusieurs motifs de reconnaissance reconnus par plusieurs PRR, la réponse immune qui va s'ensuivre sera la somme de chaque stimulation. Les PRR doivent donc interagir entre eux. Il existe ainsi des collaborations entre les TLR, mais également entre les TLR et d'autres PRR, afin d'obtenir idéalement une réponse immunitaire adaptée.

IV.3.a. Interactions TLR/TLR

Plusieurs études démontrent la collaboration entre différents TLR, et montrent que selon la combinaison de ceux-ci, on observe une certaine synergie entre les TLR impliqués, ou au contraire une désensibilisation.

Une première étude réalisée sur la lignée murine de macrophages RAW 264.7 a montré que la stimulation simultanée de ces macrophages par un ligand de TLR2 et un ligand de TLR4 potentialisait de façon dose-dépendante la production de TNF- α par rapport à la

stimulation par un seul ligand de TLR (Beutler 2001). Une autre étude réalisée cette fois sur des DC humaines et murines montre une synergie des TLR dans la polarisation Th-1. Dans les DC humaines, les agonistes de TLR3 et 4 agissent en synergie avec l'agoniste de TLR8 en induisant une production de cytokines de type Th-1 beaucoup plus importante que celle induite par un seul de ces ligands, et maintenue dans le temps. En outre, cette potentialisation de la réponse Th-1 dépend d'une « fenêtre-horaire », c'est-à-dire que la potentialisation n'est effective que si les stimuli sont espacés au maximum de 4 heures. Les auteurs concluent que la synergie d'action de ces TLR pourrait représenter une sorte de combinaison de sécurité (deux produits microbiens dans différents compartiments cellulaires) qui permettrait la génération d'effecteurs puissants uniquement en réponse à certains pathogènes (Napolitani 2005). Deux études réalisées par Bafica *et al* montrent ensuite une collaboration entre les TLR2 et 9 lors des infections par *Trypanosoma cruzi* et *Mycobacterium tuberculosis* chez la souris. L'auteur montre que des souris déficientes pour les deux TLR présentent une production d'IL-12 et d'IFN- γ très réduite lors de ces deux infections comparativement aux souris sauvages et déficientes pour un seul TLR, une survie réduite et également une augmentation de la parasitémie lors de l'infection des souris avec de fortes doses de *Mycobacterium tuberculosis* (Bafica 2006; Bafica 2005). Le travail réalisé par Weiss *et al* chez la souris dans le cadre de l'infection par *Salmonella typhimurium* montre une collaboration séquentielle entre les TLR4 et 2. En effet, le TLR4 contribue à la production précoce de cytokines et à l'élimination des bactéries par les macrophages, alors que le TLR2 intervient plus tardivement dans les réponses des macrophages. Le TLR4 est en effet une sorte de sentinelle exprimé constitutivement à la surface des macrophages résidents et permettant une signalisation immédiate en réponse à une infection bactérienne (TNF- α) ou virale (IFN- β). Plus tard dans l'infection, le TLR4 est régulé négativement dans les macrophages alors que le TLR2 est lui régulé positivement, induisant un autre type de réponse par les macrophages (Weiss 2004). Un dernier travail réalisé chez la souris montre une collaboration entre les TLR9 et 3 dans la défense contre le Cytomegalovirus murin. Les auteurs montrent que lors d'une infection par le Cytomegalovirus murin, le TLR9 et la voie MyD88 ainsi que le TLR3 et la voie TRIF contribuent tous les deux à la défense contre cette infection virale systémique, mais qu'aucun des deux ne peut enrayer seul cette infection. Les deux TLR doivent agir en synergie afin d'enrayer l'infection par le Cytomegalovirus murin (Tabeta 2004).

La collaboration entre différents TLR peut au contraire réduire la réponse immunitaire. Re *et al* montrent que la stimulation concomitante par le TLR2 et les TLR3 ou 4 bloque la

production de cytokines de type Th-1 induite par les TLR3 et 4. Cette inhibition de la production de cytokines de type Th-1 semble être due à la production d'IL-10 induite par le TLR2 qui agit de façon autocrine, puisque l'utilisation d'anticorps anti-IL-10 élimine les effets du TLR2 (Re 2004). Une dernière étude montre qu'en fonction du timing de stimulation, la réponse aux ligands de TLR2 et 4 sera différente. Le traitement simultané de macrophages murins avec des agonistes de TLR2 et 4 a une action synergique sur la production de TNF- α , alors que si les cellules sont prétraitées avec l'agoniste du TLR2, l'action de l'agoniste du TLR4 est abolie. Le prétraitement avec l'agoniste du TLR2 induit une tolérance vis-à-vis de l'agoniste du TLR4 qui n'est pas associée à la diminution en surface du complexe TLR4-MD2 mais qui serait la conséquence de modifications dans la signalisation du TLR4 (Sato 2000).

Enfin, le travail de Vanhoutte *et al* montre que la collaboration entre deux TLR, en l'occurrence les TLR2 et 3 peut se traduire soit par une synergie entre les deux récepteurs, soit au contraire par une inhibition croisée. Les auteurs montrent en effet que les TLR2 et 3 agissent en synergie et de façon dose-dépendante pour induire la production de TNF- α , d'IL-6 et des membres de la famille de l'IL-12 (IL-12p40, IL-12p23 et IL-27p28) par les DC myéloïdes murines. On observe également une action synergique de ces deux récepteurs dans la production d'IFN- γ par les lymphocytes T et les cellules NK (Natural Killer) médiée par les DC. En revanche, le TLR2 inhibe l'expression des ISG (Interferon Stimulated Genes) de type I (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, GARG39) et de l'IL-12p35 induite par le TLR3 (Vanhoutte 2008).

IV.3.b. Interactions TLR/récepteurs scavenger

De la même manière qu'il existe une collaboration entre les TLR permettant une réponse immunitaire adaptée, il existe dans certaines situations une collaboration entre les TLR et les récepteurs scavenger. Ainsi, plusieurs travaux suggèrent l'implication des récepteurs scavenger comme co-récepteurs dans la reconnaissance ou le transport de ligands de TLR.

Une première étude réalisée sur la lignée murine de macrophages RAW 264.7 a montré que la stimulation simultanée de ces macrophages par un ligand de TLR2 et un ligand de TLR4 induisait une augmentation de l'expression de SR-A, ce qui a pour conséquence la liaison et l'internalisation du LPS (Xu 2007).

Un travail réalisé par Stuart *et al* a montré que le CD36 permettait la liaison et l'internalisation de bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* ainsi qu'un de ses composants, l'acide lipoteichoïque. L'internalisation de cette bactérie et de son composant sont permis par la portion cytoplasmique de CD36, qui active également la signalisation par le complexe TLR2/TLR6 (Stuart 2005). Enfin, Triantafilou *et al* ont montré que lors de l'exposition aux ligands de TLR2 (LTA) et aux lipoprotéines diacylées, le CD36, localisé au niveau des radeaux lipidiques contrairement aux hétérodimères TLR2/TLR6, se liait à ces ligands et permettait le recrutement des hétérodimères TLR2/TLR6 au sein des radeaux lipidiques. Ce recrutement a pour conséquence l'internalisation des ligands et la signalisation des TLR. Tout le complexe Ligand/TLR2/TLR6/CD36 est alors internalisé et redirigé vers le Golgi (Triantafilou 2006).

L'étude réalisée par Jeannin *et al* montre la collaboration entre les récepteurs scavenger LOX-1 et SREC-1 et le TLR2 dans la reconnaissance de KpOmpA, protéine de la membrane externe de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*. KpOmpA se lie spécifiquement aux récepteurs scavenger LOX-1 et SREC-1, puisque cette liaison est inhibée par des ligands naturels des récepteurs scavenger (BSA maléylée, OxLDL ou fucoïdine). Par ailleurs, les auteurs montrent que LOX-1 et le TLR2 sont colocalisés en présence de KpOmpA, et que la présence des deux récepteurs est requise à l'élaboration de la réponse immunitaire (Jeannin 2005).

Enfin, une étude réalisée sur des cellules mononucléées de sang périphérique humaines montre que le CXCL16 influence la réponse induite par les motifs CpG, ligands de TLR9. Les auteurs montrent que le CXCL16, exprimé à la surface des pDC, contribue à la liaison, la capture et l'activité des motifs CpG ODN de type D. Ces agonistes de TLR9 s'accumulent alors dans les endosomes précoces. Il faut noter que le dextran sulfate et la fucoïdine inhibent l'activation des pDC par les motifs CpG ODN de type D, que des anticorps anti-CXCL16 empêchent la liaison et l'activation des pDC par les motifs CpG ODN de type D, et qu'enfin, seule la transfection simultanée de cellules n'exprimant pas le CXCL16 et le TLR9 par CXCL16 et TLR9 permet leur activation par les motifs CpG ODN de type D. Cette étude suggère donc que le CXCL16 permet l'internalisation des CpG ODN de type D et leur redirection vers les compartiments renfermant le TLR9 qui induira à son tour une signalisation et une réponse immunitaire adéquate (Gursel 2006).

But du travail de thèse

L'appareil respiratoire est la cible privilégiée des polluants atmosphériques qu'ils soient gazeux ou particuliers. Des études épidémiologiques ont montré un lien entre le niveau de ces polluants et la recrudescence de maladies respiratoires, en particulier des allergies et de l'asthme persistant. En effet, un accroissement de la morbidité et de l'incidence des maladies allergiques sont associés aux pics de pollution.

L'implication des cellules épithéliales bronchiques (CEB) dans le recrutement des précurseurs de cellules dendritiques (DC) ainsi que la localisation des DC au sein même de l'épithélium démontrent l'existence d'interactions entre ces 2 types cellulaires. Des travaux réalisés au niveau de la muqueuse intestinale ainsi qu'au niveau de la muqueuse des voies aériennes ont montré que ces interactions faisaient intervenir des protéines d'adhérence, notamment les protéines de jonctions serrées comme ZO-1, l'Occludine, ou encore les Claudines. Par ailleurs, la capture des antigènes par les cellules dendritiques à la surface de l'épithélium laisse supposer une délocalisation/relocalisation voire une augmentation de l'expression de récepteurs tels que les Toll-like receptors (TLR) ou les Scavenger Receptors (SR), récepteurs de l'immunité innée, au niveau des dendrites.

L'objectif de mon travail était de définir l'influence des ligands de TLR2, -3 et -4 et leur modulation par l'exposition à des particules de diesel sur les interactions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques et leurs conséquences fonctionnelles sur les cellules dendritiques.

Nous nous sommes particulièrement focalisés sur la régulation de l'expression des protéines de jonctions intercellulaires, protéines jouant un rôle important dans les interactions entre ces deux types cellulaires, par les ligands de TLR2, 3 et 4 au niveau de la cellule dendritique ainsi qu'aux conséquences fonctionnelles de l'établissement de telles jonctions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques. Nous nous sommes ensuite attachés à comprendre l'implication des SR lors de l'interaction des cellules dendritiques avec les particules de diesel, en étudiant la régulation de l'expression des SR, leur rôle dans la capture et la modulation de l'effet des particules de diesel par les ligands de SR.

Deuxième partie : Travaux de recherche

Article I

Interactions entre les Cellules Epithéliales Bronchiques et les cellules Dendritiques après exposition à kpOmpA, un PAMP dérivé de *Klebsiella pneumoniae*.

Muriel Pichavant, Solenne Taront, Pascale Jeannin, Laëtitia Breuilh, Anne-Sophie Charbonnier, Corentin Spriet, Catherine Fourneau, Nathalie Corvaia, Laurent Héliot, Anne Brichet, André-Bernard Tonnel, Yves Delneste et Philippe Gosset *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 5912-19

Lors de l'exposition à *Klebsiella pneumoniae*, nous avons montré que le développement de la réponse immunitaire innée implique vraisemblablement l'activation des CEB par kpOmpA. De plus, cette protéine présente un réel potentiel en tant qu'agent vaccinal, notamment par administration au niveau des voies aériennes. Comme le système immunitaire muqueux repose sur un réseau de surveillance établi par les DC, localisées au sein de l'épithélium bronchique, notre but était de définir le rôle de l'activation des CEB exposées à kpOmpA dans le recrutement de DC et dans l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative.

Pour cela, nous avons étudié :

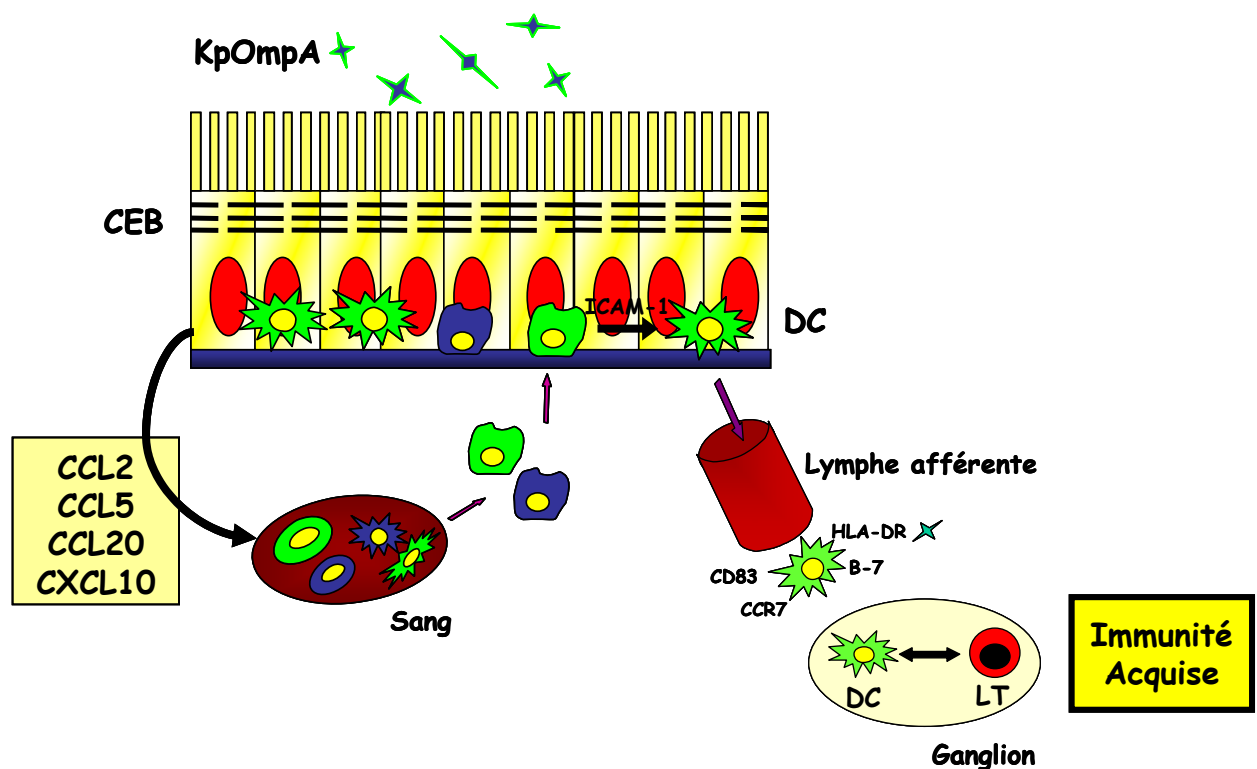
- la production de chimiokines potentiellement actives sur les DC par les CEB,
- la migration des MDDC et des LC en réponses aux surnageants des CEB, ou dans un modèle *in vitro* de reconstitution d'un épithélium polarisé,
- le devenir des DC recrutées par les CEB,
- *in vivo* le recrutement de DC après injection intranasale de kpOmpA à des souris BALB/c.

CONCLUSION DE L'ETUDE :

Au cours de cette étude, nous avons démontré que :

- kpOmpA induit la sécrétion de CCL2, CCL5, CCL20 et CXCL10 par les CEB, qui est responsable du recrutement de précurseurs de MDDC et de LC,
- les précurseurs de MDDC migrent dans la couche épithéliale et capturent kpOmpA,
- les CEB favorisent la différenciation et la maturation de ces précurseurs de DC, par un mécanisme partiellement dépendant de l'ICAM-1,
- des injections intranasales de kpOmpA, chez la souris, induisent un recrutement de cellules CD11c⁺ et I-a^{d+} dans la muqueuse bronchique.

Cette étude démontre l'importance des CEB dans le contrôle du recrutement et des fonctions des DC au sein de la muqueuse bronchique. En effet, l'épithélium bronchique semble être impliqué dans le processus de différenciation/maturation des DC. Les contacts cellulaires, impliquant notamment l'ICAM-1, jouent un rôle important dans la maturation phénotypique des DC. Ainsi, ces travaux démontrent pour la première fois le rôle de l'épithélium bronchique dans le développement de la sensibilisation par les voies aériennes, et soulignent l'intérêt de cibler l'épithélium bronchique pour une immunothérapie au niveau de la muqueuse respiratoire.



Article II

Modulation par les ligands de TLR de l'expression des protéines de jonctions adhérentes et serrées dans les cellules dendritiques : impact sur leur maturation

Taront Solenne, TORRES David, Polette Myriam, HELIOT Laurent, Lassalle Philippe, Gosset Philippe.

La muqueuse respiratoire est constamment exposée à des antigènes d'origine bactérienne ou virale, contre lesquels elle se défend au moyen de la clairance mucociliaire mais également de l'immunité des muqueuses. Parmi les cellules immunitaires impliquées, les cellules dendritiques (DC) forment un réseau d'immunosurveillance complexe au contact de la muqueuse respiratoire.

L'épithélium bronchique constitue une barrière grâce notamment à l'existence de jonctions intercellulaires : les jonctions serrées et les jonctions adhérentes.

Au niveau de l'épithélium intestinal, les DC sont capables de capturer des antigènes situés dans la lumière intestinale en envoyant des dendrites entre les cellules épithéliales sans rompre l'intégrité de la barrière épithéliale. Les DC expriment en effet des protéines de jonctions serrées telles que ZO-1, l'Occludine et la Claudine.

Au niveau respiratoire, le mécanisme par lequel les DC capturent les antigènes au niveau de la lumière bronchique n'est pas entièrement élucidé.

Alors que l'expression des protéines de jonctions serrées dans les DC a été démontrée, la régulation de l'expression des protéines de jonctions adhérentes comme la E-Cadhérine et la β -Caténine, et surtout leur implication dans les interactions entre DC et cellules épithéliales bronchiques (CEB) n'a pas encore été étudiée.

Le but de notre étude était de comprendre l'implication des protéines de jonctions intercellulaires dans les interactions entre CEB et DC.

Pour cela, nous avons d'abord étudié la régulation par les ligands de TLR2, -3 et -4 de l'expression dans les DC des protéines de jonctions serrées ZO-1 et Occludine et des protéines de jonctions adhérentes E-Cadhérine et β -Caténine. Dans un second temps, nous avons analysé les conséquences de l'établissement de jonctions adhérentes entre CEB et DC sur les fonctions de la DC.

CONCLUSION DE L'ETUDE

Nous avons montré que :

- Les MDDC expriment les protéines de jonctions adhérentes E-Cadhérine et β -Caténine et les protéines de jonctions serrées Occludine et ZO-1 à l'état basal.
- Les ligands de TLR2 et -4 augmentent l'expression de ces protéines au niveau des ARNm et des protéines.
- La E-Cadhérine joue un rôle important dans la maturation des DC lors de l'établissement des jonctions intercellulaires entre CEB et DC.

Article III

Implication des récepteurs scavenger dans les interactions entre particules de diesel et cellules dendritiques immatures ou matures

TARONT Solenne, DIEUDONNE Audrey, JEANNIN Pascale, DELNESTE Yves, TONNEL André-Bernard, LASSALLE Philippe, GOSSET Philippe *soumis*

Les voies aériennes sont exposées aux agressions de l'environnement et notamment aux polluants atmosphériques. Ces polluants et plus particulièrement les particules de diesel jouent un rôle dans le développement de l'inflammation pulmonaire et participent à l'augmentation de l'incidence des maladies respiratoires. Cependant, le mode d'action des DEP n'est pas totalement élucidé. En plus de leur action sur les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales bronchiques, les DEP modulent aussi les fonctions des cellules dendritiques. Ces cellules présentatrices d'antigènes sont capables de discriminer le soi du non-soi grâce à des récepteurs particuliers, les PRR (Pattern Recognition Receptors), comme les Toll-like receptors (TLR) et les Scavenger Receptors (SR) ou récepteurs d'épuration. Les SR ont été identifiés à l'origine par leur capacité à lier et internaliser les lipoprotéines modifiées, mais ils sont également capables de reconnaître des microorganismes (agonistes de TLR) ou encore de participer à la clairance de particules inertes au niveau du poumon.

Notre but était donc d'étudier l'implication des SR lors de l'interaction des monocyte-derived(MD)-DC avec les DEP.

Pour cela, nous avons étudié la régulation de l'expression des SR CD36, CXCL16, LOX-1 et SR-B1 dans les MDDC exposées aux DEP associées ou non aux ligands de TLR2, 3 et 4. Nous avons ensuite évalué la capacité des ligands de SR (dextran sulfate et ovalbumine maleylée) à bloquer les effets des DEP sur les fonctions des DC activées par le ligand de TLR4 LPS.

CONCLUSION DE L'ETUDE

Nous avons montré que :

- Les ligands de TLR augmentent l'expression de CXCL16, LOX-1 et SR-B1 contrairement aux DEP seules.
- De façon intéressante, les DEP modulent l'effet des ligands de TLR2 et -4 sur l'expression de LOX-1 et SR-B1.
- Le prétraitement avec les ligands de SR ovalbumine maleylée et dextran sulfate bloque les effets de la faible dose de DEP (1 µg/ml) sur le phénotype des MDDC (diminution de l'expression de CD86 et HLA-DR) mais induit une augmentation de la production de chimiokines (CXCL10, TNF- α).
- En revanche, les ligands de SR ne bloquent pas les effets de la forte dose de DEP (10 µg/ml) sur la production de cytokines (diminution de l'IL-12 et de CXCL10) et sur le métabolisme oxydatif.

En conclusion, la modulation des fonctions des DC par les DEP implique les SR. L'expression de ces SR est modulée par les agonistes de TLR contrairement aux DEP. A plus long terme, des techniques visant à interférer avec l'expression et/ou la fonction des SR seraient une piste intéressante pour limiter les effets des DEP sur la réponse immune pulmonaire.

Troisième partie : Discussion et perspectives

DISCUSSION :

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact des facteurs environnementaux (particules de diesel et agonistes de TLR) sur les interactions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques. Nous nous sommes particulièrement focalisés sur le rôle d'une part de molécules d'adhérence telles que l'ICAM-1 et les protéines de jonctions adhérentes et serrées, et d'autre part des récepteurs d'épuration (SR) dans ces interactions.

Migration des cellules dendritiques

Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules épithéliales bronchiques exposées à KpOmpA sécrètent des chimiokines impliquées dans le recrutement de précurseurs de cellules dendritiques dérivées des monocytes (CCL2, CCL5, et CXCL10), et de précurseurs de cellules de Langerhans (CCL20). Dans un modèle de reconstitution d'épithélium bronchique polarisé, la stimulation des cellules épithéliales bronchiques par KpOmpA augmente le recrutement de précurseurs de cellules dendritiques dérivées des monocytes au sein de la couche épithéliale, et permet la capture de l'Ag par ces cellules dendritiques. Les cellules épithéliales bronchiques favorisent la différenciation et la maturation de ces précurseurs de cellules dendritiques par un mécanisme dépendant d'ICAM-1, ce qui a pour conséquence d'amplifier la réponse des lymphocytes T. Chez la souris, des injections intra-nasales de KpOmpA induisent également un recrutement de cellules CD11c⁺ et I-a^{d+} dans le poumon associé à une activation des cellules épithéliales bronchiques.

D'autres chimiokines, et notamment les chimiokines membranaires Fractalkine/CX3CL1 et CXCL16/SR-PSOX pourraient jouer un rôle dans le recrutement et l'activation des cellules dendritiques. Dichmann *et al* ont montré que la liaison de la Fractalkine/CX3CL1 à son récepteur CX3CR1 induisait la migration et la polymérisation de l'actine des cellules dendritiques immatures et matures (Dichmann 2001). Les cellules épithéliales bronchiques expriment ces deux chimiokines au niveau de la membrane plasmique en condition basale. Après activation, le clivage de ces chimiokines par les métalloprotéases (des ADAM) est augmentée et elles peuvent ainsi agir comme l'ensemble des chimiokines sous forme soluble. Leur expression membranaire suggère qu'elles pourraient intervenir lors des contacts cellulaires entre les cellules épithéliales bronchiques et les cellules dendritiques, notamment en guidant les cellules dendritiques au sein de la couche épithéliale. Une localisation précise de ces chimiokines permettrait de visualiser ces

interactions. Par ailleurs, une étude réalisée par Papadopoulos *et al* montre quant à elle que les cellules dendritiques expriment la Fractalkine et que son expression est régulée positivement lors de leur maturation, suggérant que cette chimiokine pourrait jouer un rôle important lors de l'interaction des cellules dendritiques matures avec les lymphocytes T (Papadopoulos 1999). Plusieurs études montrent que l'expression de la Fractalkine par les cellules dendritiques joue un rôle clé dans le développement de la réponse immunitaire en facilitant le recrutement des lymphocytes T, dans un contexte tumoral (Guo 2003; Nukiwa 2006), mais également au cours de l'infection par *Legionella pneumophila* et de l'asthme allergique (Kikuchi 2005).

CXCL16 intervient aussi dans l'activation des lymphocytes T. Les travaux de Tabata *et al* et Shimaoka *et al* montrent que l'expression de CXCL16 par les cellules dendritiques joue un rôle important dans l'attraction et le développement de la réponse lymphocytaire T (Shimaoka 2004; Tabata 2005). Enfin, l'étude de Morgan *et al* montre que l'expression de CXCL16 au niveau du poumon induit le recrutement et le développement d'une réponse lymphocytaire T (Morgan 2005). En résumé, l'expression de ces chimiokines par les cellules épithéliales bronchiques pourrait intervenir à la fois dans les interactions avec les cellules dendritiques mais également avec les lymphocytes T.

Rôle d'ICAM-1 dans les interactions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques

Notre travail a permis de montrer que la différenciation/maturation des cellules dendritiques observée lors de la coculture avec les cellules épithéliales bronchiques était un mécanisme dépendant d'ICAM-1.

Des études réalisées sur différents modèles de cellules dendritiques montrent que l'interaction d'ICAM-1 avec l'intégrine LFA-1 joue un rôle important dans le processus de maturation des cellules dendritiques ainsi que dans le développement de la réponse immunitaire. Deux études réalisées par Kirchberger *et al* et Burns *et al* sur des monocytes et des cellules dendritiques respectivement montrent que l'activation de ces cellules par un stimulus d'origine virale ou bactérienne induit l'adhérence des cellules dans un mécanisme dépendant d'ICAM-1 (Burns 2004; Kirchberger 2006). D'autres études montrent ensuite que l'interaction d'ICAM-1 avec l'intégrine LFA-1 participe au développement de la réponse immunitaire. C'est notamment le cas des cellules dendritiques dermales qui interagissent avec les fibroblastes du derme de façon dépendante d'ICAM-1, ce qui conduit à la maturation des cellules dendritiques, leur migration vers les organes lymphoïdes drainants et l'induction de la

prolifération des lymphocytes T (Saalbach 2007). Une autre étude réalisée au niveau des organes lymphoïdes montre que les cellules dendritiques des centres germinatifs CD11c⁺ CD4⁺ CD3⁻ induisent la prolifération des PBMC en coculture dans un mécanisme dépendant d'ICAM-1 (Goval 2006). Enfin, une dernière étude réalisée par Blois *et al* montre que l'interaction d'ICAM-1 avec l'intégrine LFA-1 peut être responsable de la rupture de la tolérance, du recrutement de cellules pro-inflammatoires et par conséquent de l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre le fœtus (Blois 2005). L'ensemble de ces travaux montre le rôle important de l'engagement d'ICAM-1 dans le développement de la réponse immunitaire par son action tant au niveau des cellules dendritiques que des interactions avec les lymphocytes T.

Rôle des protéines de jonctions dans les interactions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle des protéines de jonctions adhérentes et serrées dans les interactions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques lors de l'exposition à des agonistes de TLR. Nous avons montré que les agonistes des TLR2 et -4 modulaient fortement l'expression des protéines de jonctions adhérentes E-cadhérine et β -caténine et des protéines de jonctions serrées ZO-1 et occludine au niveau de la cellule dendritique. De manière intéressante, la E-cadhérine contrôle la maturation des cellules dendritiques lors de l'établissement de jonctions entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques.

Les cellules épithéliales ne sont pas le seul type cellulaire à exprimer les protéines de jonctions. En effet, au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques folliculaires forment un réseau, permis grâce à l'expression, à leur surface, de protéines de jonctions, en particulier du complexe E-cadhérine- β -caténine (Muller 2000b). De plus, un type particulier de cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, expriment de façon constitutive la E-cadhérine, protéine de jonctions adhérentes (Tang 1993). Enfin, Sung *et al* montrent qu'une sous-population de cellules dendritiques de phénotype CD103⁺, localisées au niveau de la muqueuse bronchique et des vaisseaux sanguins pulmonaires, expriment non seulement la Langerine, mais aussi les protéines de jonctions serrées claudin-1, -7 et ZO-2 (Sung 2006).

L'expression par les leucocytes, et en particulier les cellules dendritiques, de protéines appartenant aux complexes jonctionnels intervient dans le trafic de ces cellules. En effet, l'expression de protéines de jonctions adhérentes et serrées par les leucocytes facilite les

interactions entre ces derniers et les cellules épithéliales. De plus, l'expression de ces protéines subit une régulation fine : l'expression de la E-cadhérine est augmentée afin de permettre les interactions entre les leucocytes et les cellules épithéliales ou endothéliales, puis diminue, contribuant à la domiciliation et à la redistribution des leucocytes (Alexander 2001).

Contrairement à ce que l'on observe dans les cocultures entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques, les protéines de jonctions, surtout celles des jonctions serrées, ne sont pas présentes au niveau membranaire dans les cultures de cellules dendritiques seules, bien que celles-ci forment des agrégats après activation par les ligands de TLR. Ainsi, nos résultats montrent une localisation préférentiellement nucléaire de ZO-1 au niveau des cellules dendritiques. Plusieurs études rapportent cette localisation nucléaire dans les cellules qui prolifèrent et qui migrent dans le processus de cicatrisation. Ainsi, Gottardi *et al* ont montré la localisation nucléaire de ZO-1 dans des cellules épithéliales qui prolifèrent (Gottardi 1996). Par ailleurs, Benezra *et al* montrent quant à eux la localisation nucléaire de ZO-1 dans les fibroblastes cornéens en conditions propices à la prolifération ou à la migration dans le processus de cicatrisation (Benezra 2007). Le rôle de cette protéine dans le noyau demeure à ce jour inconnu mais nous pouvons supposer qu'il intervienne dans la transcription des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou la migration tout comme la β -caténine.

Dans la coculture des cellules dendritiques avec les cellules épithéliales bronchiques, les protéines de jonctions adhérentes et serrées sont exprimées au niveau membranaire, et sont co-localisées avec celles des cellules épithéliales bronchiques, ce qui suggère la conservation de l'intégrité de la barrière épithéliale lors de ce processus. Ceci est d'ailleurs en accord avec les travaux de Rescigno *et al*, Blank *et al* et Jakob *et al* qui mettent en évidence la formation de jonctions entre les DC et les cellules épithéliales intestinales, bronchiques et de la peau, ainsi que la conservation de l'intégrité de la barrière épithéliale (Blank 2007; Jakob 1999; Rescigno 2001). Lors de l'exposition de l'épithélium intestinal à des bactéries pathogènes, les cellules dendritiques sont capables d'exprimer transitoirement ZO-1, la claudine et l'occludine, protéines de jonctions serrées, afin d'insinuer des dendrites entre les cellules épithéliales et de capturer l'antigène. Les auteurs montrent par ailleurs que la stimulation par des bactéries régule leur expression (Rescigno 2001).

Les interactions des cellules dendritiques avec d'autres types cellulaires ont également pu être mises en évidence dans un autre modèle : celui de la peau. Il est établi que les cellules de Langerhans interagissent avec les kératinocytes de la peau en maintenant l'intégrité de la barrière épithéliale. Les cellules de Langerhans exprimant constitutivement la E-Cadhérine, des jonctions adhérentes sont ainsi formées entre les deux types cellulaires (Jakob 1999).

Ceci suggère donc l'existence d'un signal ou cosignal présent dans la coculture, induisant la localisation membranaire des différentes protéines de jonctions au niveau de la cellule dendritique, ce signal étant absent dans la culture de cellules dendritiques seules.

Les nectines pourraient être impliquées dans ce processus. En effet, ces protéines jouent un rôle clé lors de la formation des jonctions adhérentes et serrées. L'interaction des nectines de deux cellules adjacentes permet en effet le recrutement des complexes protéiques des jonctions adhérentes et serrées (Miyoshi 2005).

On peut également proposer un autre type de dialogue, entre les PRR (TLR et SR) et les protéines de jonctions intercellulaires, et ce, à deux niveaux. Tout d'abord au niveau des cellules épithéliales bronchiques : lors de l'exposition à un antigène, les PRR de la cellule épithéliale bronchique pourraient réguler l'expression des protéines de jonctions intercellulaires et altérer le maintien des jonctions. En effet, une altération de ces jonctions a été observée au cours d'une réaction inflammatoire ; cependant, l'implication des PRR dans ce processus n'est pas clairement définie au niveau de l'épithélium. L'effet semble donc différent de celui observé sur les cellules dendritiques puisque les ligands de TLR2 et -4 n'amplifient pas *in vitro* l'expression des protéines de jonctions intercellulaires dans les cellules épithéliales bronchiques. Ce processus pourrait faciliter l'insertion des cellules dendritiques ou d'autres leucocytes au sein de l'épithélium et/ou leur transmigration. Par ailleurs, l'insertion des dendrites de la cellule dendritique dans l'épithélium pourrait s'accompagner d'une redistribution des PRR à la surface des cellules dendritiques en faveur de l'extrémité apicale des dendrites. Cela faciliterait ensuite la capture et l'apprêtement des Ag par ces cellules.

Le rôle des protéines de jonction dans la fonction des cellules dendritiques ne se limite pas à cette redistribution des PRR et il semble intervenir également dans la maturation de ces cellules. Afin de confirmer le rôle de la E-cadhérine dans la maturation des cellules dendritiques, nous avons étudié l'effet de la coculture avec des clones surexprimant la E-cadhérine. Nous avons montré que la E-cadhérine avait peu d'effet sur le phénotype des cellules dendritiques. Seule l'expression de CCR7 et de CD40 est diminuée après stimulation par les ligands de TLR. Un travail sur les cellules de Langerhans a montré que l'engagement de la E-cadhérine sur des cellules immatures inhibait leur maturation (diminution de l'expression du CD86) en présence de cytokines (Riedl 2000). Nous avons également montré que la production des cytokines immuno-régulatrices IL-6, IL-10 et IL-12p70 induite par les ligands de TLR2, -3 et -4 diminuait lors de la mobilisation de la E-cadhérine, ce qui pourrait expliquer la faible capacité des cellules dendritiques à induire la prolifération des

lymphocytes T naïfs en coculture. Ces données et celles de Riedl *et al* montrent que la E-cadhérine limiterait la maturation des cellules dendritiques en réponse à des pathogènes au niveau de l'épithélium. De façon intéressante, des études ont montré que la E-cadhérine était non seulement capable d'interagir directement avec NF- κ B et la β -caténine, mais pouvait également réguler leur activité transcriptionnelle. Ceci pourrait expliquer l'inhibition de l'expression de gènes comme l'IL-6, IL-10 et IL-12, dont l'expression dépend en partie de NF- κ B (Deng 2002; Solanas 2008; Sun 2005).

Ainsi, la présence de E-cadhérine permettrait tout d'abord de bloquer les cellules dendritiques dans l'épithélium en induisant la formation de clusters puis après dissociation des jonctions, la β -caténine, par son action de facteur nucléaire pourrait promouvoir la migration des cellules vers les ganglions drainants. Le mécanisme de dissociation de ces jonctions n'est pas connu. Deux études concernant le passage de la barrière hémato-encéphalique par les cellules dendritiques et les monocytes mettent en évidence la production de métalloprotéases par ces cellules afin de faciliter la transmigration (Reijerkerk 2006; Zozulya 2007). Par ailleurs, d'autres études ont montré que certaines protéines de jonctions comme l'occludine et la E-cadhérine pouvaient être clivées par ces mêmes métalloprotéases, notamment les MMP-2, -5 et -9 (Margulis 2005; Symowicz 2007; Yang 2007). La β -caténine intervenant dans la production des métalloprotéases, il est vraisemblable qu'il y ait un lien entre ces deux mécanismes et une séquence dans leur intervention, la production de protéases intervenant après dissociation des jonctions. Ce mécanisme intervient également de manière déterminante dans la cancérogénèse de l'épithélium notamment dans les carcinomes colorectaux et pulmonaires (Mann 1999).

Autres facteurs solubles

D'autres mécanismes sont impliqués dans la coopération entre cellules épithéliales bronchiques et cellules dendritiques et font intervenir des facteurs solubles comme le GM-CSF, produit par les cellules épithéliales bronchiques, et facteur de différenciation des cellules dendritiques. On peut également citer la cytokine TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) de la famille de l'IL-7. Selon le contexte, cette cytokine induit soit une tolérance, soit une réponse de type Th2. Le travail de Rimoldi *et al* montre que la production continue mais faible de TSLP par la muqueuse intestinale permet de maintenir l'homéostasie de la muqueuse grâce au développement de cellules dendritiques au phénotype non inflammatoire (Rimoldi 2005). Dans le même ordre d'idées, l'étude de Zeuthen *et al* montre que des cellules

dendritiques cultivées dans du milieu conditionné par des cellules épithéliales intestinales et mises en présence de bactéries commensales permettent le développement d'une réponse tolérogénique, exprimant faiblement les marqueurs de maturation, l'IL-12 et le TNF- α (Zeuthen 2008). Les études suivantes montrent que le TSLP peut également induire une réponse de type Th2 au niveau du poumon et au niveau de la peau. Les travaux de Zhou *et al* montrent que des souris transgéniques exprimant spécifiquement le TSLP au niveau du poumon développent spontanément une réaction inflammatoire allergique caractérisée par un infiltrat massif de leucocytes dont des cellules de type Th2, alors que les souris n'exprimant pas le récepteur du TSLP ne développent pas de réaction inflammatoire allergique en réponse à un antigène inhalé (Zhou 2005). Enfin, le travail d'Ebner *et al* sur les cellules de Langerhans de la peau montre que la présence de TSLP permet la survie et la maturation des cellules de Langerhans issues de la peau, leur migration vers les organes lymphoïdes drainants où elles induisent une réponse lymphocytaire de type Th2 (Ebner 2007). Le TSLP intervient probablement dans les interactions entre cellules dendritiques et cellules épithéliales bronchiques puisque les cellules épithéliales bronchiques constituent une des principales sources de cette cytokine dans le poumon.

Les PRR (Pattern Recognition Receptors)

Nous nous sommes enfin attachés à étudier les mécanismes de capture des facteurs exogènes, et notamment le rôle des SR lors de l'interaction des cellules dendritiques avec les particules de diesel. Nous avons montré que la modulation des fonctions de la cellule dendritique par les DEP passaient par les SR. En effet, les DEP à faible dose inhibent la maturation des cellules dendritiques induite par le LPS ainsi que leur production de cytokines et de chimiokines. Mais cet effet des DEP est levé en présence de ligands de SR, l'ovalbumine maléylée notamment, et de façon moins importante par le dextran sulfate. Par ailleurs, les agonistes de TLR régulent positivement l'expression des SR au niveau de la cellule dendritique comparativement aux DEP.

Les SR sont particulièrement impliqués dans la reconnaissance et l'élimination des lipoprotéines oxydées, comme les LDL oxydés, transporteurs du cholestérol (Peiser 2002). Le cholestérol étant une molécule à structure polycyclique, l'hypothèse de la reconnaissance des hydrocarbures composant les particules de diesel est plausible. Par ailleurs, la charge ionique est également un élément très important dans l'interaction des ligands avec les SR.

Nous avons montré que la coincubation du LPS avec les DEP influence le phénotype des cellules dendritiques matures en diminuant l'expression des molécules de costimulation

(CD86) et du CMH de classe II, dans un mécanisme dépendant de la mobilisation des SR. Ceci peut directement influencer la réponse lymphocytaire T puisque le CD86 est impliqué dans le développement d'une réponse de type Th2.

Par ailleurs, comme les SR sont également des corécepteurs des TLR, les DEP peuvent interférer avec la signalisation des TLR via la mobilisation des SR. Des études ont montré que l'activation du TLR2 par le ligand de TLR2 KpOmpA dépend des SR SREC-1 and LOX-1. De la même manière, l'activation du TLR2 par les diacylglycerides dépend de CD36 (Hoebe 2005; Jeannin 2005). Enfin, CXCL16 est impliqué dans l'activation du TLR9 (Gursel 2006).

Les SR jouent un rôle important dans la reconnaissance et la présentation des Ag par les cellules dendritiques. Le ciblage vers les SR permet aux Ag pris en charge par ces récepteurs d'emprunter la voie de présentation croisée. Cette voie conduit à la présentation de l'Ag par le CMH de classe I et le développement d'une réponse CD8⁺. Par ailleurs, des études réalisées chez l'homme et la souris ont montré que les SR jouaient un rôle dans le maintien de la tolérance périphérique par un mécanisme non identifié (Cunha-Rodrigues 2007). De plus, les cellules épithéliales bronchiques expriment à l'état basal, des SR tels que LOX-1, SREC-1, CD36, PS-R et, de manière plus marquée, SR-B1 et CXCL16. Leur stimulation par le TNF- α , mais pas par les ligands de TLR, amplifie l'expression de CXCL16, LOX-1 et SREC-1. Ces SR sont impliqués dans la capture par les cellules épithéliales bronchiques de ligands de SR tels que l'Ovalbumine Maléylée mais ne semblent pas permettre leur transcytose au travers de la couche épithéliale. De plus, des ligands de SR bloquent *in vitro* et *in vivo* l'activation du TLR3 sur l'épithélium. Par microscopie confocale, une colocalisation de différents SR et du TLR3 a été observée de manière plus nette après activation des cellules par le TNF- α . Cette inhibition s'associe à un défaut de migration et d'activation des cellules dendritiques dans les ganglions drainants.

L'ensemble de ces données suggèrent que les SR pourraient intervenir dans la reconnaissance des Ag ou particules par les cellules épithéliales bronchiques et ensuite moduler la fonction des cellules dendritiques. L'impact de cette reconnaissance par les SR sur le développement d'une réponse CD8 ou régulatrice n'a pas été évalué. Pour réaliser cette étude, l'effet du ciblage d'un Ag vers les SR en le maléylant ou en l'insérant dans des liposomes chargés en phosphatidylsérine sera analysé sur la fonction des cellules dendritiques et leur capacité à orienter la réponse des cellules T naïves. L'impact *in vivo* de ce ciblage sera également étudié. Pour en analyser le mécanisme, il nous semble également important d'identifier le ou les SR impliqués dans la reconnaissance des particules de diesel et les

ligands du TLR3 pour pouvoir ensuite analyser leur rôle au niveau de la coopération entre cellules dendritiques et cellules épithéliales bronchiques en réponse à ces stimuli. Ces expériences seront réalisées par ajout d'Ac bloquants ou par l'utilisation de si-RNA.

Conclusion

L'ensemble de nos travaux a permis de montrer qu'un dialogue se créait entre les cellules épithéliales bronchiques et les cellules dendritiques, aussi bien dans les conditions physiologiques que dans le cadre de l'exposition à un antigène ou à un pathogène. Ce dialogue intervient aux différentes étapes du passage des cellules dendritiques au sein de l'épithélium. Lorsque les cellules épithéliales bronchiques sécrètent des chimiokines, elles vont permettre le recrutement de précurseurs de cellules dendritiques. Par ailleurs, les cellules épithéliales bronchiques vont guider ces cellules dans cet environnement en interagissant via l'ICAM-1 puis en établissant des jonctions avec les cellules dendritiques. Ce dialogue va vraisemblablement influencer la capture et la présentation des Ag présents dans la lumière des voies aériennes notamment par la redistribution de certains récepteurs de reconnaissance. Le rôle des SR à ce niveau mériterait d'être précisé. Par l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et l'effet sur la maturation, ces interactions pourraient aussi contrôler la migration des cellules dendritiques vers les ganglions drainants et ainsi modifier la réponse T. L'impact de ces différents événements est probablement modulé selon le contexte environnemental auquel est exposé l'épithélium et le type de PRR mis en jeu.

L'ensemble des travaux conduit à une meilleure connaissance des mécanismes régissant le développement de la réponse immune pulmonaire, à l'état physiologique, mais aussi en réponse à des polluants ou des pathogènes, ce qui pourrait conduire à l'identification de nouvelles approches en immunothérapie

Annexes

Impact of Bronchial Epithelium on Dendritic Cell Migration and Function: Modulation by the Bacterial Motif KpOmpA¹

Muriel Pichavant,* Solenne Taront,* Pascale Jeannin,[†] Laëtitia Breuilh,*
Anne-Sophie Charbonnier,[‡] Corentin Spriet,[§] Catherine Fourneau,* Nathalie Corvaia,[¶]
Laurent Héliot,[§] Anne Brichet,[#] André-Bernard Tonnel,^{**} Yves Delneste,[†] and Philippe Gosset^{2*}

Mucosal immune response depends on the surveillance network established by dendritic cells (DC), APC localized within the epithelium. Bronchial epithelial cells (BEC) play a pivotal role both in the host defense and in the pathogenesis of inflammatory airway disorders. We previously showed that the outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA), a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) derived from *Klebsiella pneumoniae*, activates BEC. In this study, we evaluated the consequences of this activation on DC traffic and functions. KpOmpA significantly increased the production of CCL2, CCL5, CXCL10, and CCL20 by BEC. Stimulation of BEC increased their chemotactic activity for monocyte-derived DC (MDDC) precursors, through CCL5 and CXCL10 secretion. BEC/MDDC precursor coculture leads to an ICAM-1-dependent accelerated differentiation and enhanced maturation of MDDC. BEC/DC interactions did not affect the capacity of DC to induce T cell proliferation. However, DC preincubated with BEC increased significantly the IL-10 production by autologous T cells. Basolateral and intraepithelial DC differently enhance IL-4 and/or IL-10 synthesis according to the condition of stimulation. In vivo, intranasal injections of KpOmpA into BALB/c mice induced the recruitment of CD11c⁺ and I-A^{d+} myeloid DC associated with bronchial epithelium activation as evidenced by CCL20 expression. These data show that KpOmpA-exposed BEC participate in the homeostasis of myeloid DC network, and regulate the induction of local immune response. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 5912–5919.

The effective host defense against bacterial infection is primarily dependent upon the innate immune system through the rapid clearance of bacteria by neutrophils and macrophages (1). In addition to a nonspecific antibacterial activity, leukocytes release inflammatory mediators that activate APCs and facilitate the initiation of an adaptive immune response. Dendritic cells (DC)³ play a major role in the surveillance of peripheral tissues for incoming Ags (2, 3). In airway mucosa, immature myeloid DC constitute a dense network including interstitial DC and Langerhans cells (LC), closely located within airway epithelium (4), that act as sentinels by discarding foreign Ags and pathogens in the surrounding tissue.

Migration is an integral part of DC functions (5). Precursor cells first migrate from the bone marrow to resident sites in tissues such as lung. At steady state, due to the environment, immature DC and/or their precursors are continuously recruited to the airway mucosa

where inhaled Ags are sampled (6). Upon activation by inflammatory mediators or microbial components, they undergo a complex process of maturation allowing their migration toward the regional lymph nodes (7) through a modification of adhesion molecule and chemokine receptor expression (8). Moreover, DC maturation is associated with high surface expression of MHC and costimulatory molecules, as well as secretion of immunomodulatory cytokines refers mainly to IL-10 and IL-12. These factors drive the differentiation and the polarization by DC of naive T cells into Th1, Th2, or alternatively into regulatory T cells. Recent data suggest that DC behavior is locally controlled by lung environment and particularly by bronchial epithelial cells (BEC) (9–11). In addition to GM-CSF, these BEC produce several cytokines and chemokines and express adhesion molecules potentially involved in DC traffic, as shown after exposure to diesel exhausted particles or allergens (6, 11). In both allergic patients and nonatopic subjects, allergen-exposed BEC trigger the recruitment of monocyte-derived DC (MDDC) precursors through the secretion of CCL2, CCL5, and CXCL10. In contrast, the migration of CD34⁺-derived LC precursors, depending on CCL20 secretion, is only observed with BEC from allergic patients. The recruitment of DC precursors by BEC suggests that local DC differentiation/maturation could be regulated by a confined crosstalk with BEC (12).

In this context, we demonstrated that BEC bind and are directly activated by outer membrane protein A (OmpA) from *Klebsiella pneumoniae* (KpOmpA), a mechanism implicated in neutrophil migration and the initiation of the innate immune response (13). OmpA has been shown to bind to and activate macrophages and immature MDDC in a TLR-2-dependent manner (14, 15). Moreover, KpOmpA is a carrier molecule suitable to generate a CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses in different models of immunization (16–20). This model of exposure to a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) derived from a pathogen with a lung tropism appears to us particularly relevant to evaluate the role of BEC in linking innate and adaptive immunity within airway mucosa.

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U774, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; †INSERM U564, University Hospital of Angers, Angers, France; ‡INSERM U459, Centre Hospitalier Régional Universitaire (CHRU), Lille, France; §Plateau d'Imagerie Cellulaire, Institut de Biologie de Lille, Lille, France; ¶Centre d'Immunologie Pierre Fabre, St Julien en Genevois, France; and **Clinique des Maladies Respiratoires, CHRU, Lille, France

Received for publication December 5, 2005. Accepted for publication July 31, 2006.

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.

¹S.T. was a recipient of a fellowship from Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. C.S. was supported by Région Nord-Pas-de-Calais PhD fellowship.

²Address correspondence and reprint requests to Dr. Philippe Gosset, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 774, Institut Pasteur, 1, rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. E-mail address: Philippe.Gosset@pasteur-lille.fr

³Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; BAL, bronchoalveolar lavage; BEC, bronchial epithelial cell; KpOmpA, outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae*; LC, Langerhans cell; DC, dendritic cell; MDDC, monocyte-derived DC; PAMP, pathogen-associated molecular pattern.

To define this role, we studied the crosstalk between BEC and DC after exposure to KpOmpA, and particularly the regulation of DC traffic and functions by BEC. For this purpose, we analyzed the capacity of human BEC upon exposure to KpOmpA, to produce chemokines, to control the recruitment and the differentiation/maturation process of DC in an *in vitro* model of reconstituted bronchial epithelium. The *in vivo* relevance of this mechanism was also defined. The results showed that bronchial epithelium regulates the functions of DC and that this process might affect the development of the T cell response.

Materials and Methods

Bronchial epithelial cells

All procedures were reviewed and approved by the Hospital Institutional Review Board and written informed consent was obtained from all subjects included in the study.

Human bronchial biopsies were obtained by fiberoptic bronchoscopy from 25 nonatopic patients who were being investigated for idiopathic chronic cough ($n = 5$) or for bronchopulmonary carcinoma ($n = 20$). For 9 patients, the diagnosis of cancer was not confirmed. For the patients without tumor, there is no obvious abnormality in the airways. There are 12 smokers among these patients with a smoking history of 11 ± 3 packs/yr (mean \pm SEM). These patients did not receive any anti-inflammatory or immunomodulatory medication. In patients with cancer, biopsies were collected far from the carcinoma.

The human bronchial epithelial cell line BEAS-2B and primary BEC were cultured as previously described (13). BEC were exposed to different concentrations of KpOmpA. This protein was produced according to pharmaceutical quality standards, intended for clinical trials in human (14). Supernatants of BEC were collected after 24 h of incubation.

Preparation of monocyte-derived dendritic cells and naive T cells

Blood monocytes were purified by positive selection over a MACS column using anti-CD14-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec) and were differentiated into DC by standard procedures (21). Briefly, immature DC (high expression of CD1a and CD11c) were obtained after culture for 6 days in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen Life Technologies) and containing 10 ng/ml IL-4 and 25 ng/ml GM-CSF (R&D Systems). Mature MDDC were obtained after 24 h of incubation with 1 μ g/ml LPS (from 055B5 *Escherichia coli* strain; Sigma-Aldrich).

Naive Th cells were isolated from the CD14⁻ fraction by negative selection using the CD4⁺ T cell isolation kit associated with CD45RO microbeads (Miltenyi Biotec). After magnetic selection of memory T cells, the negative fraction contained >95% of CD4⁺ CD45RA⁺ cells, as determined by flow cytometry (data not shown).

Chemokine and cytokine measurements

The concentrations of CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CCL20/MIP-3 α , and CXCL10/IP-10 chemokines were determined in BEC supernatants by ELISA (all obtained from R&D Systems). Murine CCL20 was measured in lung extracts and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids (R&D Systems). IL-10, IL-12p70 (Dialclone), IL-6, CCL17/TARC, and CCL22/MDC (R&D Systems) were measured in BEC/DC coculture supernatants, and IL-4, IFN- γ , and IL-10 (Dialclone) in DC/T cell coculture supernatants, by sandwich enzyme immunoassay, as described by the manufacturer.

Boyden-type microchamber chemotaxis assays

Each BEC supernatants (1/20 in RPMI 1640 medium containing 0.1% FCS) and CCL5, used as positive control (200 ng/ml; R&D Systems), were added to the lower wells of the chemotaxis chamber (48-well Boyden microchamber; Neuroprobe). MDDC migration (5×10^4 cells/well in 50 μ l of RPMI 1640 medium, 0.1% FCS) was performed through a standard 5- μ m pore filter (Neuroprobe), at 37°C for 1 h and 30 min. Migrated cells were counted after staining on the lower side of the filter in three randomly selected high power fields (magnification $\times 40$). Each assay was performed in quadruplicate. Results are expressed as the difference between mean numbers of cells per high power fields minus the negative control (medium alone).

Identification of BEC-derived mediators implicated in DC precursor recruitment

Chemokine depletion of BEC supernatants was performed with protein G-Sepharose affinity columns (Amersham Biosciences) preincubated with

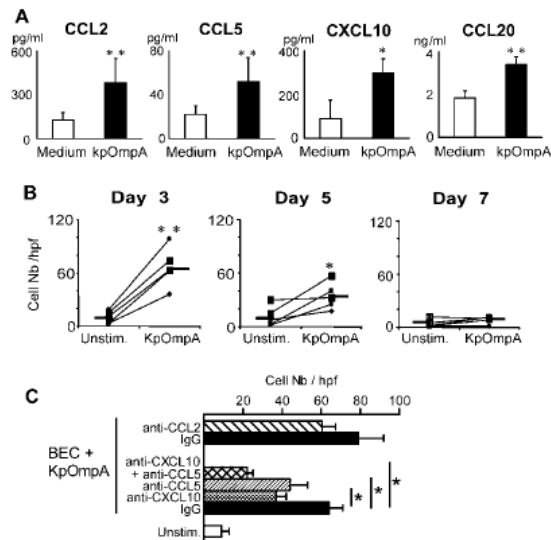


FIGURE 1. KpOmpA-exposed BEC modulate DC precursor recruitment through chemokine secretion. **A**, KpOmpA increases chemokine production by BEC. Chemokine levels were evaluated in 24-h supernatants of primary BEC cultures cultured in medium alone or with 20 μ g/ml KpOmpA. $n \geq 6$. *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$ compared with unstimulated cells. **B**, Migration of MDDC collected at different time points during the differentiation was evaluated in response to BEC supernatants. Results are expressed as the mean \pm SEM of the number of cells by high power fields minus the medium alone ($n = 5$). **C**, The effect of CCL2 neutralization and depletion in either CCL5, CXCL10, and of both CCL5 and CXCL10 in KpOmpA-stimulated BEC supernatants was defined on day 3 precursor recruitment. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 5$).

anti-CCL5 (BD Pharmingen) and/or anti-CXCL10 Abs (BD Pharmingen) or rabbit IgG as control (1 μ g/ μ l protein G-Sepharose). Solutions of rhCCL5 and rhCXCL10 (200 ng/ml; R&D Systems) were similarly depleted to control the efficacy of the depletion (78 and 75%, respectively; data not shown).

For neutralization experiments, BEC supernatants were incubated with neutralizing anti-CCL2 (R&D Systems) and anti-CCL7 Abs (BD Pharmingen) (10 μ g/ml) or with rabbit IgG, for 1 h at 37°C. Efficacy of neutralization was checked using rhCCL2 or rhCCL7 solutions (200 ng/ml; R&D Systems): 85 and 80% of neutralization were obtained respectively (data not shown).

BEC/DC precursors coculture model

BEC were cultured on the lower side of a 5- μ m pore filter coated with collagen G matrix (type I and III collagen) (Biochrom KG). After confluence, BEC were starved overnight in 50% RPMI 1640 medium, 0.1% FCS, and trans epithelial resistance was controlled (data not shown). Biotinylated KpOmpA (20 μ g/ml) was added in the lower chamber containing BEC, and day 3 MDDC precursors (1×10^6 cells) in the upper chamber for 24 h in RPMI 1640 medium containing 0.1% FCS. To evaluate the role of ICAM-1, BEC were preincubated with blocking anti-ICAM-1 Ab or an isotype control (5 μ g/ml; R&D Systems) for 2 h, and washed before coculture with MDDC precursors.

Confocal microscopy and flow cytometry

The epithelial layer containing migrated MDDC precursors was assessed by confocal microscopy. MDDC precursors were stained with FITC-labeled anti-CD11c mAb, BEC with PE-labeled anti-CD49c mAb or the corresponding isotype controls (BD Biosciences), and biotinylated KpOmpA was revealed with allophycocyanin-labeled streptavidin. The epithelial layer containing migrated MDDC precursors was assessed by confocal microscopy (Imaging Core Facility of Calmette Campus). Imaging was done using a DM-IRE2 inverted microscope with SP2-AOBS scan-head (Leica). Acquisitions were performed using a 100 \times , 1.4 NA objective. The laser excitation wavelengths were selected with an AOBBS, and

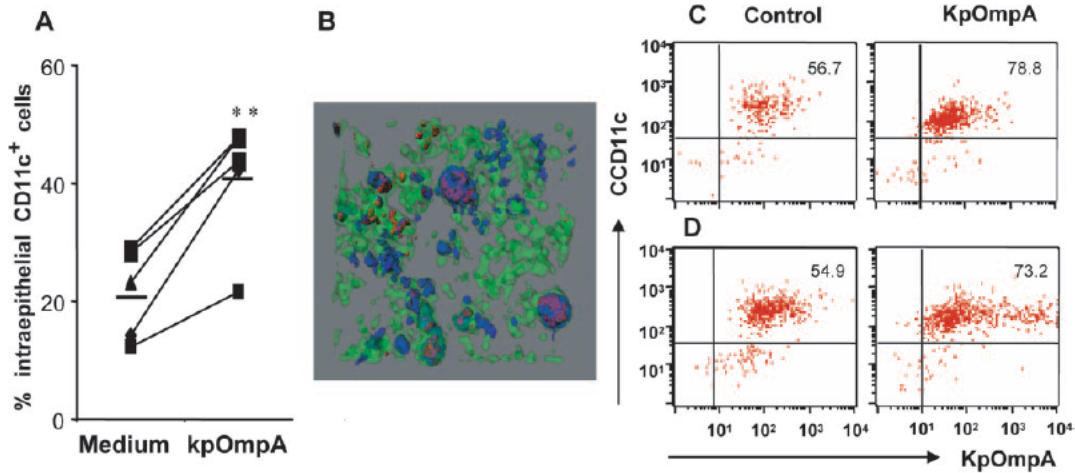


FIGURE 2. Increased MDDC precursor recruitment and Ag capture within bronchial epithelium exposed to KpOmpA. **A**, Quantification of day 3-MDDC precursor migration into the epithelial layer was analyzed using a polarized coculture model. KpOmpA (20 μ g/ml) was applied on the apical pole of BEC. Percentage of CD11c⁺ MDDC within the epithelium was analyzed 24 h later ($n = 6$). **, $p < 0.01$. **B**, Migration of MDDC precursors (day 3) and KpOmpA capture were visualized using the polarized coculture model by confocal microscopy. Biotinylated-labeled KpOmpA (20 μ g/ml) was applied on the apical pole of BEC. MDDC precursors (CD11c⁺ cells) are stained in red, BEC (CD49c⁺ cells) in green, and KpOmpA in blue, as revealed by addition of allophycocyanin-conjugated streptavidin. **C** and **D**, The capture of biotinylated KpOmpA and of a protein control by basolateral (**C**) and intraepithelial (**D**) DC was also evaluated by flow analysis in coculture with BEC. CD11c⁺ cells were selected, and the percentage of cells that have captured the Ag was reported in the right upper part of the graph ($n = 3$).

their power was modulated by an AOTF (AOBS and AOTF are two specific acousto-optical systems). Excitation power was between 100 and 400 μ W. Three-dimensional reconstruction results of the epithelial layer were obtained using Imaris software (Bitplane). KpOmpA capture was also quantified by flow cytometry in comparison with a control, a biotinylated-mouse IgG1 isotype control ($n = 3$).

Day 3 MDDC precursors, and DC from the DC/BEC cell coculture model were assessed for phenotypic analysis. Epithelial layer containing migrated MDDC precursors was dissociated using trypsin solution (Invitrogen Life Technologies). Cells were stained with allophycocyanin-labeled anti-CD11c, FITC-labeled anti-CD86, anti-HLA-DR and anti-CD1a, PE-labeled anti-CD80, anti-CD54, and anti-CD40 mAbs or with the isotype controls (BD Biosciences) and with PE-labeled anti-CCR7 mAb (R&D Systems), and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur; BD Biosciences). To measure DC recruitment in cocultures, the percentage of intraepithelial DC (CD11c⁺ cells) was determined since the number of epithelial cells collected on each Transwell did not differ. Moreover, the level of DC markers was reported as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with specific Ab minus the isotype control MFI (Δ MFI).

Evaluation of DC ability to induce T cell proliferation and polarization

MDDC were collected after 24 h coculture of DC precursor (day 3) with BEC or after culture in medium alone. For the DC/BEC cell coculture model, we collected both the DC present on the basolateral pole of BEC, by vigorous washing of the upper chamber of the Transwell and the epithelial layer. In this case, we positively selected the DC with CD11c microbeads to remove the BEC. Importantly this treatment does not modify the DC function. The purity of this preparation was up to 92%. In a first set of experiments, basolateral DC were incubated with unlabeled autologous naive T cells (DC/T lymphocyte ratio: 1:20) in 1 ml of RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS during 5 days. Moreover, we evaluated the capacity of the different DC to induce the proliferation and the cytokine production of heterologous CFSE-labeled T cells. For both experiments, T cells were collected after a 5-day incubation and resuspended at 2×10^6 cells/ml in fresh medium. Restimulation was performed by the addition of anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (2 μ g/ml) (BD Biosciences). Cytokine production was first analyzed by ELISA in 24-h supernatants for unlabeled T cells. Cytokine synthesis was also measured after a 6-h incubation by intracellular flow cytometry with allophycocyanin-labeled anti-IL-4, anti-

IL-10, and anti-IFN- γ mAb for CFSE-labeled heterologous T cells identified with PE-Cy5-anti-CD4 mAb (all obtained from BD Biosciences).

KpOmpA intranasal injection in mice

Female BALB/c mice, 6–10 wk old (IFFA Credo), were anesthetized by i.p. injection of ketamine/xylazine (Sigma-Aldrich) (2.5% v/v in PBS); 30 μ l of BSA (100 μ g) or KpOmpA solution (100 μ g) was administrated intranasally on days 0, 1, and 2. Analyses were performed 24 h later. Experiments were approved by the animal ethical committee.

Cell infiltrate and inflammation in mouse lung tissue

BAL was first collected; then, right lungs were collected in PBS and mechanically dissociated to extract proteins from lung tissue. With the left lobe, total cells were isolated and then stained with allophycocyanin-labeled anti-CD11c and FITC-labeled anti-I-A^d mAbs, or with the isotype control (BD Biosciences), and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of CD11c⁺ I-A^d cells in the lung.

Left lung specimens were fixed with ImmunohistoFix and embedded in ImmunohistoWax (Aphase). After permeabilization, sections were incubated overnight with purified anti-mouse I-A^d (BD Biosciences) and biotinylated rat anti-mouse CD11c mAb and with rat anti-mouse CCL20 mAb (R & D Systems). For CCL20, Ab binding was detected after a 2-h incubation with biotin-conjugated goat anti-rat IgG (dilution: 1/400; Sigma-Aldrich) at room temperature, followed by incubation (or directly incubated for the biotinylated primary Ab) with Vectastain ABC kit for 30 min (Vector Laboratories). Color development was obtained with a Fast-Red solution (Sigma-Aldrich). Counterstaining was performed using Gill's hematoxylin (Labonord).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test for paired data or the Mann-Whitney U test for unpaired data (SPSS Software, Windows).

Results

KpOmpA induces chemokine secretion by BEC

We previously described that KpOmpA induced the production of CXCL1 and CXCL8 by BEC, two chemokines involved in neutrophil recruitment (13). KpOmpA also induced a dose-dependent

production of CCL2, CCL5, CCL20, and CXCL10 but not CCL7 by BEAS-2B cells after 24 h of stimulation (with a maximal activity at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) associated with specific mRNA expression at 6 h (data not shown). Similar results were obtained with BEC primary cultures. Indeed, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KpOmpA significantly increased the production of CCL2, CCL5, CCL20, and CXCL10 compared with unstimulated cells after 24 h (Fig. 1A). In our hands, LPS was a poor inducer of these chemokines in BEC compared with unstimulated cells (CCL2: 68 ± 12 vs 57 ± 20 ; CXCL10: 68 ± 48 vs 66 ± 33 ; CCL20: 1295 ± 110 vs 1117 ± 240 , respectively). Taken together, these data show that KpOmpA triggers the production by BEC of chemokines potentially involved in DC migration.

KpOmpA triggers the recruitment of DC precursors by BEC

We next tested the effects of supernatants from BEC primary culture on the migration of MDDC precursors (days 1, 3, 5), immature (day 6), and mature MDDC obtained after 24 h of stimulation with LPS. The precursors and the immature DC were responsive to CCL5 with a maximal activity at day 3 and mature DC to CCL19 (data not shown). Whereas supernatants from unstimulated cells had no marked effect, KpOmpA-treated BEC supernatants have a strong chemotactic activity on MDDC precursors taken at day 3, and at a lower level at day 5 ($p < 0.05$ vs unstimulated BEC) (Fig. 1B). In contrast, supernatants of KpOmpA-activated BEC did not modulate the migration of immature (day 7) (Fig. 1B), day 1 precursors, or mature DC (data not shown). No migration of MDDC precursors was observed in response to CCL20 or KpOmpA alone (data not shown). As previously demonstrated (12), immunodepletion of KpOmpA-stimulated BEC supernatants with anti-CXCL10 and anti-CCL5 Abs reduced the number of recruited day 3 precursors (32 and 46% inhibition, respectively; Fig. 1C). Moreover, there is an additive effect of CXCL10 and CCL5 depletion on cell migration (76% inhibition). The neutralizing anti-CCL2 Ab had a weak effect on day 3 precursor migration (Fig. 1C) and neutralizing anti-CCL7 or -CCL20 Abs had no effect on chemotactic activity of BEC (data not shown).

MDDC precursors migrate into bronchial epithelial layer and capture KpOmpA

To confirm that KpOmpA modulated MDDC precursor migration, we used a polarized model of coculture on Transwell devices, using BEC and day 3 MDDC precursors. At baseline, approximately 25% of the cells present in the epithelial layer were MDDC. Exposure to KpOmpA significantly increased the number of CD11c⁺ precursors ($41 \pm 5\%$) present within the epithelium ($p < 0.05$, Fig. 2A). In addition, intraepithelial MDDC (CD11c⁺ cells) captured KpOmpA as illustrated after three-dimensional image reconstruction, by the association between CD11c labeling and allophycocyanin-conjugated KpOmpA (Fig. 2B). Flow cytometry analysis revealed that ~25% of intraepithelial DC (Fig. 2D) captured KpOmpA. Basolateral DC were also labeled but with a lower intensity (Fig. 2C).

BEC favor DC precursor differentiation and maturation: involvement of ICAM-1

We next analyzed the differentiation of day 3 MDDC precursors, recruited by BEC within the epithelial layer (intraepithelial), present on the other side of the Transwell (basolateral) or cultured without BEC (Fig. 3). The expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 were significantly up-regulated on MDDC precursors in contact with the basolateral side of unstimulated BEC, compared with MDDC precursors cultured without BEC (Figs. 3 and 4). This effect was more pronounced on intraepithelial

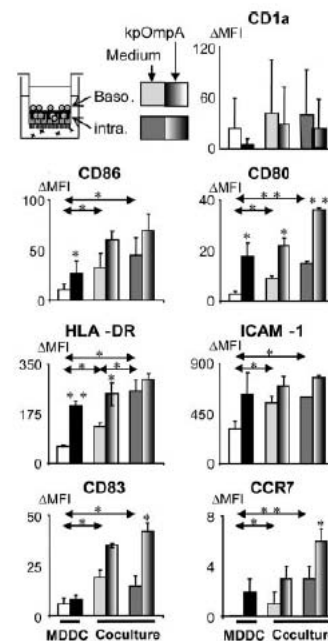


FIGURE 3. KpOmpA potentiates MDDC precursor maturation induced by BEC. Phenotype of day 3 MDDC precursors was analyzed after 24 h without any contact with BEC (MDDC), or in the day 3 MDDC precursors/BEC coculture model (Coculture). In this situation, MDDC precursors in contact with the basolateral pole of BEC and within epithelial layer were studied separately. Cells were cultured in medium alone (clear columns) or with KpOmpA (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (dark columns). Results are expressed as ΔMFI (mean \pm SEM, $n = 6$). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

DC ($p < 0.05$) (Fig. 3). The same profile was obtained for HLA-DR, ICAM-1, and the maturation markers, namely CD83 and CCR7 ($p < 0.05$). In contrast, BEC did not significantly modulate the expression of CD1a as well as the level of CD11c expression by DC (not shown). Addition of KpOmpA to MDDC precursors cultured without BEC increased the expression of CD80, CD86, HLA-DR, ICAM-1, CD83, and CCR7 ($p < 0.05$), but not CD1a. KpOmpA exposure has an additive effect with BEC on the modulation of DC phenotype, particularly on the expression of CD80 and HLA-DR ($p < 0.05$) and, in a lower manner, of CD83, CD86, and CCR7. As previously demonstrated, KpOmpA increased ICAM-1 expression on BEC or MDDC precursors alone (13) and the coculture still enhanced ICAM-1 expression on both types of cells (data not shown). Since β_2 integrin-ICAM-1 interactions result in cell activation, we evaluated the potential implication of this adhesion molecule in the crosstalk between DC and BEC. Pretreatment of BEC with neutralizing anti-ICAM-1 Ab significantly reduced the expression of CD80, CD86, and HLA-DR (46, 68, and 43% inhibition, respectively) whereas this treatment did not block the effect of KpOmpA on DC alone (Fig. 4). In our hands, supernatants of unstimulated and KpOmpA-activated BEC had a weak effect on DC phenotype compared with the coculture model (data not shown).

In addition, IL-6, IL-10, IL-12, CXCL10, CCL17, and CCL22 levels were evaluated in the supernatants of DC precursor/BEC cocultures. IL-10 and IL-12 were nearly undetectable in the coculture even after activation with KpOmpA, whereas this PAMP induced their secretion by MDDC alone (data not shown). In unstimulated cocultures, IL-6 levels were not modulated compared

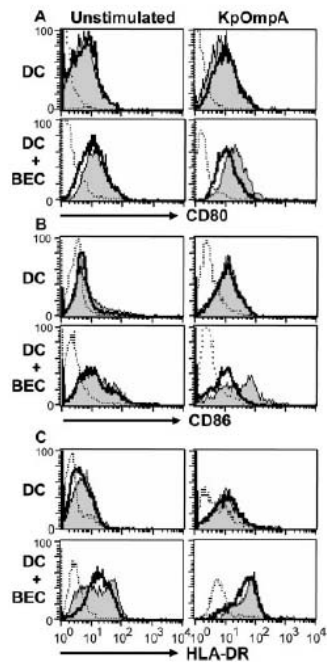


FIGURE 4. ICAM-1 is involved in the up-regulation of DC markers induced by BEC. Phenotype of day 3 MDDC precursors was analyzed after 24 h without any contact with BEC (DC) or of intraepithelial DC (CD11c⁺ cells) obtained in the MDDC/BEC coculture model (DC + BEC). Neutralizing anti-ICAM-1 mAb or an isotype control were added before cell activation with KpOmpA (20 μ g/ml). The expression of CD80 (A), CD86 (B), and HLA-DR (C) was evaluated on MDDC incubated with the isotype control (shaded line) or with anti-ICAM-1 Ab (bold line) compared with the binding of fluorochrome-labeled isotype control (hatched line). Neutralization of ICAM-1 reduces the effect of BEC on the expression of DC markers whereas it does not affect their expression on DC cultured alone. This is a representative experiment out of three.

with the cells alone. KpOmpA increased IL-6 production in all the conditions; however, this effect was significantly lower in the stimulated cocultures compared with MDDC alone ($p < 0.05$) (Fig. 5). CXCL10 production was not modulated by the coculture compared with cells alone (data not shown). In contrast, the secretion of CCL17 and CCL22 were increased at baseline and after KpOmpA exposure in the cocultures compared with day 3 MDDC precursors and BEC alone (Fig. 5). In cocultures, pretreatment of BEC with anti-ICAM-1 Ab significantly decreased the amounts of CCL17 (95 and 55% inhibition, without and with KpOmpA, respectively) and CCL22 (94 and 50% inhibition, respectively), whereas levels of CXCL10 and IL-6 were not affected (Fig. 5). No effect of anti-ICAM-1 Ab was observed on the activation of DC precursors or BEC alone (data not shown).

Coculture of DC with BEC modify their capacity to induce cytokine secretion but not proliferation of naive T cells.

First, the capacity of basolateral MDDC cocultured with BEC to stimulate T cells was evaluated by incubating these cells with autologous CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocytes for 5 days. The MDDC cocultured with BEC did not modify the production of IL-4 and IFN- γ , but increased IL-10 production by T cells after restimulation with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs. KpOmpA activation of

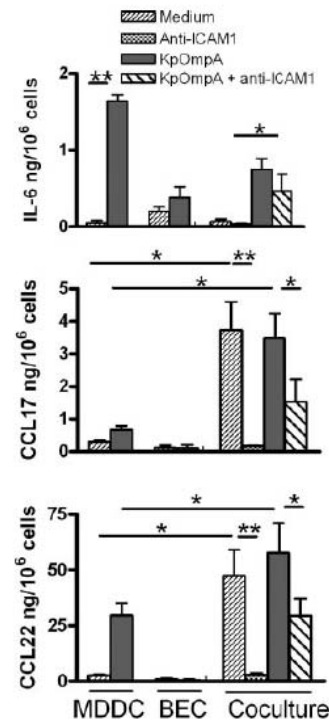
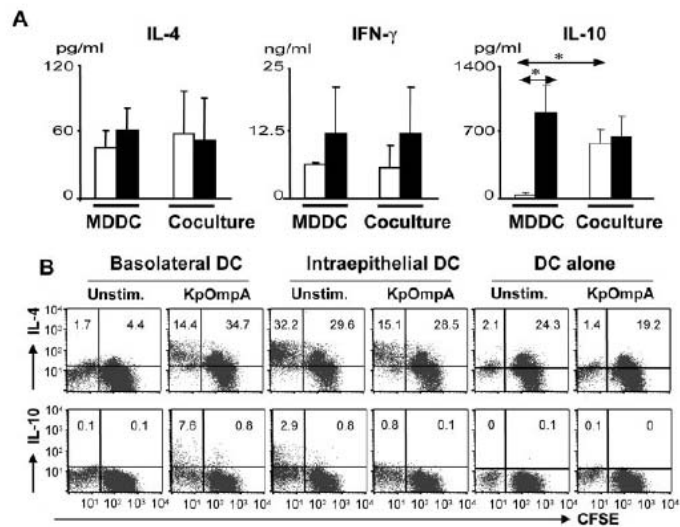


FIGURE 5. BEC modulate the production of CCL17, CCL22, and IL-6 by DC precursors. CCL17, CCL22, and IL-6 levels were evaluated by ELISA in day 3 MDDC precursors/BEC cocultures (Coculture), and compared with the concentrations obtained in the culture of day 3 MDDC precursors (MDDC) or BEC alone. Cells were cultured in medium alone (white columns) or with KpOmpA (20 μ g/ml) (black columns) for 24 h. Neutralizing anti-ICAM-1 Ab (hatched columns) was added to BEC 2 h before coculture with DC precursors. Results are expressed in nanograms per 10^6 cells (mean \pm SEM, $n = 6$). *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$.

MDDC alone or in cocultures did not significantly modulate the capacity of DC to regulate IL-4 and IFN- γ secretion whereas there is a trend to increase the levels of IFN- γ (Fig. 6A). In contrast, treatment with KpOmpA did not affect IL-10 production in coculture with BEC whereas it increased its production with day 3 MDDC precursors.

In a second model, we analyzed T cell proliferation and cytokine production with both basolateral and intraepithelial DC in MLR. In all cases, pre-exposure to KpOmpA increased the capacity of DC alone to induce T cell proliferation (20–25% of proliferating T cells) compared with unstimulated DC (15%) or to T cells alone (5%) (data not shown and Fig. 6B). Both basolateral and intraepithelial DC induced heterologous T cell proliferation similar to that obtained with DC alone (data not shown). IFN- γ production was also increased by KpOmpA exposure; however, it does not differ with the different kinds of DC (data not shown). IL-4 and IL-10 production was similar in the presence of unstimulated basolateral DC and DC alone whereas KpOmpA induced a strong increase of both positive IL-4 and IL-10 T cell percentage only with basolateral DC. In contrast, intraepithelial DC in unstimulated conditions have an enhanced activity to induce T cell cytokine production whereas they do not respond to KpOmpA stimulation. The production of IFN- γ was not markedly affected by the coculture with BEC (data not shown).

FIGURE 6. Production of IL-4, IFN- γ and IL-10 in DC precursors/naive T cells cocultures. **A**, Day 3 MDDC precursors were previously cultured for 24 h with coculture or without BEC (MDDC), in medium alone (white columns) or with KpOmpA (20 μ g/ml) (black columns). Basolateral MDDC were collected and incubated with autologous naive T cells. IL-4, IFN- γ , and IL-10 levels were evaluated by ELISA in 24 h supernatants of T cells restimulated with anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs after 5 days of culture with primed DC. Results are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$). *, $p < 0.05$. **B**, DC/T cell cooperation was also evaluated in a MLR with both basolateral, intraepithelial DC in comparison with DC alone. T cells were labeled with CFSE to analyze their proliferation. The cytokine production was measured by intracellular labeling with allophycocyanin-conjugated anti-IL-4 and anti-IL-10 mAb. We have reported the percentage of CD4⁺ T cells expressing each cytokine in both upper compartments. This is a representative experiment out of four.



Intranasal injection of KpOmpA induces the recruitment of CD11c⁺ cells and I-A^{d+} cells into the airways

In a previous study, we demonstrated that one intratracheal injection of KpOmpA triggered neutrophil influx to bronchial epithelium and into the bronchial lumen (13) whereas no significant migration of myeloid DC was observed in this situation (data not shown). However, after three injections of KpOmpA, no more influx of neutrophils was observed in the BAL (3.3% at day 3 compared with 1.9% with BSA and 44% at day 1 with KpOmpA) or in the bronchial wall (data not shown). In contrast, the number of CD11c⁺ I-A^{d+} cells in lung homogenates was significantly increased after KpOmpA exposure (Fig. 7A). Moreover, important infiltrates of CD11c⁺ cells and I-A^{d+} cells were present mainly in bronchial mucosa (Fig. 7, B and C). In contrast, only a few infiltrating leukocytes were observed in lung sections of mice primed with BSA (Fig. 7C).

To demonstrate the implication of BEC in this process, we measured CCL20 production by ELISA in lung extracts and BAL and analyzed its expression by immunohistochemistry on lung sections. As shown in Fig. 7D, CCL20 production was significantly increased in lung homogenates and BAL after three intranasal injections of KpOmpA but not after only one injection. Moreover, analysis of lung sections revealed that treatment with KpOmpA increased CCL20 expression in BEC and also in subepithelial myofibroblasts compared with mice receiving BSA (Fig. 7E). An enhanced expression of ICAM-1 was also detected (data not shown) as previously reported at day 1 (13). No staining was detected with an isotype control (Fig. 7E). These data show that intranasal administration of KpOmpA induces peribronchial DC recruitment associated with an increase of CCL20 expression in BEC.

Discussion

The primary function of innate immunity is to limit the development of infections. It provides the first line of cellular defense against invading pathogens by the mobilization of neutrophils, macrophages, and DC. Both types of APC build a network of signals that instructs the adaptive immune system to mount a specific response (22). We previously reported that BEC activation by KpOmpA participates in the development of innate immune response, leading to *in vivo* neutrophil recruitment toward the lung

(13). In the present study, we demonstrated that activation by KpOmpA of human BEC affected DC precursor migration and their subsequent differentiation/maturation, resulting in a modified T cell response.

We first focused on the production of chemokines involved in DC migration, and showed that KpOmpA increased the secretion of CCL2, CCL5, CCL20, and CXCL10 by BEC. These results extended previous data showing that KpOmpA directly stimulates BEC to produce cytokines and chemokines, a process probably related, at least, to NF- κ B activation (13). Moreover, KpOmpA exposure of BEC led to an increased recruitment of MDDC precursors, through the coordinate activity of CXCL10 and CCL5. Surprisingly, CCL2 secretion is not involved in the effect of KpOmpA-stimulated BEC, in contrast to the data obtained with allergen-exposed BEC (12). Compared with Der p1-allergen, KpOmpA is a stronger inducer of CXCL10 production by BEC, this effect compensating the lack of CCL2 activity in KpOmpA-derived MDDC precursor recruitment. In addition, as previously demonstrated in the skin, we suspect that KpOmpA is a migration-promoting stimulus for LC (19), a cell only responding to CCL20 (23) in bronchial mucosa. CCL20 expression, but not that of inflammation-related chemokines, determines LC homing in the epidermis (23), the tonsils and probably also in the lung (24). CCL20 secretion by BEC was previously reported after exposure to allergen, but only in allergic asthmatic patients and to diesel exhaust particles (11, 12). Therefore, CCL20 secretion is only induced by strong signals in BEC such as pathogen exposure or by proinflammatory mediators present within the lung environment. In summary, KpOmpA represents a strong inducer of myeloid DC migration within the bronchial epithelium.

After pathogen exposure, the lung vascular compartment is enriched in a population of mononuclear cells (25), which are able to differentiate into MHC class II⁺ DC when exposed to the appropriate growth factors, including GM-CSF, a cytokine produced by BEC (26). This enriched population of DC precursors provides a readily available source to replenish pulmonary DC, both as part of the normal turnover of these cells and during inflammatory reactions (25, 27). In this study, we showed that airway epithelium controls the mobilization of these DC precursors through chemokine secretion. These results were confirmed in an *in vitro* model

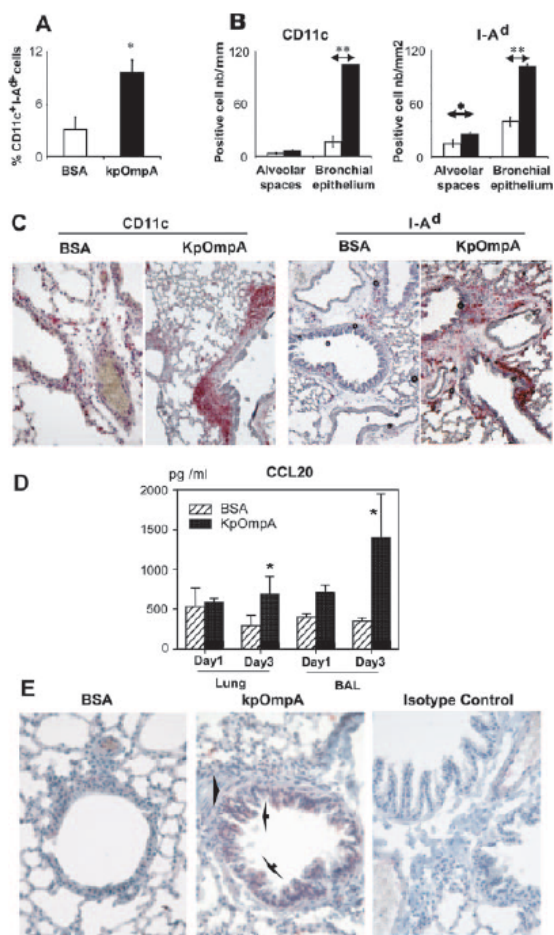


FIGURE 7. Intranasal injection of KpOmpA in mice induces CD11c⁺ and I-A⁺ cell influx and CCL20 production in the lung. Mice received three intranasal injections of BSA (100 μ g) (white columns) or KpOmpA (100 μ g) (black columns). Lungs were collected 24 h after the last injection. **A**, Right lung was dissociated and stained for CD11c and I-A^d cells to evaluate DC recruitment into the lungs. Results are expressed as the percentage of CD11c⁺ I-A⁺ cells in the lung. **B**, Lung sections were stained for CD11c and I-A^d. Results are expressed as the number of positive cells per millimeter of epithelium or per square millimeter for the alveolar spaces (mean \pm SEM). **C**, A representative picture of CD11c and I-A^d staining on lung sections are reported, showing a peribronchial infiltrate in KpOmpA-treated mice. **D**, Measurement by ELISA of CCL20 production in lung extracts and BAL fluids of mice treated with one or three daily intranasal injections of BSA or KpOmpA. *, $p < 0.05$ compared with mice receiving BSA ($n = 12$). **E**, Lung sections were stained for murine CCL20 and with an isotype control. BEC (arrow) and some subepithelial fibroblasts (arrowhead) were positive for CCL20 in KpOmpA-treated mice whereas a weak staining was observed after BSA exposure. No staining was detected in BEC and fibroblasts with the control.

of polarized epithelium where DC precursors invaded the epithelial layer after KpOmpA exposure. Randolph et al. (28) reported that monocytes transmigrating through endothelium differentiated into DC after a complex set of signals. Whereas endothelium delivers the first signal for DC differentiation/maturation process, we hypothesized that airway epithelium may generate the second one (29). The importance of this crosstalk has been suggested in in-

testinal mucosa where transepithelial dendrite formation appears dependent on tight junction protein expression and on the chemokine CX3CL1 (30, 31). In our model of airway epithelium, we showed that BEC control the recruitment of MDDC precursors, the capture of KpOmpA, and the differentiation/maturation process. After 24 h of incubation with BEC, MDDC expressed higher levels of costimulatory molecules and produced higher amounts of chemokines than DC differentiated without BEC. Increased expression of CD83 and CCR7 confirmed DC maturation, and suggested that these DC could migrate to the draining lymph nodes, in response to CCR7 ligands. Moreover, ICAM-1 neutralization on BEC strongly reduced the effect of bronchial epithelium on CCL17 and CCL22 secretion and on the phenotype of recruited MDDC. This suggests that ICAM-1/LFA-1 interactions between BEC and DC precursors are involved in DC activation as well as in the subsequent recruitment of T cells and eosinophils (32). Local administration of KpOmpA in the experimental model also shows that this PAMP induces the recruitment of myeloid DC and the production of CCL20 by BEC in vivo. We have also reported that KpOmpA-exposed animals have an increased expression of ICAM-1 (13) suggesting that both CCL20 and ICAM-1 are involved in the in vivo DC/BEC crosstalk. GM-CSF production by BEC is also important in the interactions between DC and BEC, because addition of neutralizing anti-GM-CSF Ab during the coculture inhibited the secretion of CCL17 and CCL22 whereas this treatment did not affect the expression of membrane DC markers (data not shown). Other adhesion molecules or tight junction proteins may be also involved in the DC/BEC interactions. Because some DC function such as cytokine production (particularly IL-10 and IL-12) are down-regulated by BEC, additional experiments are required to evaluate the potential implication of BEC-derived inhibitors in this process (such as arachidonic acid metabolites).

An intriguing question concerns the consequence of DC recruitment and maturation into airways from healthy donors. In mice, airway exposure to an Ag, such as OVA, induces DC-dependent development of a specific tolerance through ICOS-L expression and IL-10 production (33). In contrast, association of OVA with TLR2 or TLR4 ligands triggers airway sensitization and the development of an allergic reaction, after subsequent OVA instillation (34). Concerning the polarization of Th cell, murine resting airway DC preferentially skews the T cell response toward a Th2 profile suggesting that lung environment favors this type of response (35, 36). Thus, we evaluated the capacity of MDDC precursors cocultured with BEC to activate and polarize T cells in the context or not of an exposure to a PAMP. At steady state, BEC promoted an increased production of IL-10 by T cells, suggesting that BEC may be involved in tolerance induction. In the absence of proinflammatory signals, partially mature DC probably induce an abortive proliferative response of uninfected T cells. Airway exposure to a protein Ag in mice leads to the development of Ag-specific tolerance associated with induction of regulatory T cells, as shown by Akbari et al. (33). In this situation, tolerogenic lung DCs have a phenotype of mature DC expressing IL-10 and ICOS-L. We have also analyzed the T cell response in a situation with stronger T cell activation: a MLR. In this case, coculture with BEC did not affect their capacity to induce T cell proliferation whereas their ability to induce IL-4 and IL-10 production by T cells was modified. Basolateral DC responded more vigorously to KpOmpA whereas intraepithelial DC had a high basal activity but did not respond anymore to KpOmpA. IFN- γ production was not markedly affected by the coculture with BEC. The fact that intraepithelial DC appear more mature than the basolateral cells (Fig. 3) could explain the difference in cytokine production by T cells. However, these differences are not sufficient to modify the T cell proliferation. These

data also demonstrated that bronchial DC might favor the development of Th2 cells as previously reported in experimental models (35, 36). The implicated mechanism remains to be determined. In our model, IL-10 production by DC was not detected whereas IL-12 (a pro-Th1 factor) secretion seemed to be down-regulated. In our *in vivo* model, KpOmpA induced DC recruitment within bronchial mucosa and facilitated the development of IgG1 (an isotype associated with a Th2 response) Ab production when this PAMP was co-administered intranasally with OVA in naive mice (our unpublished observations). These results suggest that KpOmpA, through its effect on BEC, may break down or block the Ag-specific tolerance, and induce a local immune response to the Ag coupled to KpOmpA according to the presence or not of this TLR ligand. Taken together, these data show that BEC not only regulate inflammatory processes (37) but also control the local immune response by its action on DC traffic and functions.

In addition to its role in the innate immune response, bronchial epithelium may link innate and acquired immunity through its dialog with DC. Moreover, the BEC/DC crosstalk may be implicated in the control of airway tolerance and, in the context of a PAMP exposure, may favor the development of the immune response. Thus, bronchial epithelium targeting represents a novel strategy in vaccination process via airway mucosa.

Acknowledgments

We thank Philippe Marquillies for helpful technical assistance and Dr. Catherine Duez for the critical reading of the manuscript.

Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

References

- Delclaux, C., and E. Azoulay. 2003. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur. Respir. J. Suppl.* 42: 10s–14s.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α : II. functional analysis. *Blood* 90: 1458–1470.
- Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106: 263–266.
- Holt, P. G., and P. A. Stumbles. 2000. Characterization of dendritic cell populations in the respiratory tract. *J. Aerosol. Med.* 13: 361–367.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767–811.
- McWilliam, A. S., S. Napoli, A. M. Marsh, F. L. Pemper, D. J. Nelson, C. L. Pimm, P. A. Stumbles, T. N. Wells, and P. G. Holt. 1996. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* 184: 2429–2432.
- Vemaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 193: 51–60.
- Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 10–16.
- Todate, A., K. Chida, T. Suda, S. Imokawa, J. Sato, K. Ide, T. Tsuchiya, N. Imai, Y. Nakamura, K. Asada, H. Hayakawa, and H. Nakamura. 2000. Increased numbers of dendritic cells in the bronchiolar tissues of diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: 148–153.
- Stumbles, P. A., D. H. Strickland, C. L. Pimm, S. F. Proksch, A. M. Marsh, A. S. McWilliam, A. Bosco, I. Tobagus, J. A. Thomas, S. Napoli, et al. 2001. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *J. Immunol.* 167: 228–234.
- Reibman, J., Y. Hsu, L. C. Chen, B. Bleck, and T. Gordon. 2003. Airway epithelial cells release MIP-3 α /CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28: 648–654.
- Pichavant, M., A. S. Charbonnier, S. Taront, A. Bricchet, B. Wallaert, J. Pesteil, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 2005. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115: 771–778.
- Pichavant, M., Y. Delneste, P. Jeannin, C. Fourneau, A. Bricchet, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 2003. Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J. Immunol.* 171: 6697–6705.
- Jeannin, P., T. Renno, L. Goetsch, I. Miconnet, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Herbault, T. Baussant, G. Magistrelli, C. Soulas, et al. 2000. OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat. Immunol.* 1: 502–509.
- Soulas, C., T. Baussant, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Barillet, G. Caron, T. Renno, J. Y. Bonnefoy, and P. Jeannin. 2000. Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages. *J. Immunol.* 165: 2335–2340.
- Haeuw, J. F., I. Raully, L. Zanna, C. Libon, C. Andreoni, T. N. Nguyen, T. Baussant, J. Y. Bonnefoy, and A. Beck. 1998. The recombinant *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein OmpA has carrier properties for conjugated antigenic peptides. *Eur. J. Biochem.* 255: 446–454.
- Raully, I., L. Goetsch, J. F. Haeuw, C. Tardieux, T. Baussant, J. Y. Bonnefoy, and N. Corvaia. 1999. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 67: 5547–5551.
- Goetsch, L., A. Gonzalez, H. Plotnicky-Gilquin, J. F. Haeuw, J. P. Aubry, A. Beck, J. Y. Bonnefoy, and N. Corvaia. 2001. Targeting of nasal mucosa-associated antigen-presenting cells *in vivo* with an outer membrane protein A derived from *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 69: 6434–6444.
- Godefroy, S., N. Corvaia, D. Schmitt, J. P. Aubry, J. Y. Bonnefoy, P. Jeannin, and M. J. Staquet. 2003. Outer membrane protein A (OmpA) activates human epidermal Langerhans cells. *Eur. J. Cell Biol.* 82: 193–200.
- Jeannin, P., G. Magistrelli, N. Herbault, L. Goetsch, S. Godefroy, P. Charbonnier, A. Gonzalez, and Y. Delneste. 2003. Outer membrane protein A renders dendritic cells and macrophages responsive to CCL21 and triggers dendritic cell migration to secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 33: 326–333.
- Gosset, P., F. Bureau, V. Angeli, M. Pichavant, C. Faveeuw, A. B. Tonnel, and F. Trottein. 2003. Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J. Immunol.* 170: 4943–4952.
- Janeway, C. A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197–216.
- Charbonnier, A. S., N. Kohrgruber, E. Kriehuber, G. Stingl, A. Rot, and D. Maurer. 1999. Macrophage inflammatory protein 3 α is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. *J. Exp. Med.* 190: 1755–1768.
- Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik, and C. Caux. 2000. Macrophage inflammatory protein 3 α is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192: 705–718.
- Suda, T., K. McCarthy, Q. Vu, J. McCormack, and E. E. Schneeberger. 1998. Dendritic cell precursors are enriched in the vascular compartment of the lung. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 728–737.
- Soloperto, M., V. L. Mattoso, A. Fasoli, and S. Mattoli. 1991. A bronchial epithelial cell-derived factor in asthma that promotes eosinophil activation and survival as GM-CSF. *Am. J. Physiol.* 260: L530–L538.
- Moller, G. M., S. E. Overbeek, C. G. Van Helden-Meeuwse, J. M. Van Haarst, E. P. Prens, P. G. Mulder, D. S. Postma, and H. C. Hoogsteden. 1996. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin. Exp. Allergy* 26: 517–524.
- Randolph, G. J., S. Beaulieu, S. Lebecque, R. M. Steinman, and W. A. Muller. 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282: 480–483.
- Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 994–1003.
- Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2: 361–367.
- Niess, J. H., S. Brand, X. Gu, L. Landsman, S. Jung, B. A. McCormick, J. M. Vyas, M. Boes, H. L. Ploegh, J. G. Fox, et al. 2005. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307: 254–258.
- Burke-Gaffney, A., and P. G. Hellewell. 1998. A CD18/ICAM-1-dependent pathway mediates eosinophil adhesion to human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19: 408–418.
- Akbari, O., G. J. Freeman, E. H. Meyer, E. A. Greenfield, T. T. Chang, A. H. Sharpe, G. Berry, R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2002. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* 8: 1024–1032.
- Eisenbarth, S. C., D. A. Piggott, J. W. Huleatt, I. Visintin, C. A. Herrick, and K. Bottomly. 2002. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J. Exp. Med.* 196: 1645–1651.
- Stumbles, P. A., J. A. Thomas, C. L. Pimm, P. T. Lee, T. J. Venaille, S. Proksch, and P. G. Holt. 1998. Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *J. Exp. Med.* 188: 2019–2031.
- Jones, H. P., L. M. Hodge, K. Fujihashi, H. Kiyono, J. R. McGhee, and J. W. Simecka. 2001. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J. Immunol.* 167: 4518–4526.
- Holgate, S. T., P. Lackie, S. Wilson, W. Roche, and D. Davies. 2000. Bronchial epithelium as a key regulator of airway allergen sensitization and remodeling in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162: S113–117.

Article II

Modulation by TLR ligands of tight and adherens junction protein expression in monocytes-derived dendritic cells: impact on their maturation.

TARONT Solenne¹, TORRES David¹, HELIOT Laurent², LASSALLE Philippe¹, GOSSET Philippe^{1*}.

¹ INSERM, U774, Lille, F-59019, France; Institut Pasteur de Lille, Lille, F-59019, France; Univ Lille II, Lille, F-59000 France

²Plateau d'Imagerie Cellulaire, Institut de Biologie de Lille, France

* To whom correspondence should be addressed.

Author E-mails :

TS : solenne_taront1980@yahoo.fr

TD : david.torres@pasteur-lille.fr

LH : laurent.heliot@ibl.fr

LP : Philippe.Lassalle@pasteur-lille.fr

GP : Philippe.Gosset@pasteur-lille.fr

Abstract

Background: Airway epithelium forms a continuous barrier linked to the formation of tight and adherens junctions (TJ and AJ). In the intestinal mucosa, dendritic cells (DC) which transiently express TJ proteins, are able to open it between intestinal epithelial cells, and then to sample pathogenic bacteria. Although DC form a sentinel network in airway epithelium, the presence of TJ and AJ between airway epithelial cells (AEC) and DC has not been showed nor the consequences of formation / dismantling of these junctions on DC function. Since pathogens deliver danger signals which activate the immune system, we initiated this study to assess the involvement of intercellular junctions in the interactions between AEC and DC in the context of pathogen-associated molecular pattern exposure.

Methods: The expression of intercellular junction proteins on monocyte-derived DC (MDDC) activated by TLR-2, -3 and -4 ligands has been studied. Moreover, the consequences of intercellular junction formation / dissociation in MDDC on their maturation have been evaluated after TLR activation.

Results: Our results showed that MDDC express the AJ proteins, E-cadherin and β -catenin and the TJ proteins, occludin and ZO-1 at steady state and TLR2 and -4 ligands increased their mRNA and protein expression. The claudin-1 and -2 are expressed at low level and are not modulated. Whereas ZO-1 is within the nucleus, E-cadherin, β -catenin, and occludin are mainly cytoplasmic when DC are cultivated alone. In contrast, these proteins are mobilized towards area of contact with AEC in coculture exposed to the TLR2 agonist. Whereas TJ did not seem to be involved, E-cadherin mobilization inhibits the maturation of DC as shown by a decrease in the CD40 and CCR7 expression and the cytokine production. As a result, E-cadherin-exposed DC have a diminished capacity to induce naive T cell proliferation.

Conclusions: Taken together, our results show that the exposure to TLR ligands enhances the expression of AJ and TJ proteins in DC and favours the formation of intercellular junctions with AEC. The formation/dismantling of AJ restrains DC activation suggesting that this mechanism might limit the impact of TLR activation in lung DC.

Keywords:

Dendritic cell, airway epithelium, Tight junction, adherens junction, E-cadherin

Introduction

Airway mucosa is continuously exposed to a broad range of antigens present in inhaled air. In order to maintain the integrity of this organ, the lung has developed different ways of defense, first mechanic (mucociliary clearance) and in a second step biologic including the innate immune response. Among immune cells, dendritic cells (DC) are professional antigen-presenting cells that constitute a surveillance network in the airway mucosa close to airway epithelial cells (AEC) (1, 2). In airway mucosa, myeloid DC form a dense network including different subpopulations of DC such as

interstitial DC and Langerhans cells (LC) (3). At steady state, AEC recruit immature DC or their precursors towards the airway mucosa where inhaled antigens are sampled (4, 5). After antigen processing, maturing DC leave their resident sites towards the thoracic lymph nodes, where they efficiently prime naive T cells (6). DC are able to discriminate self from non-self thanks to a large family of receptors so called the pattern recognition receptors that include signalling receptors (e.g. Toll-like Receptors (TLR)) and endocytic receptors including lectins and Scavenger Receptors (SR). The type of receptor involved in Ag capture will determine its processing and its presentation. Signalling and endocytic receptors cooperate to finely tune the degree of DC maturation and, by this way, impact on T cell activation and polarization.

Pulmonary epithelium forms a continuous barrier linked in large part to the formation of intercellular junctions, particularly tight junctions (7). Tight junctions were first described by Farquhar and Palade in 1963 as the most apical component of intercellular junction complex in polarized epithelia. They seal intercellular space and separate the cell into two distinct domains : the apical and the basolateral domains. They are composed of integral membrane proteins such as occludin and claudin, and cytoplasmic adaptors among the ZO protein family. Occludin was the first-discovered integral membrane protein of tight junctions (8) and is ubiquitously expressed at tight junctions (9). The claudin family consists in 20 members and is responsible for forming tight-junction strands (9). Claudins play a key role in the regulation of transepithelial resistance (10). ZO proteins interact with transmembrane tight junction proteins occludin or claudin and by this way, participate in the regulation of the permeability of epithelial barrier (11-13). Adherens junctions also participate to the cohesion of bronchial epithelium. The key membrane protein of adherens junctions in AEC, E-cadherin is the best-characterized member of the family of cadherins. Intracellularly, E-cadherin confers adhesion by binding to partners such as α - and β -catenin (14). Finally, β -catenin, the cytoplasmic adaptor in adherens junctions, plays not only a role in the cohesion of adherens junction, but also participates in Wnt signalling pathways as a nuclear factor (15, 16). Indeed, cadherin-mediated cell-cell interactions are dynamic processes, and cadherin function is tightly regulated in response to cellular context and signalling. Moreover, formation/dismantling of these junctions results in the activation of signalling pathways in epithelial cells.

In the intestinal mucosa, Rescigno *et al* showed that DC are able to open tight junctions between intestinal epithelial cells, and then to sample pathogenic bacteria. Authors showed that DC transiently express tight junction protein ZO-1, claudin-1 and occludin in response to the TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) (17). However, the mechanism by which DC sample antigen across airway mucosa is not well understood. Moreover, the consequences of tight junction and adherens junction formation / dismantling in DC on their functions are unknown.

The aim of the study was to assess the involvement of intercellular junction proteins in the

interactions between bronchial epithelial cells and dendritic cells in the context of pathogen-associated molecular pattern (PAMP) exposure. We first studied the regulation of the expression of intercellular junction proteins on monocyte-derived DC (MDDC) by TLR-2, -3 and -4 ligands. In a second step, the consequences of intercellular junction formation and/or dissociation in MDDC on their functions have been evaluated at steady state and after exposure to TLR ligands.

Our results showed that MDDC express the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin and the tight junction proteins occludin and ZO-1 at steady state. TLR ligands, and particularly TLR2 and -4 ligands modulate the expression of these proteins by increasing mRNA and protein levels. We demonstrate for the first time that E-cadherin play an important role in the maturation of DC in the time of establishment of intercellular junctions between bronchial epithelial cells and DC.

Materials and methods

Preparation of monocyte-derived dendritic cells (MDDC) and exposure

Blood monocytes were purified by positive selection over a MACS column using anti-CD14-monoclonal antibodies (mAb) conjugated microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and were differentiated into dendritic cells by standard procedures (18). Briefly, monocytes were cultivated at 1×10^6 cells/ml for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen, Paisley, UK) containing 10 ng/ml IL-4 and 25 ng/ml GM-CSF (PromoCell, Heidelberg, Germany).

At day 5, immature monocyte-derived DC were obtained as characterized by their phenotype (CD14⁺ CD11c⁺ CD1a⁺ HLA-DR^{low}) and the low level of cytokine production (data not shown).

Cells were either left untreated or were exposed for 1h, 3h, 6h or 24h to the TLR2 ligand Pam3CysK4 (10 μ g/ml), the TLR3 ligand Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) (10 μ g/ml) or the TLR4 ligand Lipopolysaccharide (055B5 serotype, LPS) (1 μ g/ml) (Invivogen, San Diego, CA) depending on the experiments. In some experiments, culture plastic was coated with rhE-cadherin (Neomarkers), goat anti-occludin and mouse anti-claudin-1 (zymed, Invitrogen) at 5 μ g/ml in PBS. After overnight incubation, wells are washed and MDDC were added in presence or not of LPS. To exclude the role of endotoxin contamination, polymyxin-B (50 U/ml) was added to the medium in unstimulated cells.

Real Time quantitative PCR

Total RNA was isolated from DC. After 1 or 3h incubation, cells were washed in sterile cold Phosphate-Buffered Saline (PBS), snap-frozen and stored at -80°C until RNA isolation by using TRIzol reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by spectrophotometry and its quality was evaluated by electrophoresis through a 0.8 % agarose gel visualized using Gelstar staining. Retro-transcription and Real-Time quantitative PCR were performed using SuperScript™ Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen,

Paisley, Scotland) according to manufacturer's instructions. In order to obtain a normalized target value, the house-keeping gene actin gene was used. Forward and reverse primers for β -catenin, E-cadherin, occludin and ZO-1 were designed as follow: β -catenin (forward 5'-AAGCTTTACACCCACCATCCC, reverse 5'-TCACGCAAAGGTGCATGATT); E-cadherin (forward 5'-CCTCGACACCCGATTCAAAGT, reverse 5'-CCCAGGCGTAGACCAAGAAAT); occludin (forward 5'-TATAAATCCACGCCGGTTCC, reverse 5'-TCAAAGTTACCACCGCTGCTG); ZO-1 (forward 5'-ATCCCAAATAAGAACAGAGC, reverse 5'-GGCGTTACATCTAATAAAGC); actin (forward 5'-TCTCACCTGAAGTACCCCA, reverse 5'-AGCCACACGCAGCTCATTGT).

Results were expressed as the mean relative gene expression expressed in folds ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) compared to unstimulated cells used as calibrator +/- SEM.

Immunodetection by Western Blotting

Cells were collected by scraping from plates, sedimentation and washing 2 times in cold PBS containing 2mM EDTA. The cell pellets were lysed on ice with cell lysis buffer (10mM Tris-HCL, 140mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% Desoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor mixture cocktail, pH=7.4) during 1h and vortexed every 10 minutes. Protein lysates were then centrifuged and pellets were removed. Protein concentration of each sample was measured using Bio-Rad Protein Assay and samples were diluted to make concentrations equal in all samples for future analyses.

Samples were diluted in sample buffer (0.5M Tris HCL, 25% SDS, 2% Bromophenol blue, 20% Glycerol, 5% β -Mercaptoethanol, pH=6.8) and boiling for 4minutes. 10 μ g total protein were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with antibodies against β -catenin (2 μ g/ml) (Santa Cruz Biotechnology) and occludin (Santa Cruz Biotechnology). Mouse anti- β -actin (1:2000) (Sigma) was used as loading control primary antibodies for all samples. Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence (ECL; Pierce, Rockford, IL). The bands were digitized by computer.

Flow cytometry

After the recovery of MDDC supernatants, cells were incubated with PBS containing 2 mM EDTA and were detached by scraping. MDDC were centrifuged and resuspended in PBS 2% FCS. Cells were labeled (30min, 4°C) with murine FITC-conjugated anti-HLA-DR, -CD1a, -CD40 and -CD209 PE-conjugated anti-CD80, -CD83, -CD206 and anti-CCR7 APC-conjugated anti-CD86 and -CD11c or mouse IgG isotype control conjugated with FITC, PE or APC (BD Pharmingen except for CD83 (Beckman Coulter) and CCR7 (R&D systems)). Cells were washed and fixed with PBS containing 1% paraformaldehyde.

To study intercellular junction protein expression, cells were labeled (30min, 4°C) with mouse anti-E-cadherin (Beckman Coulter) and anti-claudin-1 (Zymed, Invitrogen), goat anti-occludin (Santa Cruz Biotechnology), -claudin-2, -claudin-4, rabbit anti-ZO-1 () and anti- β -catenin (Santa Cruz Biotechnology) antibodies or isotype control after permeabilization. Binding of primary Ab or isotype control was detected by addition of FITC-conjugated donkey anti-mouse, PE-

conjugated donkey anti-goat IgG or APC-conjugated donkey anti-rabbit antibodies (Invitrogen). Then, cells were washed, fixed with paraformaldehyde in PBS and 10000 events were analyzed on a FACScalibur flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson). Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with specific antibody minus the isotype control MFI (Δ MFI).

Coculture of dendritic cells with bronchial epithelial cells

Cells from the bronchial epithelial cell line 16HBE14o' (a generous gift of Dr D. Gruenert, San Diego) were cultivated on the low collagen-coated face of the Transwell. The transwell inserts were cultivated until cells reach confluence (about 2 weeks) as evaluated by the measurement of the resistance across the membrane (up to 500 mA). Before the coculture, DC were stained with calcein (30min at 4°C), washed in PBS and were added at 10^6 DC/well in the higher compartment of the Transwell. Bronchial epithelial cells (BEC) were left unstimulated or stimulated with TLR2 ligand Pam3CysK4 (10 μ g/ml). Stimulation was applied in well in contact with BEC. After 24h, the medium was removed, transwells were washed in PBS and then fixed with PBS containing 1% paraformaldehyde.

Confocal microscopy

After activation of MDDC by TLR ligands, cells were cytocentrifuged on a slide and fixed with 1% paraformaldehyde. The slides as well as the membrane of the inserts were then permeabilized in PBS containing 2% human serum, 0.3% Triton X-100 (10 min at room temperature) and labelled (30min, at room temperature) with mouse anti-E-cadherin, goat anti-occludin, rabbit anti-ZO-1 and anti- β -catenin antibodies or isotype control. Binding of primary Ab or isotype control was detected by addition of PE-conjugated donkey anti-mouse, Alexa555-conjugated donkey anti-goat IgG or Alexa647-conjugated donkey or Alexa488-conjugated donkey anti-rabbit antibodies (Invitrogen). Then, cells were washed, fixed with paraformaldehyde in PBS. For MDDC, nucleus was labelled with Topro3 (Invitrogen) (1 μ g/ml) for 15 min. Imaging was done using a DM-IRE2 inverted microscope with SP2-AOBS scanhead (Leica). Acquisitions were performed using a 100X, 1.4 NA objective. The laser excitation wavelengths were selected with an AOBs, and their power was modulated by an AOTF (AOBS and AOTF are two specific acousto-optical systems). Excitation power was between 100 and 400 μ W.

Coculture of dendritic cells with clones overexpressing E-Cadherin

NIH-3T3 cells were stably transfected with E-cadherin-expressing pcDNA3 plasmid (a generous gift of Dr P. Cossart, INSERM U604, Paris, France). Transfected cells were sorted and tested for E-cadherin expression by flow cytometry before the coculture. After selection, about 90% of the transfected cells express E-cadherin (MFI: 55 ± 9). E-cadherin as well as TJ proteins are not detectable in untreated NIH-3T3 cells or in cells transfected with an empty plasmid. Clones were fixed in PBS containing 1% paraformaldéhyde, incubated in complete RPMI for at least 3h, washed and then cultivated with DC without or with TLR ligands during 24 hours. MDDC cultured alone were used as controls.

After incubation, supernatants were collected and the phenotype of mature DC was analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with specific antibody minus the isotype control MFI (Δ MFI).

In some experiments, fixed NIH-3T3 cells were labelled with an anti-E-cadherin mouse antibody (5 μ g/ml) before addition onto MDDC.

Chemokine and cytokine measurements

The concentrations of cytokines and chemokines in the culture supernatants were determined by sandwich enzyme immunoassay as described by the manufacturer, R&D systems for IL-6, CXCL8, CXCL10, and TNF- α or Diaclone (Besançon, France) for IL-12p70 and IL-10.

MDDC ability to induce naive CD4⁺ T cell proliferation and polarization.

Mature MDDC were collected at day 6 and purified before coculture with CD4⁺ naive T cells. Naive T helper cells were isolated from the CD14⁻ fraction by negative selection using the naive CD4⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). After magnetic selection, the negative fraction contained more than 95% of CD4⁺ CD45RA⁺ cells, as determined by flow cytometry (data not shown). Mature MDDC (5 x 10⁴ cells/well) were incubated with CFSE-labelled heterologous naive T cells (1x10⁶ cells/well) in 1 mL of RPMI 1640 medium supplemented with 10 % FCS during 5 days, in order to evaluate the capacity of MDDC to induce the proliferation and the cytokine production by CD4⁺ T cells. T cells were collected after 6 day incubation and resuspended at 2 x 10⁶ cells/mL in fresh medium. Restimulation was performed by addition of anti-CD3 plus anti-CD28 mAbs (2 μ g/mL) (Becton Dickinson). Cytokine synthesis was measured after 6h incubation by intracellular flow cytometry with APC-labelled anti-IL-4, -IL-10 and -IFN- γ mAb for CFSE-labelled heterologous T cells identified with PE-Cy5-anti-CD4 mAb (all from Becton Dickinson). The percentage of CD4⁺ proliferating cells was evaluated by the measurement of CFSE fluorescence as well as the intensity of the cytokine production.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm s.e.m. The statistical significance of differences between experimental groups was calculated by ANOVA1 with a Bonferroni post test (GraphPad Prism 4 Software, San Diego, USA). Results with a *P* value of less than 0.05 were considered significant.

Results

Modulation by TLR ligands of mRNA expression for the junction proteins E-cadherin, β -catenin, ZO-1, occludin and claudins in MDDC

We first determined in MDDC whether TLR2, -3, -4 ligands modify the mRNA expression for intercellular junction proteins using quantitative PCR. Preliminary experiments were performed to define the profile of expression for these proteins. Since some modulation were observed at 1 and 3h but not at 6 and 24h, mRNA expression was analyzed at these time points (1 and 3h) for the following experiments (data not shown).

TLR2 ligand transiently increased the mRNA level of β -catenin, ZO-1 and Occludin after 1h stimulation ($p<0.05$) (Figure 1). TLR3 ligand slightly increased the mRNA level of β -catenin and Occludin ($p<0.05$). TLR4 ligand markedly increased mRNA level of ZO-1 after 1 and 3h stimulation and at a lower intensity the mRNA level of β -Catenin. Claudin-1 was strongly increased at 3h by TLR2 and TLR4 activation ($p<0.05$) (10 times) and at a lower level with TLR3 ligand (data not shown). In contrast, claudin-2 and -4 were not modulated.

Taken together, the results showed that the exposition to TLR ligands increased transiently and very quickly the mRNA level of adherens and tight junction proteins in MDDC.

Modulation by TLR ligands of protein expression for the junction proteins E-cadherin, β -catenin, ZO-1, occludin and claudin-1 in MDDC

Before we studied the regulation of protein expression for junction proteins, we determined whether the TLR2, 3 and 4 agonists induced the maturation of MDDC by measuring the expression of the 3 markers HLA-DR, CD83 and CD86 on MDDC. As expected, the 3 TLR ligands induced MDDC maturation, with a strong effect of TLR2 ligand on the expression of the 3 markers from 6h stimulation (Figure 2). TLR3 ligand increased the expression of HLA-DR after 24h stimulation but had a weak effect on CD83 and CD86 expression. Finally TLR4 increased the expression of the 3 markers after 6 and 24h stimulation.

We determined the effect of these stimuli on junction protein expression at a protein level using flow cytometry. First, we analyzed the membrane expression of intercellular junction proteins and we did not detect a significant binding of the antibodies in the different conditions of stimulation (data not shown). However, after permeabilization, TLR2 ligand increased the protein expression of E-cadherin after 6h stimulation, β -catenin, ZO-1 and occludin after 6 and 24h stimulation ($p<0.05$) (figure 3A). TLR4 ligand slightly increased the expression of occludin at 6h ($p<0.05$) and of ZO-1 and β -catenin after 24h stimulation. Similarly, TLR3 ligand have also a weak effect on E-cadherin, ZO-1 ($p=NS$) and occludin ($p<0.05$) proteins.

To confirm the specificity of the Ab binding, β -catenin protein expression was analyzed using western blotting. TLR2, -3 and -4 ligands increased β -catenin protein expression after 24h stimulation ($p<0.05$) (Figure 3B). The band quantification showed that TLR2 ligand augmented β -catenin protein expression after 24h stimulation whereas TLR3 and -4 ligands increased its expression at both 6h and 24h stimulation. Similar results were obtained for occludin and ZO-1 (data not shown).

Taken together, the results showed that TLR ligands, and particularly TLR2 and -4 ligands increased the protein expression of E-cadherin, β -catenin, ZO-1 and occludin in dendritic cells.

Localization of intercellular junction proteins in MDDC and in BEC/MDDC cocultures

The localization of the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin, and the tight junction proteins ZO-1 and occludin has been studied in TLR ligand-exposed MDDC using confocal microscopy. After 24h, MDDC express adherens and tight junction proteins at steady state (figure 4). The four proteins have an

intracellular localization even a small fraction of these proteins was localized at the membrane. Surprisingly, ZO-1 was observed mainly in the nucleus of unstimulated and stimulated cells and the level of this protein is not obviously modulated whatever the stimulation. Occludin, E-cadherin and β -catenin are poorly expressed at steady state but are markedly increased by TLR2 and -4 ligand stimulation. TLR3 activation weakly amplified their expression. Occludin is preferentially localized in the perinuclear area. After TLR activation, the binding of E-cadherin and β -catenin was more diffused within the cells and a small fraction of these proteins were colocalized at the membrane. After 6h activation, the same trend of variation was observed in TLR ligand-activated DC although the differences were weaker.

We then studied in TLR2 ligand-exposed BEC/MDDC cocultures the localization of the adherens junction proteins E-cadherin and β -catenin, and the tight junction protein claudin-1 and ZO-1 using confocal microscopy (Figure 5). The 4 proteins studied are localized at BEC membrane confirming the polarization of the epithelium layer. The exposition of BEC to TLR2 ligand seems to increase the expression of E-cadherin, β -catenin, claudin-1 and ZO-1. At steady state, a very low number of DC migrated into the epithelium, whereas BEC stimulation with TLR2 ligand increased the migration of DC into bronchial epithelium. The DC that have migrated between BEC express E-cadherin, β -catenin and ZO-1 at the membrane, and these proteins are colocalized with intercellular junction proteins expressed on BEC.

Taken together, these results showed that intercellular junction proteins have mainly an intracellular localization in MDDC cultured alone. TLR ligands increase the level of protein expression for occludin, β -catenin and E-cadherin, whereas ZO-1 was not clearly modulated whatever the stimulation. In BEC/DC coculture, our data showed that after TLR2 exposure, DC migrate into bronchial epithelial layer and express adherens and tight junction proteins at the cell contact with BEC.

Effect of the formation of intercellular junction on DC maturation

In order to study the effect of the setting-up of intercellular junctions between DC and BEC, a first approach is realized by coating plastic dishes with recombinant human E-cadherin or specific anti-claudin -1 or anti-occludin antibodies or isotype control IgG. MDDC were added in these wells and the effect on cell maturation was evaluated after 24h incubation. The culture of MDDC in rh-E-cadherin coating plates increased the expression of HLA-DR, CD80 and CD86 to a level close to that obtained with LPS (data not shown). In contrast, the coating with anti-TJ proteins did not affect the phenotype or the cytokine production by unstimulated and TLR4-activated MDDC (data not shown)

To confirm the role of E-cadherin, we next tested the impact of the coculture between MDDC and clones stably transfected with E-cadherin on dendritic cell maturation (Fig 6). MDDC were left unstimulated or were activated with TLR-2, -3 and -4 ligands. As expected, the expression of endocytic receptors (CD206 and CD209) and CD1a, a molecule implicated in Ag presentation was significantly decreased by TLR activation. In contrast, the expression of costimulatory

molecules (CD40, CD80 and CD86), the MHC class II molecule HLA-DR, the molecule associated with the MHC, CD83 and the chemokine receptor CCR7 was upregulated with the TLR ligands, LPS being the most potent stimulus.

Whatever the condition of stimulation, the coculture of MDDC with NIH-3T3 cells expressing E-cadherin did not affect the expression of CD1a, CD206 and CD209 as compared with control NIH3T3 cells (Fig 6). For the costimulatory molecule, the level of CD40 is moderately decreased in LPS- and TLR2 ligand-stimulated MDDC by the treatment with E-cadherin clones in comparison with NIH3T3 cells ($p < 0.05$). In contrast, CD80 and CD86 were not modulated. The levels of HLA-DR and CD83 were not modified by treatment with the clones. In contrast, CCR7 was significantly reduced by the coculture with E-cadherin clones as compared with NIH-3T3 ($p < 0.05$ for TLR2 and TLR4 ligands). To confirm the specificity of the effect, we pretreated the clones with anti-E-cadherin mAb for 30 min and then MDDC were added. The addition of the antibody neutralized about 70% of the effect of E-cadherin (data not shown). We also defined if the preincubation with NIH-3T3 is also required to obtain a significant effect. Although we obtained the same trend when the activators were added simultaneously, the effect of E-cadherin clones was the highest after 30 min preincubation before the addition of TLR ligands (data not shown).

In parallel with the study of cell phenotype, we also analyzed the production of immuno-regulatory cytokines and chemokines (Figure 7). As expected, stimulation with TLR ligands increased the secretion of IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , CXCL8 and CXCL10. The production by stimulated MDDC of immunoregulatory cytokines IL-6, -10 and IL-12 were strongly decreased by the treatment with E-cadherin clones ($p < 0.05$). In contrast, the production of CXCL10 was not affected. For TNF- α and CXCL8, we surprisingly observed a significant inhibition of the secretion induced only by the TLR3 ligand ($p < 0.05$) which is potentialized by the control NIH3T3 cells. As reported for the cell phenotype, the effect of E-cadherin clones was blocked by addition of anti-E-cadherin mAb (about 65% inhibition) and was maximal after 30 min preincubation with the clones (data not shown).

Taken together, the coculture of MDDC with E-cadherin expressing NIH3T3 significantly reduced CCR7 and CD40 expression whereas it did not modify the expression of HLA-DR and the other costimulatory molecules. The production by stimulated MDDC of immunoregulatory cytokines IL-6, IL -10 and IL-12 were strongly decreased by the treatment with E-cadherin clones.

Impact of adherens junction formation on the DC capacity to activate naive T cells

Mature MDDC were cocultured with CFSE-labeled heterologous naive T cells. After TCR restimulation, T cell proliferation was measured by CFSE fluorescence intensity. As shown in fig 8, MDDC treatment with E-cadherin expressing clones have a limited ability to induce naive T cell proliferation. Both a trend towards a reduced percentage of proliferating T cells (fig 8A) as well as a higher fluorescence intensity (fig 8B; $p < 0.05$ in presence of TLR ligands) reflecting a lower number of proliferation cycles was detected in T

cells incubated with MDDC activated with E-cadherin clones. This effect on T cell proliferation was only observed in TLR-stimulated MDDC. In contrast, no significant difference was detected in the percentage and the Δ MFI of T cells expressing IL-4, IL-10 and IFN- γ (data not shown) suggesting that treatment with E-cadherin clones did not affect the DC ability to polarize CD4⁺ T cells.

Discussion

DC act as sentinels in airway mucosa and this requires close interactions with AEC. This dialog implicates the exchange of several messages induced by receptor ligand binding. In a previous work, we showed that ICAM-1 expressed by AEC modulates the differentiation / maturation of MDDC precursors in the context of exposure to a TLR2 ligand (19). In this work, we analyzed the role of intercellular junction proteins in the dialog between AEC and DC. For this, we first studied the modulation by TLR ligands of the expression of adherens and tight junction proteins in DC. We showed that TLR2 ligand most efficiently modulates the expression of adherens and tight junction proteins. Concerning TLR signaling pathways, it is described in the literature that TLR2 and TLR4 recruit MyD88 and TLR3 recruits the adaptor protein TRIF. TLR4 can also signal via TRIF (20). Since TLR2 ligand has most efficiently modulated E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1, we can suspect that the modulation of TJ and AJ gene expression are essentially dependent on MyD88 pathway.

In our study, we showed that intercellular junction proteins are not expressed at membrane when DC are cultivated alone. Indeed, flow cytometry on non permeabilized cells did not revealed the detectable presence of these proteins on the membrane whereas we can detect them after intra-cellular labelling. Nevertheless, confocal microscopy analysis revealed that a small part of E-cadherin and β -catenin are colocalized at the membrane whereas tight junction proteins are intracellular. The discrepancy between results obtained by confocal microscopy and flow cytometry analysis might be explained by the fact that DC are dissociated before flow cytometry (with EDTA) and not for the microscopy. Indeed, E-cadherin homotypic binding is Ca²⁺ dependent. DC matured by different stimuli such as LPS aggregate in homotypic cell clusters dependant on MHC class II signaling (21). It is not possible to assert that the membrane localization of adherens junctions is close to intercellular contact area in MDDC cultures, however, we cannot exclude it. So, we can suspect that intercellular contacts are probably responsible for the localization of E-cadherin and β -catenin at the membrane although the exact mechanism remains to be determined.

When DC are cocultured with BEC, we showed that both adherens and tight junction proteins are expressed on DC membrane and are colocalized with BEC junction proteins. So we can suspect that epithelial barrier integrity is conserved. These results are in agreement with two studies showing that DC are able to sample pathogenic bacteria or particles by sending dendrites between intestinal or bronchial epithelial cells respectively without disturbing the integrity of the epithelial barrier (17, 22). This suggests that a signal or a cosignal present in BEC/DC coculture induces membrane localization of tight junction proteins in DC whereas it is lacking in DC culture. The role in the modulation of TJ and AJ proteins of ICAM-1 which activates DC in our

coculture model is unlikely since DC also express this adhesion protein. Nectins could be involved in the membrane localization of junction protein, since these proteins play a key role in the formation of adherens and tight junctions. The interaction of nectins between two adjacent cells enhances the recruitment of adherens and tight junction complexes (10).

In this study, we showed that the recruitment of DC in bronchial epithelium is more important in the context of TLR2 ligand, exposure than in unstimulated condition. This is in agreement with our previous study where we showed that bronchial epithelial cells exposed to KpOmpA, another TLR2 ligand, recruit DC precursors in a mechanism dependant on CCL5 and CXCL10 secretion and induced accelerated DC precursor differentiation and maturation (19). Although ICAM-1 is involved in this process, we hypothesized that other membrane proteins are able to modulate DC functions. Due to their role in the epithelial barrier and as signalling molecules, intercellular junction proteins could be involved. In order to study the consequences of junction formation on DC maturation, we tested the effect of a coating with antibodies anti-claudin-1, anti-occludin and the recombinant protein E-cadherin. The coating with the antibodies has no effect on DC maturation, whereas human recombinant E-cadherin activates DC.

To confirm the role of E-cadherin, the effect of the coculture of DC with clones expressing high level of membrane E-cadherin was evaluated. E-cadherin has a poor effect on DC phenotype. In our hands, only CCR7 and CD40 expression is significantly decreased after TLR activation. A study on Langerhans cells (LC) showed that E-cadherin engagement on immature LC specifically inhibits the acquisition of mature features in presence of cytokines, namely CD83 and CD86 expression (23). More specifically, we also demonstrated that the production of the immuno-regulatory cytokines IL-6, IL-10 and IL-12p70 induced by TLR2, -3 and -4 ligands was decreased after E-cadherin mobilization. This can explain the lower intensity of T cell proliferation observed in MLR. The data from Riedl *et al* and ours suggest that E-cadherin is involved in DC function, a mechanism which allows in epithelial cell to limit their maturation in the context of PAMP exposure. As underlined previously, β -catenin is an important signalling molecule which can reach the nucleus and induces genes that promote cell migration and regulate cell proliferation. Interestingly, some studies have shown a direct association between free cytoplasmic activated β -catenin and NF- κ B in human colon cancer cells. These cells have cytoplasmic activated β -catenin that can physically form complexes with NF- κ B, and consequently inhibits NF- κ B-dependant gene expression (24). Sun *et al* showed that in the context of Salmonella intestinal colonization, the bacteria induces the association of β -Catenin and NF- κ B, inhibiting the NF- κ B-dependant gene expression (25). Solanas *et al* showed that E-cadherin plays also an important role in these interactions (26). E-cadherin is not only able to directly interact with NF- κ B and β -catenin, but also to regulate their transcription activity. These data might explain the inhibition of gene expression such as IL-6, IL-10 and IL-12 which are at least in part NF- κ B-dependent. Moreover, MDDC exposed to E-cadherin clones have a decreased ability to induce CD4+ T cell proliferation whereas their polarization was not significantly affected. Since E-cadherin mobilization in

MDDC had a weak effect on the expression of costimulatory molecules (CD80 and CD86 being untouched), we can suspect that the action on T cell proliferation is due to the modulation of cytokine production such as IL-6, IL-10 and IL-12.

Taken together, our results show that the DC exposure to pathogen-associated molecular patterns such as TLR ligands increases the expression of adherens and tight junction proteins. These proteins, essentially cytoplasmic when DC are cultivated alone, are mobilized towards cytoplasmic membrane in the context of the coculture with BEC and following exposure to PAMP. In addition, in these conditions of stimulation, formation/dismantling of adherens junctions restrains DC activation. The impact of this mechanism remains to be determined in a physiologic context.

Legends

Figure 1 : Modulation by TLR ligands of mRNA expression of the junction proteins E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1 in MDDC

MDDC were activated with TLR2, -3 and -4 ligands, Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS respectively during 1h and 3h. MDDC were harvested for mRNA isolation followed by measurement of E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1 levels by quantitative RT-PCR. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in medium alone.

Figure 2 : Modulation of MDDC maturation : effect of TLR ligands

MDDC were cultivated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 6h and 24h. MDDC were labeled for HLA-DR, CD83 and CD86 and were analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments.

Figure 3 : Modulation by TLR ligands of protein expression of the junction proteins E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1 in MDDC

A. MDDC were cultivated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 6h and 24h. MDDC were labeled for E-cadherin, β -catenin, occludin and ZO-1, and analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in medium alone.

B. MDDC were cultivated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 6h and 24h. Whole cell homogenates were analyzed for β -catenin by western blotting. β -actin was used as loading control primary antibodies for all samples. The bottom panel shows quantitative measurement of the intensity of β -catenin bands. Data are expressed as the mean \pm SEM from 4 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in medium alone.

Figure 4 : Localization of the junction proteins E-cadherin, β -Catenin, ZO-1 and occludin in MDDC

MDDC were left unstimulated or stimulated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 24h. MDDC were labelled for ZO-1 (green), occludin (red), E-cadherin (red), β -catenin

(green), and analyzed by confocal microscopy. Nucleus were labelled with Topro3 (blue).

Figure 5 : Localization of the junction proteins E-Cadherin, β -Catenin, ZO-1 and Claudin-1 in MDDC/BEC cocultures

Polarized BEC were left unstimulated or stimulated with TLR2 ligands Pam₃CysK₄ and cocultured with calcein-labelled MDDC (green) in the basolateral compartment during 24h. Transwells were labelled for E-cadherin (red), β -catenin (blue), claudin-1 (red), ZO-1 (blue) and analyzed by confocal microscopy.

Figure 6 : Effect of the coculture with NIH3T3 cells overexpressing E-cadherin on MDDC phenotype

MDDC were either cultivated alone or cocultured with NIH3T3 overexpressing E-cadherin in the absence or the presence of TLR2, -3 and -4 ligand respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 24h. MDDC were labeled for HLA-DR, CD83 and CD86 and were analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean \pm SEM from 6 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in presence of NIH3T3 cells.

Figure 7 : Effect of the coculture with NIH3T3 cells overexpressing E-cadherin on cytokine production by MDDC

MDDC were either cultivated alone or cocultured with NIH3T3 cells overexpressing E-Cadherin in the absence or the presence of TLR2, -3 and -4 ligand respectively Pam₃CysK₄, poly(I:C) and LPS during 24h. Concentrations of IL-6, IL-10, IL-12, CXCL8, CXCL10 and TNF- α were measured by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SEM from 6 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in presence of NIH3T3 cells.

Figure 8 : Impact of MDDC coculture with NIH3T3 cells expressing E-cadherin on naive T cells proliferation

After activation with TLR ligands in the presence or not of NIH3T3 clones, MDDC were cocultured with CFSE-labeled heterologous naive CD4⁺ T cells. After TCR restimulation, T cell proliferation was measured by CFSE fluorescence intensity. Data are expressed as the percentage of proliferating CD4⁺ cells (partA) and the Δ MFI of this cell population (partB). This is the mean \pm SEM of 4 independent experiments. * : p<0.05 versus MDDC in presence of NIH3T3 cells.

1. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.
2. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263-266.
3. Holt, P. G., and P. A. Stumbles. 2000. Characterization of dendritic cell

4. McWilliam, A. S., S. Napoli, A. M. Marsh, F. L. Pemper, D. J. Nelson, C. L. Pimm, P. A. Stumbles, T. N. Wells, and P. G. Holt. 1996. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med* 184:2429-2432.
5. Pichavant, M., A. S. Charbonnier, S. Taront, A. Bricchet, B. Wallaert, J. Pestel, A. B. Tonnel, and P. Gosset. 2005. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 115:771-778.
6. Vermaelen, K. Y., I. Carro-Muino, B. N. Lambrecht, and R. A. Pauwels. 2001. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193:51-60.
7. Schneeberger, E. E., and R. D. Lynch. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262:L647-661.
8. Furuse, M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita, and S. Tsukita. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123:1777-1788.
9. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:285-293.
10. Miyoshi, J., and Y. Takai. 2005. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev* 57:815-855.
11. Gumbiner, B., T. Lowenkopf, and D. Apatira. 1991. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3460-3464.
12. Haskins, J., L. Gu, E. S. Wittchen, J. Hibbard, and B. R. Stevenson. 1998. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141:199-208.
13. Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103:755-766.
14. Angst, B. D., C. Marozzi, and A. I. Magee. 2001. The cadherin superfamily:

- diversity in form and function. *J Cell Sci* 114:629-641.
15. Bierkamp, C., H. Schwarz, O. Huber, and R. Kemler. 1999. Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development* 126:371-381.
 16. Huelsken, J., R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, and W. Birchmeier. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105:533-545.
 17. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
 18. Gosset, P., F. Bureau, V. Angeli, M. Pichavant, C. Faveeuw, A. B. Tonnel, and F. Trottein. 2003. Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells. *J Immunol* 170:4943-4952.
 19. Pichavant, M., S. Taront, P. Jeannin, L. Breuilh, A. S. Charbonnier, C. Spriet, C. Fourneau, N. Corvaia, L. Heliot, A. Briche, A. B. Tonnel, Y. Delneste, and P. Gosset. 2006. Impact of bronchial epithelium on dendritic cell migration and function: modulation by the bacterial motif KpOmpA. *J Immunol* 177:5912-5919.
 20. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
 21. Lehner, M., J. Stockl, O. Majdic, W. Knapp, K. Huttner, T. Felzmann, and W. Holter. 2003. MHC class II antigen signaling induces homotypic and heterotypic cluster formation of human mature monocyte derived dendritic cells in the absence of cell death. *Hum Immunol* 64:762-770.
 22. Blank, F., B. Rothen-Rutishauser, and P. Gehr. 2007. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol* 36:669-677.
 23. Riedl, E., J. Stockl, O. Majdic, C. Scheinecker, W. Knapp, and H. Strobl. 2000. Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood* 96:4276-4284.
 24. Deng, J., S. A. Miller, H. Y. Wang, W. Xia, Y. Wen, B. P. Zhou, Y. Li, S. Y. Lin, and M. C. Hung. 2002. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2:323-334.
 25. Sun, J., M. E. Hobert, Y. Duan, A. S. Rao, T. C. He, E. B. Chang, and J. L. Madara. 2005. Crosstalk between NF-kappaB and beta-catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G129-137.
 26. Solanas, G., M. Porta-de-la-Riva, C. Agusti, D. Casagolda, F. Sanchez-Aguilera, M. J. Larriba, F. Pons, S. Peiro, M. Escriva, A. Munoz, M. Dunach, A. G. de Herreros, and J. Baulida. 2008. E-cadherin controls {beta}-catenin and NF-{\kappa}B transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci* 121:2224-2234.

Research

Open Access

Implication of scavenger receptors in the interactions between diesel exhaust particles and immature or mature dendritic cells

Solenne Taront¹, Audrey Dieudonné¹, Simon Blanchard², Pascale Jeannin^{2,3}, Philippe Lassalle¹, Yves Delneste^{2,3} and Philippe Gosset*¹

Address: ¹INSERM, U774, Lille, F-59019, France; Institut Pasteur de Lille, Lille, F-59019, France; Univ Lille II, Lille, F-59000 France, ²INSERM U892, Centre de Recherche sur le Cancer Nantes Angers, Angers F-49933, France; University of Angers, Angers, France and ³Immunology and Allergy department, University Hospital of Angers, Angers, 49933, France

Email: Solenne Taront - solenne_taront1980@yahoo.fr; Audrey Dieudonné - aud_dieudonne@yahoo.fr; Simon Blanchard - simon.blanchard@univ-angers.fr; Pascale Jeannin - pascale.jeannin@univ-angers.fr; Philippe Lassalle - Philippe.Lassalle@pasteur-lille.fr; Yves Delneste - yves.delneste@univ-angers.fr; Philippe Gosset* - Philippe.Gosset@pasteur-lille.fr

* Corresponding author

Published: 13 March 2009

Received: 14 August 2008

Particle and Fibre Toxicology 2009, 6:9 doi:10.1186/1743-8977-6-9

Accepted: 13 March 2009

This article is available from: <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/6/1/9>

© 2009 Taront et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: The exposure to pollutants such as diesel exhaust particles (DEP) is associated with an increased incidence of respiratory diseases. However, the mechanisms by which DEP have an effect on human health are not completely understood. In addition to their action on macrophages and airway epithelial cells, DEP also modulate the functions of dendritic cells (DC). These professional antigen-presenting cells are able to discriminate unmodified self from non-self thanks to pattern recognition receptors such as the Toll like Receptors (TLR) and Scavenger Receptors (SR). SR were originally identified by their ability to bind and internalize modified lipoproteins and microorganisms but also particles and TLR agonists. In this study, we assessed the implication of SR in the effects of DEP associated or not with TLR agonists on monocyte-derived DC (MDDC). For this, we studied the regulation of CD36, CXCL16, LOX-1, SR-A1 and SR-B1 expression on MDDC treated with DEP associated or not with TLR2, 3 and 4 ligands. Then, the capacity of SR ligands (dextran sulfate and maleylated-ovalbumin) to block the effects of DEP on the function of lipopolysaccharide (LPS)-activated DC has been evaluated.

Results: Our data demonstrate that TLR2 agonists mainly augmented CXCL16, LOX-1 and SR-B1 expression whereas DEP alone had only a weak effect. Interestingly, DEP modulated the action of TLR2 and TLR4 ligands on the expression of LOX-1 and SR-B1. Pretreatment with the SR ligand maleylated-ovalbumin but not dextran sulfate inhibited the endocytosis of DEP by MDDC. Moreover, this SR ligand blocked the effect by DEP at low dose (1 µg/ml) on MDDC phenotype (a decrease of CD86 and HLA-DR expression) and on the secretion of CXCL10, IL-12 and TNF-α. In contrast, the decrease of IL-12 and CXCL10 secretion and the generation of oxygen metabolite induced by DEP at 10 µg/ml was not affected by SR ligands

Conclusion: Our results show for the first time that the modulation of DC functions by DEP implicates SR. TLR agonists upregulated SR expression in contrast to DEP. Interfering with the expression and/or the function of SR might be one way to limit the impact of DEP on lung immune response.

Background

Airway mucosa represents the first line of defence against invading airborne pathogens and particulate matters. A high level of airborne particulate matters within the inspired air is associated with an increased incidence of respiratory diseases like allergic asthma and rhinitis [1]. Among these pollutants, road traffic and particularly the diesel cars represent a major source of particulate matters in urban area. Exposure to diesel exhaust particles (DEP) is associated with exacerbations of asthma, chronic obstructive pulmonary disease and allergic rhinitis [2-4].

DEP exert immunoregulatory functions through their first action on resident cells in the lung including macrophages, airway epithelial cells, and dendritic cells (DC). DC has been shown as playing a key role in the control of the lung immune response. These effects induced by DEP are probably responsible for its adjuvant activity that promotes pro-allergic sensitization to common environmental allergens [5], exacerbation of existing airway diseases [6,7], and increased susceptibility to respiratory virus infections like influenza [8] or RSV infections [9]. Regarding the modulation of DC functions, DEP do not induce their maturation but rather slightly modulate the response to potent maturation agents such as lipopolysaccharide (LPS), a ligand of Toll-Like Receptor (TLR)4 [10,11]. This effect involves the generation of reactive oxygen species (ROS) and the inhibition of NF- κ B activation [12]. However, the early mechanisms by which DEP affect DC functions are not completely understood.

Whereas alveolar macrophages mainly reside in the alveolar region of the lung, immature myeloid DC (mDC) constitute a dense network in close proximity to airway epithelial cells [13]. Due to their role in the lung immune response, mDC are also determinant in the induction and the control of allergic asthma [14]. DC are professional antigen-presenting cells that are essential for initiating adaptive immune responses. They develop from bone marrow-derived CD34⁺ precursor cells that travel in the bloodstream to secondary lymphoid tissues and mainly to the airway and gut mucosa. At a steady state and after exposure to danger signals, airway epithelial cells recruit immature DC or their precursors to sample inhaled antigens [15,16]. After antigen processing, maturing DC leave their resident sites towards the thoracic lymph nodes, where they efficiently prime naive T cells [17]. The T cell polarizing signals delivered by DC which are defined by the degree of cell maturation, determine the issue of the T cell response and the potential development of effector or suppressor T cells.

DC are able to discriminate unmodified self from non-self and altered/modified self thanks to a large family of receptors so called the pattern recognition receptors that

include signalling receptors (e.g. Toll like Receptors (TLR)) and endocytic receptors including Scavenger Receptors (SR) [18,19]. The type of receptor involved in Ag capture will determine its processing and the issue of Ag presentation. Signalling and endocytic receptors cooperate to finely tune the degree of DC maturation and, by this way, to impact on T cell activation and polarization.

SR were originally identified by their ability to bind and internalize modified lipoproteins [18]. SR not only bind modified self such as oxidized LDL but also non self (microbes). In addition to their role in atherosclerosis, SR play critical roles in tissue homeostasis and innate immunity, e.g. by inducing apoptotic cell clearance. Different cell types express SR, such as endothelial cells, macrophages and DC. In comparison with macrophages, DC express a specific profile of SR belonging to different classes including SR-A1, MARCO (class A), SR-B1/CLA-1 and CD36 (class B), LOX-1 and CXCL-16 (also named SR-PSOX) (class D and E, respectively) [20]. The SR LOX-1, also known as OLR1 (oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1) has also a C-type lectin-like domain (CTLD) of the type found in natural killer cell receptors (NKR). CXCL16 also possesses a functional CXC chemokine domain active on T cells in addition to the mucin-like domain involved in the SR function. Although binding of DEP to alveolar macrophages was not inhibited by polyanionic ligand of SR [21], some SR such as MARCO are implicated in inert particle clearance [22].

These data suggest the implication of SR in the modulation of DC functions by DEP. Our aim is to demonstrate the involvement of SR in this process and the relationship with the activation by TLR ligands. Indeed TLR4 agonist is frequently associated with airborne particles [23]. In this work we first studied the effect of DEP on the SR expression in immature and mature DC, and second, the modulation by SR ligands of DEP uptake and effect. This role was evaluated in the context of an exposure to DEP alone or in association with TLR4 ligand. Our data demonstrate that DEP modulate the expression of some SR in immature and mature DC. Pretreatment with SR ligands allows to block some effects of DEP on cytokine production and costimulatory molecule expression by DC, at least in part through the modulation of DEP uptake. Taken together, our results show for the first time that the modulation of DC functions by DEP implicates the mobilization of SR.

Results

Modulation of mRNA expression of the SR CD36, CXCL16, LOX-1, SR-A1 and SR-B1/CLA-1 by DEP and TLR ligands

We first determined whether DEP alone or in costimulation with TLR2 (Pam3CSK4 (10 μ g/ml)), -3 (Polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C))) (10 μ g/ml), -4

(Lipopolysaccharide (LPS)) (1 µg/ml) ligands, modify the SR CD36, CXCL16, LOX-1, SR-A1 and SR-B1 mRNA expression in monocyte-derived DC (MDDC) using quantitative RT-PCR. Preliminary experiments showed that the optimal time of mRNA expression were 1 and 3 h stimulation (data not shown). DEP did not markedly increase the mRNA level of SR although a weak effect on CD36 was observed after 1 h stimulation ($p < 0.05$) (Fig 1A). The TLR2 ligand significantly increased the mRNA level of CXCL16 ($p < 0.001$) and SR-B1 ($p < 0.001$), after 1 h stimulation, and LOX-1 after 1 and 3 h stimulation (Fig 1A and 1B) ($p < 0.05$). TLR3 agonist slightly enhanced the mRNA level of CD36 ($p < 0.05$) after 1 h stimulation. TLR4 ligand significantly increased the mRNA expression of CD36 after 1 h stimulation ($p < 0.001$), and LOX-1 after 3 h stimulation. Expression of SR-A1 mRNA was not modulated by TLR agonists after 1 and 3 h stimulation in DC (data not shown). However, at 8 h activation, the TLR2 and TLR4 agonists significantly decreased its expression ($p < 0.05$, Fig 2A) whereas the poly(I:C) had no activity.

Activation by DEP combined with TLR ligands resulted in the inhibition of TLR2 ligand-induced SR-B1 expression ($p < 0.05$), and TLR4 ligand-induced CD36 expression (p

< 0.05) after 1 h stimulation. In contrast, DEP enhanced at 3 h the effect of TLR2 ($p < 0.05$) and TLR4 ligands on LOX-1. Exposure to DEP did not affect the expression of SR-A1 even in the presence of TLR agonists (data not shown).

Taken together, the results showed that DEP alone had a weak effect on SR expression in comparison with that of the TLR ligands. However, DEP modulated some of the stimulatory properties of TLR agonists.

Modulation of protein expression for the CD36, CXCL16, LOX-1, SR-A1 and SR-B1/CLA-1 by DEP and TLR ligands

We next determined by flow cytometry the effect of these stimuli on SR membrane expression in MDDC activated during 6 and 24 h. At the opposite of the mRNA expression, DEP alone significantly decreased after 6 h stimulation the expression of CD36 ($p < 0.05$) and SR-B1 ($p = \text{NS}$) whereas it did not affect the level of CXCL16 and LOX-1 (Fig 3A and 3C). TLR2 ligand significantly increased the expression of LOX-1 after 6 h stimulation ($p < 0.05$) and CXCL16 and SR-B1 after 24 h stimulation ($p < 0.05$) whereas it significantly decreased the expression of CD36 after 24 h stimulation ($p < 0.05$) (Fig 3A–D). The activation by TLR3 agonist only tended to increase

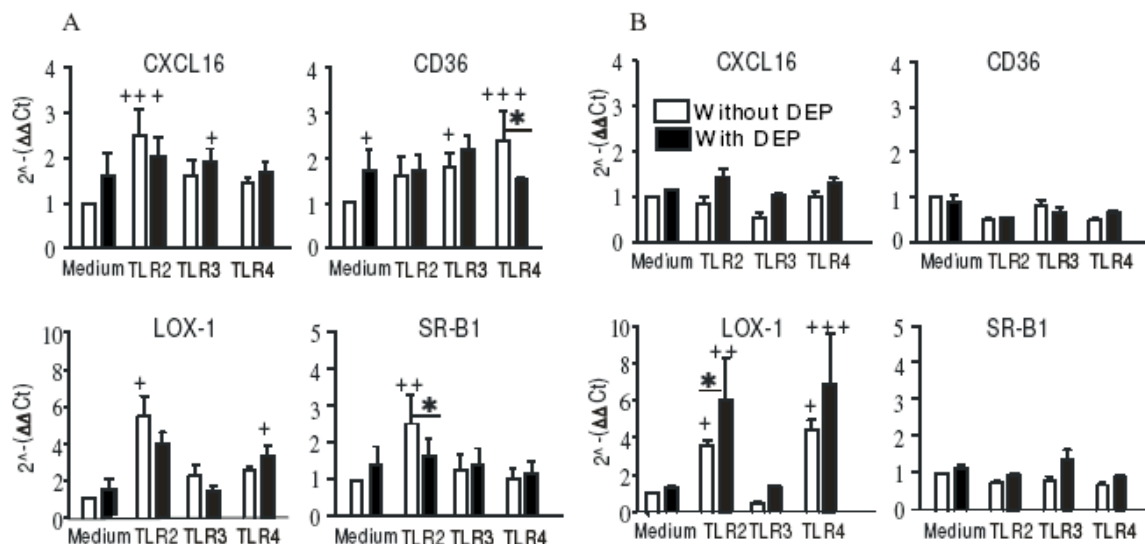


Figure 1

DEP and PAMP modulate mRNA expression of Scavenger Receptors in MDDC. MDDC were maintained in medium alone or activated with TLR2, -3 and -4 ligands (Pam₃CSK₄ (10 µg/ml), poly(I:C) (10 µg/ml) and LPS (1 µg/ml) respectively), associated or not with DEP (10 µg/ml) during 1 h (part A) and 3 h (part B). MDDC were harvested for mRNA isolation followed by measurement of CD36, CXCL16, LOX-1 and SR-B1 levels by quantitative RT-PCR. Results were expressed as the relative gene expression calculated for each experiment in folds ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) compared to unstimulated cells used as calibrator. Data reported the mean \pm SEM from 4 independent experiments. +: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$; +++: $p < 0.001$ compared with cells in medium alone. *: $p < 0,05$ compared with TLR-treated cells.

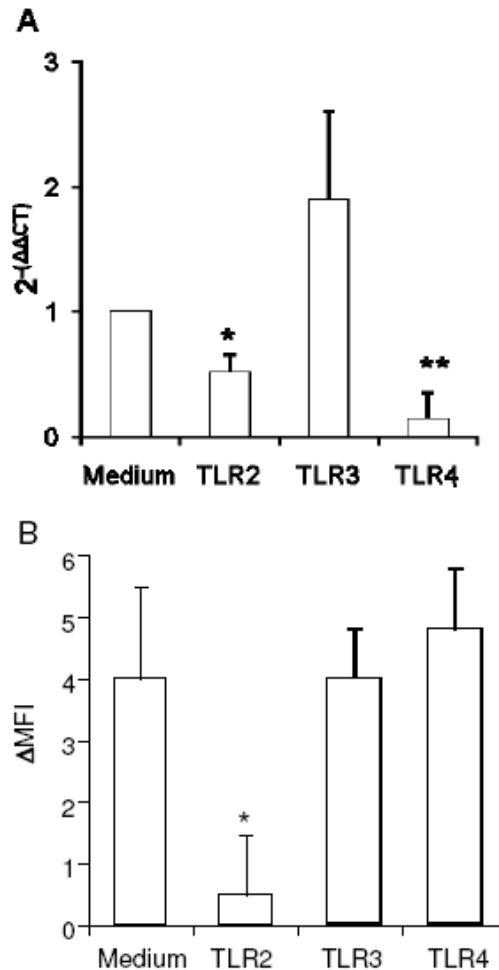


Figure 2
TLR2 activation modulates protein expression of SR-A1 in MDDC. MDDC were cultivated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CSK₄ (10 μg/ml), poly(I:C) (10 μg/ml) and LPS (1 μg/ml) during 8 h for the mRNA expression (part A) and 24 h for the protein membrane expression (part B). A- MDDC were harvested for mRNA isolation followed by measurement of SR-A1 mRNA levels by quantitative RT-PCR. Results were expressed as the mean ± SEM of the relative gene expression calculated for each experiment in folds (2^{-ΔΔCt}) compared to unstimulated cells used as calibrator (n = 5). B- Dendritic cells were labeled for SR-A1, and analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean ± SEM from 5 independent experiments. *: p < 0.05; **: p < 0.01 compared with cells in medium alone.

CXCL16 expression after 24 h. The TLR4 ligand increased LOX-1 after 24 h stimulation, whereas it significantly decreased the expression of CD36 after 24 h stimulation (p < 0.05). The effect of TLR2 agonist was illustrated in figure 3C-D by histograms of flow cytometry from a representative experiment. In contrast with the effect of LPS and poly(IC), the TLR2 agonist significantly decreased the expression of SR-A1 after 24 h activation (Fig 2B) but not after 6 h (data not shown).

Associated with TLR ligands, DEP decreased the effect of the TLR2 ligand on SR-B1 expression after 24 h stimulation (Fig 3B and 3D), but increased the action of the TLR4 ligand after 6 h stimulation (p < 0.05) (Fig 3B). Moreover, DEP significantly enhanced the action of TLR2 ligand on LOX-1 expression at 6 h stimulation (p < 0.05).

Since SR had a rapid turnover, we have evaluated the total expression of SR in DC after 6 and 24 h incubation by immunofluorescence on permeabilized cells. Whereas no modulation was detected at 6 h, activation for 24 h by TLR2 and TLR4 ligands significantly inhibited (33% and 39% decrease, respectively) the intracellular labeling of anti-CD36 antibody as reported for TLR2 in the fig 4. DEP partially reversed the effect of TLR2 agonist whereas the particles alone did not modulate CD36 expression. No modulation was observed for SR-B1 and LOX-1. Concerning CXCL16, activation by TLR2 agonist increased the intracellular expression of this SR as detected on the membrane (22% increase, p < 0.05). In contrast, addition of DEP did not affect its expression.

Taken together, the results showed that, as reported for mRNA expression, activation by TLR ligands modulate SR membrane expression in different ways. DEP alone tend to decrease the expression of CD36 and SR-B1. Moreover, DEP modulated the effect of TLR2 and TLR4 ligands on the level of LOX-1 and SR-B1.

Modulation by DEP of LPS-induced MDDC maturation: effect of SR ligands

Since DEP modulated the expression of HLA-DR, CD83 and CD86 in LPS-stimulated MDDC [10], we studied the capacity of poly-specific SR ligands (maleylated ovalbumin and dextran sulfate) to reverse the action of DEP on MDDC maturation.

As previously described, the effect of DEP was different according to the protocol (preincubation with DEP versus co-incubation with DEP and LPS) (Fig 5). DEP at the dose of 1 μg/ml significantly inhibited the LPS-induced upregulation of CD86 and HLA-DR (p < 0.05) when the ligands were added simultaneously. Addition of dextran sulfate and maleylated-ovalbumin blocked the inhibitory effect of DEP on LPS-stimulated DC (p < 0.05). In contrast,

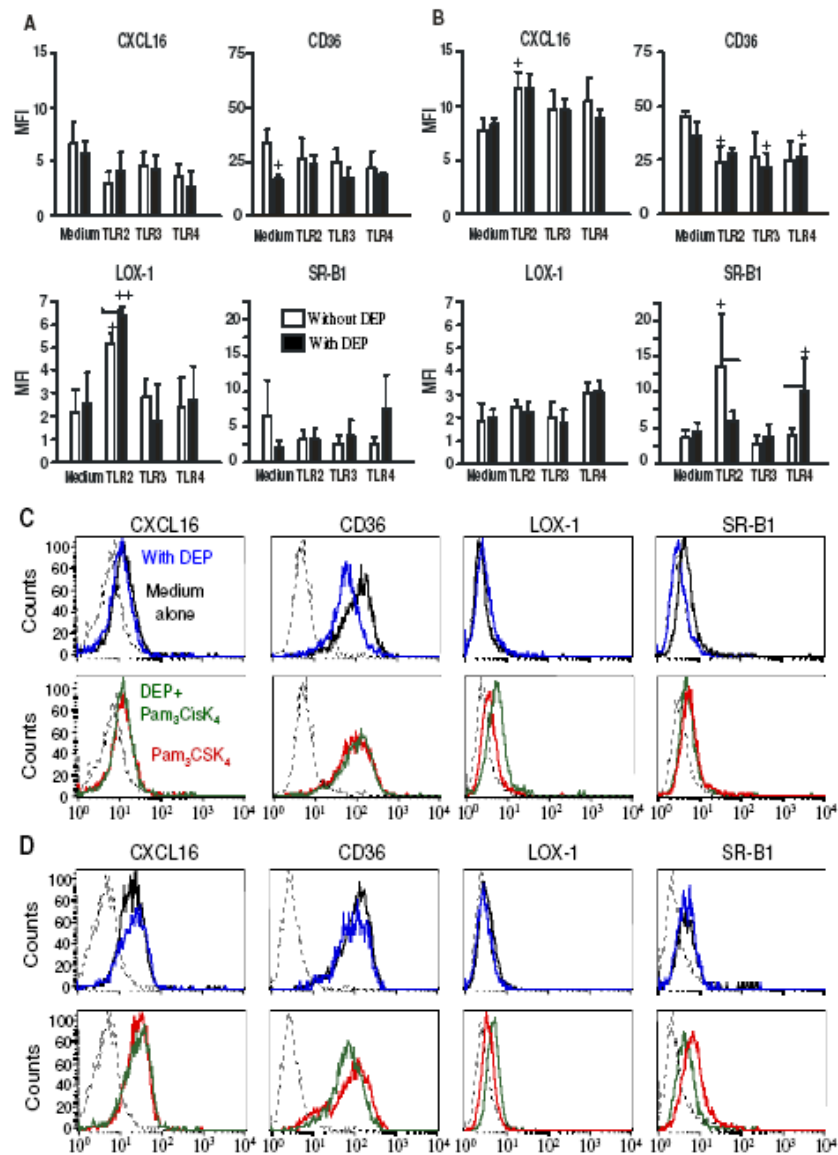


Figure 3
DEP and PAMP modulate protein expression of Scavenger Receptors in MDDC. MDDC were cultivated with TLR2, -3 and -4 ligands respectively Pam₃CSK₄ (10 µg/ml), poly(I:C) (10 µg/ml) and LPS (1 µg/ml), associated or not with DEP (10 µg/ml). A-B Dendritic cells activated during 6 h (A) and 24 h (B) were labelled for CD36, CXCL16, LOX-1 and SR-B1, and analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean ± SEM from 3 to 7 independent experiments. +: p < 0.05; ++: p < 0.01 compared with unstimulated cells. *: p < 0,05 compared with TLR-treated cells. C-D Flow cytometry histograms of a representative experiment. MDDC were cultivated for 6 h (C) and 24 h (D) with DEP (blue line), with TLR2 ligand (Pam3CSK4, red line), and with both stimuli (green line) as compared with cells in medium alone (black line).

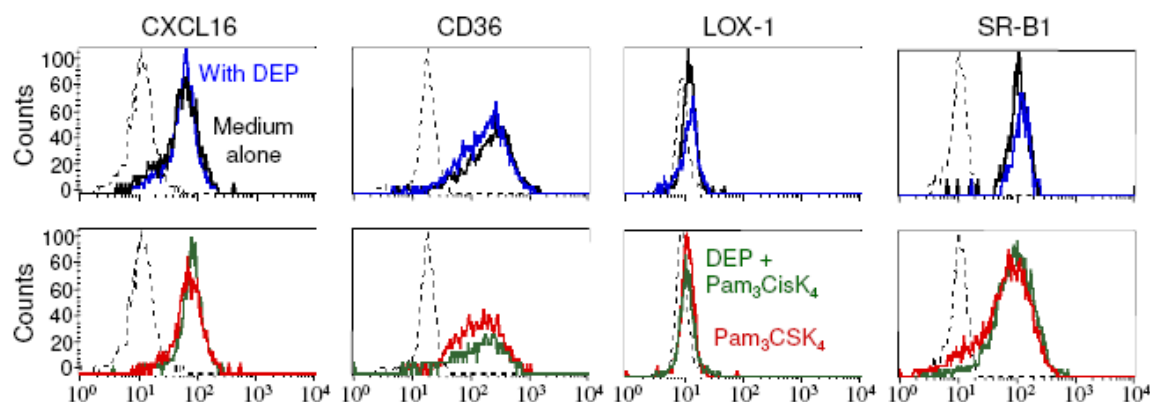


Figure 4

DEP and TLR2 agonist modulate the total protein expression of CD36 and CXCL16 in MDDC. MDDC were cultivated during 24 h with DEP (blue line), with TLR2 ligand (Pam₃CSK₄, red line), and with both stimuli (green line) as compared with cells in medium alone (black line). Dendritic cells were labelled after cell permeabilization for CD36, CXCL16, LOX-1, SR-B1 and with an isotype control (dotted line) and then, analyzed by flow cytometry.

these SR ligands did not modulate the action of LPS alone on the 3 markers of maturation.

Preincubation with DEP at 1 µg/ml had a weak inhibitory effect on LPS-induced CD83 expression in comparison to LPS alone, whereas HLA-DR and CD86 were not modified. Addition of maleylated-ovalbumin reversed the action of DEP on CD83 expression. Whereas DC-SIGN expression was not affected by DEP treatment, these particles have an additive effect on the LPS-induced decrease of the Mannose Receptor expression (data not shown). Addition of SR ligands did not antagonize this activity (data not shown).

Taken together, these data confirmed that DEP modified the phenotype of LPS-induced matured MDDC, whereas SR ligands blocked the effects of DEP.

Modulation by DEP of LPS-induced cytokine and chemokine production by MDDC: effect of SR ligands

The involvement of SR in the effect of DEP on LPS-induced cytokine and chemokine secretion by MDDC was also studied. Activation by LPS alone increased the production of CXCL10/IP-10, IL-6, IL-10, IL-12p70 and TNF-α (Fig 6) whereas DEP alone had no effect (data not shown). Dextran sulfate (but not maleylated ovalbumin) strongly inhibited the LPS-induced production of IL-10 whereas addition of SR ligands did not significantly modulate the other cytokines.

Preincubation with low dose (1 µg/ml) of DEP significantly increased the LPS-induced production of CXCL10/IP-10, TNF-α, IL-6 and IL-12p70 ($p < 0.05$). Maleylated-ovalbumin strongly inhibited the production of CXCL10/IP-10 ($p < 0.001$), IL-12 ($p < 0.05$) and TNF-α ($p < 0.05$) induced by low dose of DEP, whereas dextran sulfate had no significant activity. Surprisingly, IL-6 secretion was not modified by treatment with SR ligands. Preincubation with high dose of DEP did not have any significant effect.

Coincubation with low dose of DEP significantly increased CXCL10 production induced by LPS ($p < 0.05$), a modulation which is antagonized by treatment with both SR ligands, dextran sulfate ($p < 0.05$) and maleylated ovalbumin ($p < 0.001$). In contrast, simultaneous addition of LPS and the highest dose (10 µg/ml) of DEP inhibited the production of CXCL10 and IL-12 in comparison with LPS alone. Nevertheless, the addition of SR ligands did not neutralize this effect. Preincubation and simultaneous treatment with DEP with and without maleylated-ovalbumin had any effect on IL-10 synthesis (Fig 6).

Taken together, these data showed that low dose of DEP increased the synthesis of cytokines by LPS-stimulated DC, whereas the exposure to high dose was able to inhibit CXCL10 and IL-12 production. Preincubation with maleylated-ovalbumin mainly blocked the effect of low dose of DEP but did not antagonize the activity of the high dose.

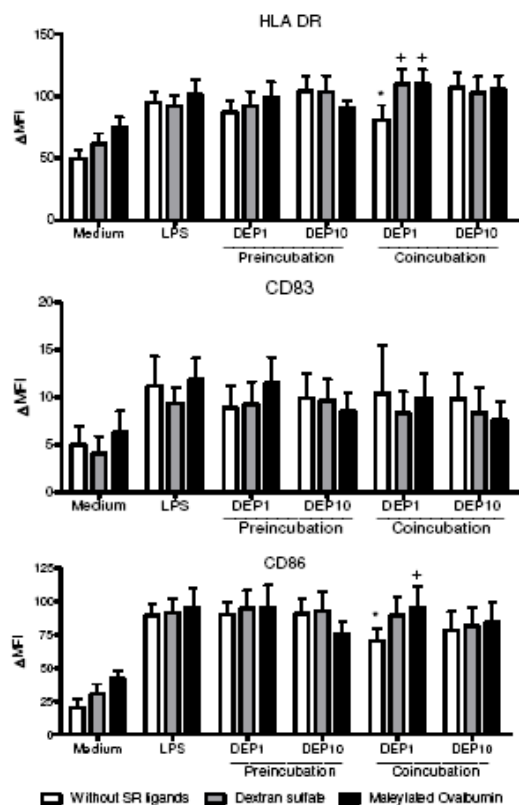


Figure 5
DEP modulate LPS-induced MDDC maturation: effect of SR ligands. MDDC were preincubated 2 h with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dextran sulfate, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ maleylated ovalbumin associated or not with 1 or 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DEP and then, 100 ng/ml LPS were added (Preincubation). For the coincubation, the three ligands are added simultaneously. After 24 h incubation, MDDC were labeled for HLA-DR, CD83 and CD86 and were analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the mean \pm SEM from 7 independent experiments. *: $p < 0.05$ compared with LPS-treated cells. +: $p < 0.05$ compared with the condition without SR ligand.

Effect of DEP on DEP endocytosis and ROS production by DC

In order to elucidate the action mechanism of SR ligands, endocytosis of DEP by MDDC has been evaluated. The uptake of particles induced an increase in the granularity of the cells, which led to a greater scattering of the laser light in flow cytometry [24]. This is confirmed by our data reported in figure 7 showing that exposure to DEP slightly

but significantly ($p < 0.05$) increased side scatter (SC) in DC. Preincubation with maleylated-ovalbumin but not with dextran sulfate dose dependently inhibited the uptake of DEP ($p < 0.05$).

Since exposure to DEP secondarily induced generation of ROS involved in the modulation of DC functions [12], production of these metabolites by MDDC has been evaluated. At steady state, MDDC produced low level of ROS, as measured by flow cytometry. Activation of PMA significantly increased the generation of ROS which reached its maximum at 2 h ($p < 0.05$). DEP significantly increased ROS production after 4 h stimulation ($p < 0.05$), whereas this treatment had a weak effect at 2 h (fig 8A). On the left histogram, treatment with DEP (bold line) induced a strong gap at 4 h (about 40% of the ΔMFI obtained with PMA).

We also analyzed the capacity of maleylated-ovalbumin to modulate the DEP-induced ROS generation (Fig 8B). Maleylated-ovalbumin had no significant effect on DEP-induced ROS production observed after 4 h stimulation.

Discussion

There is growing evidence that inhaled particulate matter derived from diesel contributes to the increased incidence of allergic diseases, respiratory infections and mortality [1,5-7,9]. The effect of DEP on lung immune response probably implicated the modulation of pulmonary DC functions.

In this study, we assessed whether DEP may affect the expression and the function of SR and by this way, can modulate the function of DC during activation by TLR ligands. Indeed, TLR ligands are frequently associated with airborne particles [23]. Here we showed that DEP modulate the activity of TLR ligands on SR expression in DC. Moreover, pretreatment with SR ligands blocks some effects of DEP on LPS-induced DC maturation and cytokine production through a still unknown mechanism.

Within airway mucosa, particulate matter-exposed bronchial epithelial cells secrete the DC chemoattractant CCL20/MIP-3 α , CCL2/MCP-1, and CCL5/RANTES [25]. Therefore, one might expect that DC would be among the first cells to interact with inhaled particulate matter. In the current study, we used well-established protocols that are thought to yield immature MDDC representative of those present *in vivo* at mucosal sites [26]. Since respiratory tract DC are rapidly derived from circulating precursors [27,28], we believe our experiments provide a reasonable approximation of how DC and DEP interact *in vivo*. In addition, DC can insert dendrites between airway epithelial cells to directly capture the particle or microorganism within the airway lumen [29].

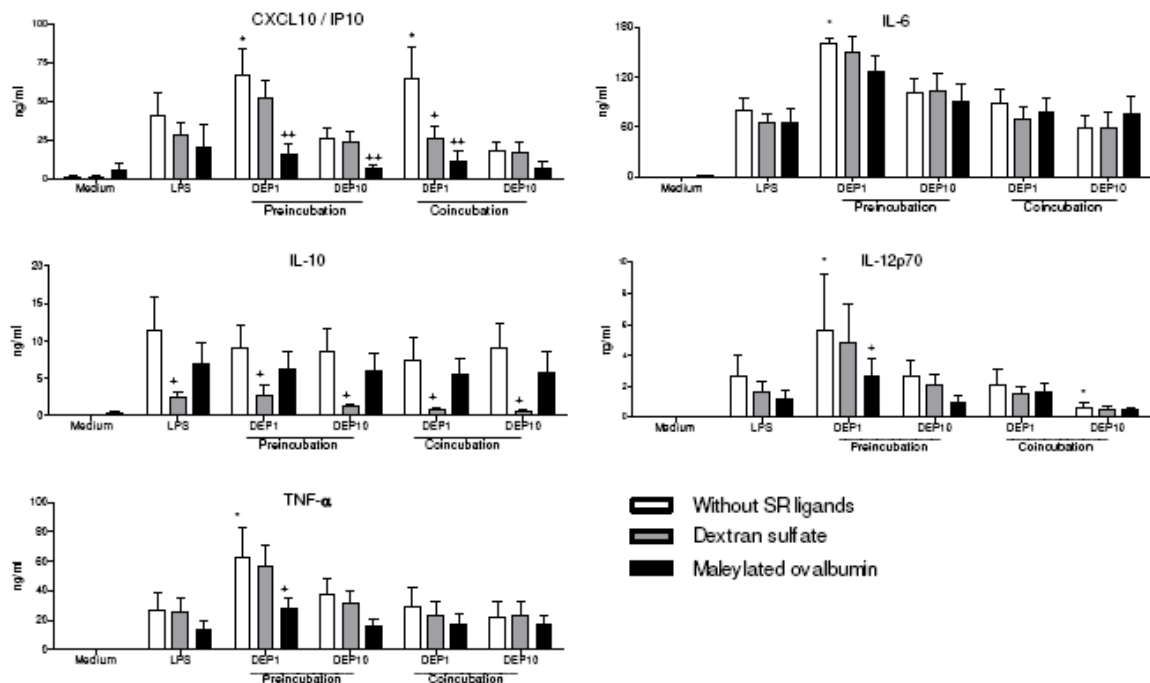


Figure 6

DEP modulate LPS-induced cytokine and chemokine production by MDDC: effect of SR ligands. MDDC were preincubated 2 h with 20 $\mu\text{g/ml}$ dextran sulfate, 100 $\mu\text{g/ml}$ maleylated ovalbumin associated or not with 1 or 10 $\mu\text{g/ml}$ DEP and then, 100 ng/ml LPS were added (Preincubation). For the coincubation, the three ligands are added simultaneously. After 24 h incubation, the concentrations of IP-10, IL-12, IL-6 and TNF- α were measured by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SEM from 8 independent experiments. *: $p < 0.05$ compared with LPS-treated cells. +: $p < 0.05$; ++: $p < 0.01$ compared with the condition without SR ligand.

Modulation of SR expression

There are few studies about the regulation of the expression of SR on DC. Concerning the regulation of class-A SR in DC, Amiel *et al* showed that SR-A expression is upregulated during DC maturation, and is correlated with the expression of the murine DC marker CD11c [30]. Another study showed that advanced glycosylation end (AGE)-BSA upregulated SR-A expression on DC via MAP kinases pathway (Jnk) [31]. The last work showed the upregulation of SR-B1 during the differentiation of MDDC. SR-B1 expression was suppressed by LPS, IFN- γ and TNF- α in monocytes and macrophages [32]. In the same way, we detect a transient decrease of SR-B1 expression in LPS-stimulated MDDC. We have also evaluated on MDDC the protein expression of MARCO, a SR involved in the particle clearance within the lung. Using a mAb (PLK1 clone; HBT, Uden, The Netherlands), our data revealed that this SR is nearly undetectable on MDDC by flow cytometry after

intracellular and extracellular labeling, whatever the condition of stimulation (data not shown).

In this study, the selection of the five SR is based on their expression in airway mucosa particularly in airway epithelium and in MDDC (data not shown). In addition, these receptors are known to be implicated in the modulation of TLR activity [33-36]. Our results showed that DEP had a weak effect on the SR mRNA expression, in contrast with the strong effect induced by TLR2 and TLR4 ligands. However, DEP alone seems to decrease the protein expression of CD36 and SR-B1 suggesting their mobilization during their interaction with DEP. In contrast, TLR2 ligand and at a lower level, TLR4 agonist enhances both the mRNA and protein expression of LOX-1, CXCL16 and SR-B1. Concerning SR-A1 and CD36, there is a clear dissociation between the TLR-dependent modulation of mRNA (increased) and protein (decreased) expression suggesting

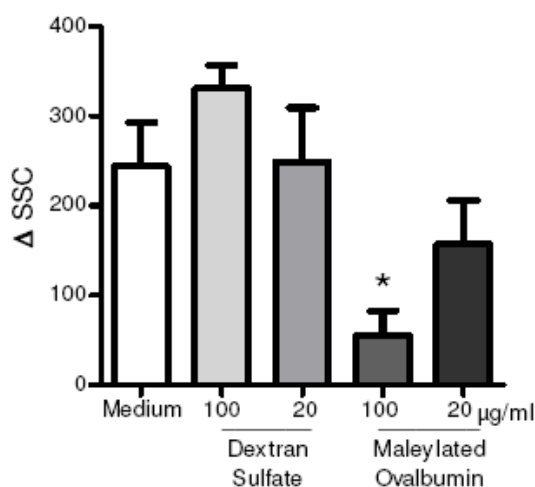


Figure 7
SR ligands modulate DEP endocytosis. MDDC were preincubated for 15 min with 20 and 100 $\mu\text{g/ml}$ dextran sulfate or maleylated ovalbumin and then, DEP (10 $\mu\text{g/ml}$) was added. After 6 h incubation, side scatter (SSC) of MDDC was analyzed by flow cytometry. Data are expressed as the difference between the SSC in DEP-stimulated and inactivated cells. The data reported the mean \pm SEM from 5 independent experiments. *: $p < 0.05$ compared with cells with DEP alone (medium).

that their membrane expression in DC are mainly controlled by post-transcriptional mechanisms as previously reported [20]. Measurement of intracellular expression revealed that the level of CD36 and CXCL16 is parallel in both extracellular and intracellular compartment whereas this is not true for LOX-1 and SR-B1. According to these data, the mechanisms controlling the membrane expression of LOX-1 and SR-B1 are probably very different from those of CD36 and CXCL16. Since TLR3 activation had a weak effect on SR level in contrast to TLR2 and TLR4, we can suspect that MyD88-dependent pathway mobilized by both TLR is involved in the modulation of SR expression. Associated with pathogen-associated molecular pattern (PAMP), DEP modulate the activity of TLR2 and TLR4 ligands according to the SR. As previously reported [10-12], DEP can modulate the signalling pathways activated by TLR and by this way, controlled the modulation of SR expression. In addition, we can suspect that DEP uptake by MDDC directly mobilizes some SR such as CD36 and SR-B1 and interferes with the activity of TLR agonists on SR expression.

Regulation of DC maturation induced by TLR ligand

There are some controversial data in the literature concerning the impact of DEP exposure on DC maturation. Most studies show that DEP alone have no effect on DC maturation whereas it can act as an adjuvant in order to increase the response to an allergen or a TLR ligand [10]. In contrast, DEP can also inhibit some signals induced by TLR activation and deviate the phenotype of mature DC towards a pro-Th2 type. Indeed, DEP inhibit IL-12 mRNA and protein expression in DC, and decrease IFN- γ production by T lymphocytes cocultured with DEP-exposed DC [11]. DEP in mice inhibited DC maturation (IL-12 production and co-stimulatory molecule expression) induced by TLR2, 3, 4 and 9 ligands [12]. Finally, another report also suggests that direct exposure to airborne particulate matter from diesel vehicles increased the expression of MHC class II and costimulatory molecules and the production of TNF- α , IL-12p40, IL-6, and VEGF [2].

In our model, DEP alone have no effect on DC maturation, suggesting that their effect on MDDC is dependent upon their origin and their preparation (addition of surface activator or surfactant) as previously reported [37]. In our hands, DEP modulate the LPS-induced DC maturation according to the timing and to the dose. We show that the low dose of DEP increases the synthesis of cytokine by LPS-stimulated DC, whereas the high dose blocks IP-10 and IL-12 production. Moreover, SR ligands are able to reverse some effects of DEP. One hypothesis to explain these data might be that there is a competition for the uptake and internalization of DEP. Our results demonstrated that mOva but not dextran sulfate inhibited in a dose-dependent manner the uptake of DEP. This suggests that it is not the only mechanism involved in the activity of poly-specific SR ligands. The fact that SR agonists only block the action of low dose of DEP, can be explained by an insufficient molecular ratio between SR ligands and DEP in order to inhibit the effect of the high dose. Another explanation might be that, according to the dose, different receptors are implicated in the DEP effect. This hypothesis is likely since both doses of DEP have an opposite effect on cytokine secretion by DC. The implication of the xenobiotic sensor AhR has been previously mentioned [38]. Moreover, SR are also described as coreceptors for TLR, DEP can interfere with TLR-induced signalling through the mobilization of SR. For example, activation with the TLR2 ligand Kp-OmpA is dependent of both SREC-1 and LOX-1 or with diacylglycerides, of CD36 [34,39]. CD36, with established roles in recognition of endogenous and exogenous ligands, facilitates TLR2 signaling [40]. In addition, CXCL16 is involved in TLR9 activation by plasmacytoid DC [33]. Preincubation with maleylated-ovalbumin mainly block all the effects of low dose of DEP whereas dextran sulfate have a more restricted effect. Maleylated OVA binds to most of the SR,

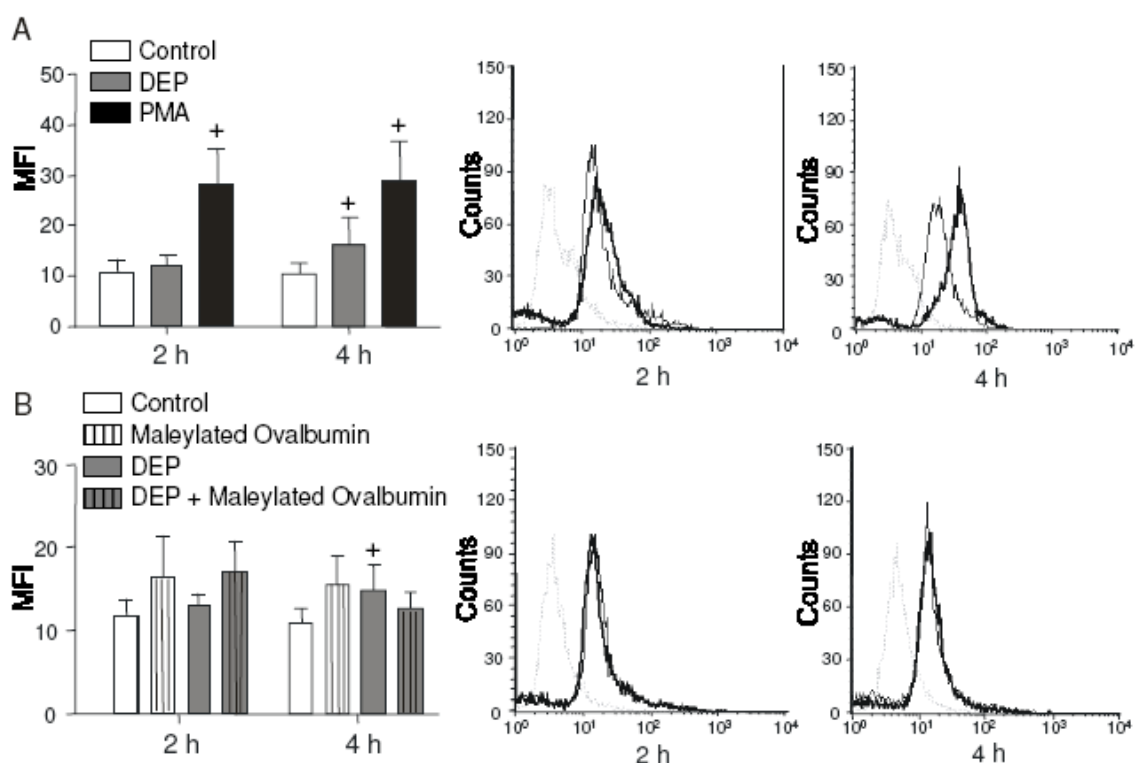


Figure 8
Effect of DEP on ROS production by MDDC. A. MDDC were incubated in medium alone, with DEP (10 $\mu\text{g/ml}$) or with PMA (100 ng/ml) for different time periods. ROS production was analyzed by flow cytometry. The left histogram reported the mean \pm SEM from 6 independent experiments whereas the flow cytometry histograms show the data obtained in one representative experiment. +: $p < 0.05$ compared with cells in medium alone. B. Modulation by maleylated ovalbumin of DEP effect on MDDC activated for 2 and 4 h. Data in the left histogram are expressed as the mean \pm SEM from 6 independent experiments. The flow cytometry histograms reported the data obtained in one representative experiment. +: $p < 0.05$ compared with cells in medium alone.

including the class II scavenger receptors SR-AI/II, SR-BI and CD36 [20]. Moreover, we have observed that CHO cells expressing either CXCL16, LOX-1 or SREC-1 strongly bind FITC-conjugated maleylated OVA (data not shown). Dextran sulfate has been reported to inhibit the binding of several ligands to SR-AI/II, SREC-I, CXCL16 and LOX-1 [41] whereas this ligand does not interact with CD36 [42]. Moreover, sulfated glycoconjugates, including dextran sulfate, share a binding inhibition pattern consistent with class A or C activity [43]. According to our data, we can suspect that class B SR (SR-B1, CD36) are presumably involved within DEP effect in DC. To confirm the implication of SR, it would be interesting to test other inhibitory methods like gene silencing.

The modulation of IL-12 and CXCL10 production (two major cytokines involved in the differentiation and the

recruitment of Th1 cells) by SR ligands may have a strong impact on the capacity of DEP-exposed DC to polarize the T cell response. Since this effect is only observed at low doses, we can suspect that it is mainly involved in the long term effect of chronic exposure to these particles.

DEP effect on DC phenotype

Our data demonstrate that coinubation with LPS and DEP affects the phenotype of mature DC, decreasing the expression of the costimulatory molecule CD86 and of the HLA-DR molecule. We demonstrate that this effect is dependent on SR mobilization. This process could impact the T cell response and polarization since CD86 is known to be implicated in Th2 cell development.

Recently, Porter *et al* demonstrate that airborne particulate matter from diesel vehicles enhanced the MR expression

and potentialized antigen uptake (dextran-FITC) whereas LPS decreased both MR expression and antigen uptake [2]. In the present study, DEP alone had no effect on MR expression (data not shown) whereas it had an additive effect on the LPS-induced decrease of this receptor. As underlined above, this discrepancy is probably related to different origins of the particles.

ROS production

It has been demonstrated in human and murine models that the effects of DEP on DC are associated with ROS production [11,12]. Notably, DEP-induced ROS production triggers the activation of a signaling pathway mediated by nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 that suppresses IL-12 production [12]. In our model, the inhibition of IL-12 production as well as ROS production are only detected at high concentrations of DEP and both seem to be independent of SR mobilization. These data strongly suggest that the activation of NF-E2 is not dependent of SR-induced signalling pathways. At the opposite, SR seems to be involved in the upregulation of the cytokine production triggered by the low dose of DEP.

Conclusion

Taken together, our results show that the modulation of DC functions by DEP involves the mobilization of SR. Moreover, the impact on DC functions appears to be different according to the dose and probably implicates different signalling pathways. Interfering with the expression and/or the function of SR might be one way to limit the impact of DEP on lung immune response and on the induction and the exacerbation of lung diseases.

Methods

Preparation of DEP

We used standard DEP (standard reference material (SRM) 2975) obtained from the National Institute for Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The material was collected from a filtering system designed specifically for diesel-powered forklifts. Its chemical composition is mentioned in the Certificate of Analysis from NIST. DEP were diluted in a solution containing 0.04% Dipalmitoyl Phosphatidylcholin (Fluka Chemie, Buchs, Switzerland). To minimize aggregation, DEP were sonicated for 15 minutes and shaken prior to their dilution. The suspension was diluted in culture medium to the final concentrations required for exposure of the cells.

Preparation of MDDC and DEP exposure

Blood monocytes from healthy volunteers were purified by positive selection over a MACS column using anti-CD14-monoclonal antibodies (mAb) conjugated microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and were differentiated into dendritic cells by

standard procedures [26]. Briefly, monocytes were cultivated at 1×10^6 cells/ml for 5 days in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Invitrogen, Paisley, UK) containing 10 ng/ml IL-4 and 25 ng/ml GM-CSF (PromoCell, Heidelberg, Germany).

At day 5, CD14⁺CD11c⁺HLA-DR^{low} immature monocyte-derived DC were obtained as characterized by their phenotype and the low level of cytokine production (data not shown).

Cells were either left untreated or were exposed for 1, 3, 6, 8 or 24 h to DEP (10 µg/ml) with or without the TLR2 ligand Pam3CSK4 (10 µg/ml), the TLR3 ligand poly(I:C) (10 µg/ml) or the TLR4 ligand LPS (1 µg/ml) (Invivogen, San Diego, CA) depending on the experiments. The vehicle for DEP containing 0.04% dipalmitoyl phosphatidylcholin was added in the control wells.

To evaluate their maturation in the presence of DEP, the activation protocol was as follows: MDDC were preincubated with the SR ligands Dextran sulfate (20 µg/ml) or maleylated- and deglycosylated ovalbumin (100 µg/ml) with or without DEP (1 or 10 µg/ml) during 2 h before addition of LPS (100 ng/ml) for 24 h. In some experiments, the SR ligands, DEP and LPS were added at the same time. The preparation of SR ligands are endotoxin-free, as measured by the limulus amoebocyte assay (Lonza, Verviers, Belgium). As previously described, dextran sulfate particularly targets SREC-1 and CXCL16 whereas maleylated-ovalbumin binds to most of the SR [44-46]. Cell viability was evaluated in each condition of activation by trypan blue exclusion after 24 h incubation and no significant decrease was detected in the presence of each activator or their combination.

Real Time quantitative PCR

Total RNA was isolated from DC exposed to DEP and/or to TLR ligands. After 1 or 3 h incubation, cells were washed in sterile cold PBS, lysated by using TRIzol reagent (Invitrogen) and RNA were isolated according to manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by spectrophotometry and its quality was evaluated by electrophoresis through a 0.8% agarose gel visualized using Gelstar staining. Retro-transcription and Real-Time quantitative PCR were performed using SuperScript™ Platinum® SYBR® Green Two-Step qRT-PCR Kit with ROX (Invitrogen, Paisley, Scotland) according to manufacturer's instructions. Forty-five cycles of cDNA amplification were performed at 55°C (30s) after hybridation at 60°C (20s). In order to obtain a normalized target value, the house-keeping gene actin was used. Forward and reverse primers for CD36, CXCL16, Lox-1 and SR-B1 were designed as follows: CD36 (forward 5'-TGTC-CGCGAAGAAGCTACAA, reverse 5'-TCACTTCCTGT-

GGATTTGCAC); CXCL16 (forward 5'-GGCITFGGACCCTTGCTCTTG, reverse 5'-ITGCGCTCAAAGCAGTCCACT); LOX-1 (forward 5'-AGTGGACACAATTACGCCAGGT, reverse 5'-ATCTGCCCTTCCAGGATACGA); SR-A1 (forward 5'-TTCAAAGCTGCACTGATTGCC, reverse 5'-TTCITCGTTTCCCACITTCAGGA); SR-B1 (forward 5'-TGACGATCCCTTCTGTCATT, reverse 5'-CATCCCAACAACAGGCCAA); actin (forward 5'-TCCTCACCCTGAAGTACCCCA, reverse 5'-AGCCACACGCAGCTCATTGT).

Results were expressed mean \pm SEM of the relative gene expression calculated for each experiment in folds ($\Delta\Delta C_t$) compared to unstimulated cells used as calibrator.

Chemokine and cytokine measurements

The concentrations of cytokines and chemokines in the culture supernatants were determined by sandwich enzyme immunoassay as described by the manufacturer, R&D systems for CXCL10/IP-10, IL-6, and TNF- α or Diaclone (Besançon, France) for IL-12p70.

Flow cytometry

After the recovery of MDDC supernatants, cells were incubated with PBS/EDTA (2 mM) and were detached by scraping. MDDC were centrifuged and resuspended in PBS containing 2% FCS. Cells were labeled (30 min, 4°C) with murine FITC-conjugated anti HLA-DR and DC-SIGN mAb, PE-conjugated anti CD80, CD83 and Mannose Receptor mAb, APC-conjugated anti CD86 and CD11c mAb or mouse IgG isotype controls conjugated with FITC, PE or APC (BD Pharmingen, except for CD83 from Beckman Coulter). Cells were washed with cold PBS and fixed with 1% paraformaldehyde in PBS.

To study SR expression, cells were labelled (30 min, 4°C) with mouse anti-LOX-1 (HBt), -SR-B1 (BD) and -CD36 (Labvision), goat anti-CXCL16 (R&D systems) antibodies or the relevant isotype control. Binding of unlabelled Ab or isotype control was detected by addition of FITC-conjugated anti-mouse or PE-conjugated anti-goat IgG antibodies (Invitrogen). In some experiments, the procedure was reproduced with cells previously fixed and permeabilized according to the procedure of the kit manufacturer (BD Biosciences). For SR-A1, cells were directly labelled with an FITC-conjugated anti-SR-A1 monoclonal antibody (R&D Systems). Then, cells were washed, fixed with paraformaldehyde in PBS and 10000 events were analyzed on a FACScalibur flow cytometer with CellQuest software (Becton Dickinson). Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with specific antibody minus the isotype control MFI (Δ MFI).

Analysis of oxidative metabolism

10 μ M of H2DCFDA (Dihydro-DichloroFluorescein Diacetate) was added to 2×10^5 DC cultured in PBS for 30 minutes before stimulation with DEP (10 μ g/ml) associated or not with SR ligand maleylated-ovalbumine, positive control PMA (100 ng/ml) for 2 and 4 h. ROS generation was quantified by Flow Cytometry. Results are expressed as the difference between median fluorescence intensity (MFI) with DCFDA minus the autofluorescence control MFI (Δ MFI).

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM. The statistical significance of the differences between experimental groups was calculated by ANOVA1 with a Bonferroni post test (GraphPad Prism 4 Software, San Diego, USA). Results with a *P* value of less than 0.05 were considered significant.

Abbreviations

Ag: Antigen; DC: Dendritic Cell; DEP: Diesel Exhaust Particle; mDC: Myeloid Dendritic Cell; MDDC: Monocyte-Derived Dendritic Cell; MFI: Median of fluorescence intensity; mOVA: maleylated ovalbumin; mRNA: Messenger Ribonucleic Acid; LPS: Lipopolysaccharide; PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern; PMA: Phorbol Myristate Acetate; ROS: Reactive Oxygen Species; RSV: Respiratory Syncytial Virus; SR: Scavenger Receptor; TLR: Toll-Like Receptor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

TS had performed and analyzed most of the data, had designed the study and wrote the article with PG. DA had participated to the cell culture experiments, to the QRT-PCR experiments and to the collection of data; she had also contributed to the design of the study. BS, JP and DY had participated to the development of the methodologies regarding the expression of SR and to the revising of the article. They also prepared the SR ligands and evaluated their binding to CHO cells. PhL contributed to the design and conception of the study and to the revising of the article. PG had acted as the main contributor for the design and the conception of the study. He had also coordinated the study. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

ST was supported by a grant from Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) and Conseil Régional Nord-Pas-De-Calais. We would like to thank Isabelle Fremaux for her help in the correction of the manuscript.

References

- Ebtekar M: **Air pollution induced asthma and alterations in cytokine patterns.** *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2006, **5**(2):47-56.
- Porter M, Karp M, Killedar S, Bauer SM, Guo J, Williams D, Breyse P, Georas SN, Williams MA: **Diesel-enriched particulate matter functionally activates human dendritic cells.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007, **37**(6):706-719.
- Riedl M, Diaz-Sanchez D: **Biology of diesel exhaust effects on respiratory function.** *J Allergy Clin Immunol* 2005, **115**(2):221-228. quiz 229.
- Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE: **Health effects of diesel exhaust emissions.** *Eur Respir J* 2001, **17**(4):733-746.
- Miyabara Y, Ichinose T, Takano H, Lim HB, Sagai M: **Effects of diesel exhaust on allergic airway inflammation in mice.** *J Allergy Clin Immunol* 1998, **102**(5):805-812.
- Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M: **Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice.** *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **156**(1):36-42.
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J, Saxon A: **Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern.** *J Immunol* 1997, **158**(5):2406-2413.
- Jaspers I, Cienciewicki JM, Zhang W, Brighton LE, Carson JL, Beck MA, Madden MC: **Diesel exhaust enhances influenza virus infections in respiratory epithelial cells.** *Toxicol Sci* 2005, **85**(2):990-1002.
- Harrod KS, Jaramillo RJ, Rosenberger CL, Wang SZ, Berger JA, McDonald JD, Reed MD: **Increased susceptibility to RSV infection by exposure to inhaled diesel engine emissions.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2003, **28**(4):451-463.
- Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters H, Verheyen G, Schoeters G: **Flow cytometric characterisation of antigen presenting dendritic cells after in vitro exposure to diesel exhaust particles.** *Toxicol In Vitro* 2005, **19**(7):903-907.
- Ohtani T, Nakagawa S, Kurosawa M, Mizuashi M, Ozawa M, Aiba S: **Cellular basis of the role of diesel exhaust particles in inducing Th2-dominant response.** *J Immunol* 2005, **174**(4):2412-2419.
- Chan RC, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoe K, Lee JJ, Nel AE: **Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation.** *J Allergy Clin Immunol* 2006, **118**(2):455-465.
- Holt PG, Stumbles PA: **Characterization of dendritic cell populations in the respiratory tract.** *J Aerosol Med* 2000, **13**(4):361-367.
- Lambrecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA: **Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice.** *J Immunol* 1998, **160**(8):4090-4097.
- McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN, Holt PG: **Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli.** *J Exp Med* 1996, **184**(6):2429-2432.
- Pichavant M, Charbonnier AS, Taront S, Brichet A, Wallaert B, Pestel J, Tonnel AB, Gosset P: **Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2005, **115**(4):771-778.
- Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA: **Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes.** *J Exp Med* 2001, **193**(1):51-60.
- Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S: **Scavenger receptors in innate immunity.** *Current opinion in immunology* 2002, **14**(1):123-128.
- Steinman RM, Hemmi H: **Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity.** *Curr Top Microbiol Immunol* 2006, **311**:17-58.
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH, Ponnambalam S: **Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors.** *Atherosclerosis* 2005, **182**(1):1-15.
- Kobzik L: **Lung macrophage uptake of unopsonized environmental particulates. Role of scavenger-type receptors.** *J Immunol* 1995, **155**(1):367-376.
- Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soinen R, Tryggvason K, Kobzik L: **The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles.** *J Exp Med* 2004, **200**(2):267-272.
- Dong W, Lewtas J, Luster MI: **Role of endotoxin in tumor necrosis factor alpha expression from alveolar macrophages treated with urban air particles.** *Exp Lung Res* 1996, **22**(5):577-592.
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F: **Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production.** *The American journal of physiology* 1999, **276**(4 Pt 1):L604-613.
- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T: **Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003, **28**(6):648-654.
- Gosset P, Bureau F, Angeli V, Pichavant M, Faveeuw C, Tonnel AB, Trottein F: **Prostaglandin D2 affects the maturation of human monocyte-derived dendritic cells: consequence on the polarization of naive Th cells.** *J Immunol* 2003, **170**(10):4943-4952.
- Vermaelen K, Pauwels R: **Pulmonary dendritic cells.** *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **172**(5):530-551.
- Lambrecht BN, Hammad H: **Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**(12):994-1003.
- Ichihashi H, McCormack JM, McCarthy KM, Dombkowski D, Preffer FI, Schneeberger EE: **Matrix metalloproteinase-9-deficient dendritic cells have impaired migration through tracheal epithelial tight junctions.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**(6):761-770.
- Amiel E, Nicholson-Dykstra S, Walters JJ, Higgs H, Berwin B: **Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of E. coli by bone marrow dendritic cells.** *Exp Cell Res* 2007, **31**(7):1438-1448.
- Ge J, Jia Q, Liang C, Luo Y, Huang D, Sun A, Wang K, Zou Y, Chen H: **Advanced glycosylation end products might promote atherosclerosis through inducing the immune maturation of dendritic cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, **25**(10):2157-2163.
- Buechler C, Ritter M, Quoc CD, Agildere A, Schmitz G: **Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **262**(1):251-254.
- Gursel M, Gursel I, Mostowski HS, Klinman DM: **CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation.** *J Immunol* 2006, **177**(3):1575-1580.
- Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw JF, Hoeffel G, et al.: **Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors.** *Immunity* 2005, **22**(5):551-560.
- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ: **Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain.** *J Cell Biol* 2005, **170**(3):477-485.
- Triantafyllou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, Triantafyllou K: **Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting.** *The Journal of biological chemistry* 2006, **281**(41):31002-31011.
- Singh P, DeMarini DM, Dick CA, Tabor DG, Ryan JV, Linak WP, Kobayashi T, Gilmour MI: **Sample characterization of automobile and forklift diesel exhaust particles and comparative pulmonary toxicity in mice.** *Environ Health Perspect* 2004, **112**(8):820-825.
- Vogel CF, Sciuillo E, Wong P, Kuzmicky P, Kado N, Matsumura F: **Induction of proinflammatory cytokines and C-reactive protein in human macrophage cell line U937 exposed to air pollution particulates.** *Environ Health Perspect* 2005, **113**(11):1536-1541.
- Hoebel K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahring U, et al.: **CD36 is a sensor of diacylglycerides.** *Nature* 2005, **433**(7025):523-527.
- Bjorkbacka H: **Multiple roles of Toll-like receptor signaling in atherosclerosis.** *Current opinion in lipidology* 2006, **17**(5):527-533.

41. Pearson AM: **Scavenger receptors in innate immunity.** *Current opinion in immunology* 1996, **8**(1):20-28.
42. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M: **Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor.** *The Journal of biological chemistry* 1994, **269**(33):21003-21009.
43. Dingirard N, Yoshino TP: **Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of Schistosoma mansoni sporocysts.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **146**(2):219-230.
44. Narazaki M, Segarra M, Tosato G: **Sulfated polysaccharides identified as inducers of neuropilin-1 internalization and functional inhibition of VEGF165 and semaphorin3A.** *Blood* 2008, **111**(8):4126-4136.
45. Kwon KH, Ohigashi H, Murakami A: **Dextran sulfate sodium enhances interleukin-1 beta release via activation of p38 MAPK and ERK1/2 pathways in murine peritoneal macrophages.** *Life Sci* 2007, **81**(5):362-371.
46. Abraham R, Singh N, Mukhopadhyay A, Basu SK, Bal V, Rath S: **Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by maleylation to target scavenger receptors on macrophages.** *J Immunol* 1995, **154**(1):1-8.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Références bibliographiques

A

- Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S and Ludwig A. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol.* 2004, 172 (10): 6362-72
- Adachi H and Tsujimoto M. Characterization of the human gene encoding the scavenger receptor expressed by endothelial cell and its regulation by a novel transcription factor, endothelial zinc finger protein-2. *J Biol Chem.* 2002a, 277 (27): 24014-21
- Adachi H and Tsujimoto M. FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities. *J Biol Chem.* 2002b, 277 (37): 34264-70
- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K and Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 1998, 9 (1): 143-50
- Adamou JE, Witzemann TM, Barren P and Langermann S. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun.* 1998, 66 (2): 820-2
- Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM and Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol.* 2002, 32 (7): 1958-68
- Akbari O, Freeman GJ, Meyer EH, Greenfield EA, Chang TT, Sharpe AH, Berry G, DeKruyff RH and Umetsu DT. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med.* 2002, 8 (9): 1024-32
- Akira S and Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004, 4 (7): 499-511
- Akira S, Takeda K and Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001, 2 (8): 675-80
- Aksoy E, Zouain CS, Vanhoutte F, Fontaine J, Pavelka N, Thieblemont N, Willems F, Ricciardi-Castagnoli P, Goldman M, Capron M, Ryffel B and Trottein F. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *J Biol Chem.* 2005, 280 (1): 277-83
- Alexander JS, Elrod JW and Park JH. Roles of leukocyte and immune cell junctional proteins. *Microcirculation.* 2001, 8 (3): 169-79
- Allam JP, Novak N, Fuchs C, Asen S, Berge S, Appel T, Geiger E, Kochan JP and Bieber T. Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcepsilonRI expression. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, 112 (1): 141-8
- Amakawa K, Terashima T, Matsuzaki T, Matsumaru A, Sagai M and Yamaguchi K. Suppressing effects of diesel exhaust particles on cytokine release from human and murine alveolar macrophages. *Exp Lung Res.* 2003, 29 (3): 149-64
- Amiel E, Nicholson-Dykstra S, Walters JJ, Higgs H and Berwin B. Scavenger receptor-A functions in phagocytosis of *E. coli* by bone marrow dendritic cells. *Exp Cell Res.* 2007, 313 (7): 1438-48
- Anders HJ, Zecher D, Pawar RD and Patole PS. Molecular mechanisms of autoimmunity triggered by microbial infection. *Arthritis Res Ther.* 2005, 7 (5): 215-24
- Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* 2000, 12 (1): 13-9
- Angst BD, Marozzi C and Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 2001, 114 (Pt 4): 629-41
- Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD and Millar AB. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004, 31 (2): 241-5
- Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K and Kobzik L. The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med.* 2004, 200 (2): 267-72
- Asada M, Irie K, Morimoto K, Yamada A, Ikeda W, Takeuchi M and Takai Y. ADIP, a novel Afadin- and alpha-actinin-binding protein localized at cell-cell adherens junctions. *J Biol Chem.* 2003, 278 (6): 4103-11
- Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ and Stewart GA. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2002a, 168 (7): 3577-85
- Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, Bakker AJ, Eidne KA, Thompson PJ and Stewart GA. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol.* 2002b, 169 (8): 4572-8
- Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, Vicari A, O'Garra A, Biron C, Briere F and Trinchieri G. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol.* 2001, 2 (12): 1144-50
- Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F and Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol.* 2003, 171 (12): 6466-77
- Ayers MM and Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J.* 1988, 1 (1): 58-80
- Ayyagari VN, Januszkiewicz A and Nath J. Pro-inflammatory responses of human bronchial epithelial cells to acute nitrogen dioxide exposure. *Toxicology.* 2004, 197 (2): 149-64

B

- Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW and Ohashi PS. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity.* 1997, 7 (4): 549-57
- Baffica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT and Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006, 177 (6): 3515-9
- Baffica A, Sanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A and Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med.* 2005, 202 (12): 1715-24
- Balda MS and Matter K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J.* 2000, 19 (9): 2024-33

- Bals R and Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*. 2004, 23 (2): 327-33
- Bals R, Wang X, Zasloff M and Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998, 95 (16): 9541-6
- Bals R, Weiner DJ and Wilson JM. The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest*. 1999, 103 (3): 303-7
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B and Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000, 18 767-811
- Banchereau J and Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998, 392 (6673): 245-52
- Barchet W, Cella M and Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol*. 2005, 17 (4): 253-61
- Barfknecht TR, Hites RA, Cavaliers EL and Thilly WG. Human cell mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon components of diesel emissions. *Dev Toxicol Environ Sci*. 1982, 10 277-94
- Basu S and Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med*. 1999, 189 (5): 797-802
- Becker M, Cotena A, Gordon S and Platt N. Expression of the class A macrophage scavenger receptor on specific subpopulations of murine dendritic cells limits their endotoxin response. *Eur J Immunol*. 2006, 36 (4): 950-60
- Bella J and Rossmann MG. ICAM-1 receptors and cold viruses. *Pharm Acta Helv*. 2000, 74 (2-3): 291-7
- Bellini A and Mattoli S. The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses. *Lab Invest*. 2007, 87 (9): 858-70
- Belz GT, Vremec D, Febbraio M, Corcoran L, Shortman K, Carbone FR and Heath WR. CD36 is differentially expressed by CD8+ splenic dendritic cells but is not required for cross-presentation in vivo. *J Immunol*. 2002, 168 (12): 6066-70
- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bunnick JR and Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 1995, 268 (5212): 863-5
- Benezra M, Greenberg RS and Masur SK. Localization of ZO-1 in the nucleolus of corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007, 48 (5): 2043-9
- Bertorelli G, Bocchino V, Zhou X, Zanini A, Bernini MV, Damia R, Di Comite V, Grima P and Olivieri D. Dendritic cell number is related to IL-4 expression in the airways of atopic asthmatic subjects. *Allergy*. 2000, 55 (5): 449-54
- Bettelli E, Korn T and Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol*. 2007, 19 (6): 652-7
- Beutler E, Gelbart T and West C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol Dis*. 2001, 27 (4): 728-30
- Bieber T. The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology*. 2007, 212 (6): 499-503
- Bierkamp C, Schwarz H, Huber O and Kemler R. Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice. *Development*. 1999, 126 (2): 371-81
- Blank F, Rothen-Rutishauser B and Gehr P. Dendritic cells and macrophages form a transepithelial network against foreign particulate antigens. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007, 36 (6): 669-77
- Blasius AL, Cella M, Maldonado J, Takai T and Colonna M. Siglec-H is an IPC-specific receptor that modulates type I IFN secretion through DAP12. *Blood*. 2006, 107 (6): 2474-6
- Bleck B, Tse DB, Jaspers I, Curotto de Lafaille MA and Reibman J. Diesel exhaust particle-exposed human bronchial epithelial cells induce dendritic cell maturation. *J Immunol*. 2006, 176 (12): 7431-7
- Blois S, Tometten M, Kandil J, Hagen E, Klapp BF, Margni RA and Arck PC. Intercellular adhesion molecule-1/LFA-1 cross talk is a proximate mediator capable of disrupting immune integration and tolerance mechanism at the fetomaternal interface in murine pregnancies. *J Immunol*. 2005, 174 (4): 1820-9
- Bocchino V, Bertorelli G, Zhuo X, Grima P, Di Comite V, Damia R, Chetta A, Del Donno M, Foresi A, Casalini A, Testi R and Olivieri D. Short-term treatment with a low dose of inhaled fluticasone propionate decreases the number of CD11a+ dendritic cells in asthmatic airways. *Pulm Pharmacol Ther*. 1997, 10 (5-6): 253-9
- Boers JE, Ambergen AW and Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998, 157 (6 Pt 1): 2000-6
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chevrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M and Marano F. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. *Am J Physiol*. 1999, 276 (4 Pt 1): L604-13
- Boland S, Bonvallet V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M and Marano F. Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000, 278 (1): L25-32
- Bolton SJ, Anthony DC and Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience*. 1998, 86 (4): 1245-57
- Bonvallet V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R and Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001, 25 (4): 515-21
- Boonstra A, Asselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ and O'Garra A. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*. 2003, 197 (1): 101-9
- Boren T, Falk P, Roth KA, Larson G and Normark S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*. 1993, 262 (5141): 1892-5
- Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG and Udey MC. A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*. 1996, 184 (6): 2417-22
- Brenner M and Porcelli S. Antigen presentation: a balanced diet. *Science*. 1997, 277 (5324): 332
- Bucchieri F, Puddicombe SM, Lordan JL, Richter A, Buchanan D, Wilson SJ, Ward J, Zummo G, Howarth PH, Djukanovic R, Holgate ST and Davies DE. Asthmatic bronchial epithelium is more susceptible to oxidant-induced apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002, 27 (2): 179-85
- Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L and Tschopp J. MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*. 1998, 273 (20): 12203-9
- Burns S, Hardy SJ, Buddle J, Yong KL, Jones GE and Thrasher AJ. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2004, 57 (2): 118-32

C

- Campbell AM, Chanez P, Vignola AM, Bousquet J, Couret I, Michel FB and Godard P. Functional characteristics of bronchial epithelium obtained by brushing from asthmatic and normal subjects. *Am Rev Respir Dis.* 1993, 147 (3): 529-34
- Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL and Hobbs HH. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. *J Biol Chem.* 1997, 272 (52): 33068-76
- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D and Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992, 360 (6401): 258-61
- Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I and Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994, 180 (4): 1263-72
- Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I and Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med.* 1999, 189 (5): 821-9
- Chan RC, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoe K, Lee JJ and Nel AE. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006, 118 (2): 455-65
- Chandrasekar B, Bysani S and Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004, 279 (5): 3188-96
- Chao SK, Hamilton RF, Pfau JC and Holian A. Cell surface regulation of silica-induced apoptosis by the SR-A scavenger receptor in a murine lung macrophage cell line (MH-S). *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001, 174 (1): 10-6
- Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, Dong H, Sica GL, Zhu G, Tamada K and Chen L. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol.* 2001, 2 (3): 269-74
- Chen J, Mehta JL, Zhang X, Narula J and Li D. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells. *Circ Res.* 2004, 94 (3): 370-6
- Chen M, Masaki T and Sawamura T. LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002a, 95 (1): 89-100
- Chen YH, Lu Q, Goodenough DA and Jeansson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 2002b, 13 (4): 1227-37
- Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, Lee D, Park SH, Dautry-Varsat A and Bendelac A. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. *J Exp Med.* 1999, 189 (1): 103-10
- Chlenski A, Ketels KV, Engeriser JL, Talamonti MS, Tsao MS, Koutnikova H, Oyasu R and Scarpelli DG. *zo-2* gene alternative promoters in normal and neoplastic human pancreatic duct cells. *Int J Cancer.* 1999a, 83 (3): 349-58
- Chlenski A, Ketels KV, Tsao MS, Talamonti MS, Anderson MR, Oyasu R and Scarpelli DG. Tight junction protein ZO-2 is differentially expressed in normal pancreatic ducts compared to human pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 1999b, 82 (1): 137-44
- Chu HW, Jeyaseelan S, Rino JG, Voelker DR, Wexler RB, Campbell K, Harbeck RJ and Martin RJ. TLR2 signaling is critical for *Mycoplasma pneumoniae*-induced airway mucin expression. *J Immunol.* 2005, 174 (9): 5713-9
- Chua KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM and Turner KJ. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. *J Exp Med.* 1988, 167 (1): 175-82
- Chung KF and Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax.* 1999, 54 (9): 825-57
- Ciencewicki J, Brighton L, Wu WD, Madden M and Jaspers I. Diesel exhaust enhances virus- and poly(I:C)-induced Toll-like receptor 3 expression and signaling in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 290 (6): L1154-63
- Coller SP and Paulnock DM. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. *J Leukoc Biol.* 2001, 70 (1): 142-8
- Comhair SA, Bhatena PR, Farver C, Thunnissen FB and Erzurum SC. Extracellular glutathione peroxidase induction in asthmatic lungs: evidence for redox regulation of expression in human airway epithelial cells. *Faseb J.* 2001, 15 (1): 70-78
- Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Lo Cascio V and Sawamura T. Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000, 275 (17): 12633-8
- Corinti S, Pastore S, Mascia F and Girolomoni G. Regulatory role of nitric oxide on monocyte-derived dendritic cell functions. *J Interferon Cytokine Res.* 2003, 23 (8): 423-31
- Coyle AJ and Gutierrez-Ramos JC. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol.* 2001, 2 (3): 203-9
- Cunha-Rodrigues M, Portugal S, Febbraio M and Mota MM. Bone marrow chimeric mice reveal a dual role for CD36 in *Plasmodium berghei* ANKA infection. *Malar J.* 2007, 6 32
- Cyster JG. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J Exp Med.* 1999, 189 (3): 447-50

D

- Dahinden CA, Kurimoto Y, De Weck AL, Lindley I, Dewald B and Baggiolini M. The neutrophil-activating peptide NAF/NAP-1 induces histamine and leukotriene release by interleukin 3-primed basophils. *J Exp Med.* 1989, 170 (5): 1787-92
- Darling KE and Evans TJ. Effects of nitric oxide on *Pseudomonas aeruginosa* infection of epithelial cells from a human respiratory cell line derived from a patient with cystic fibrosis. *Infect Immun.* 2003, 71 (5): 2341-9
- de Heer HJ, Hammad H, Soullie T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, Hoogsteden HC and Lambrecht BN. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med.* 2004, 200 (1): 89-98
- de Kreijl A, Venema G and van den Burg B. Substrate specificity in the highly heterogeneous M4 peptidase family is determined by a small subset of amino acids. *J Biol Chem.* 2000, 275 (40): 31115-20
- de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C and Lebecque S. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity.* 1998, 9 (3): 325-36
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O and Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol.* 1997, 27 (5): 1229-35
- Deb R, Shakib F, Reid K and Clark H. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J Biol Chem.* 2007, 282 (51): 36808-19
- Dejana E, Bazzoni G and Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res.* 1999, 252 (1): 13-9

- Delneste Y, Magistrelli G, Gauchat J, Haeuw J, Aubry J, Nakamura K, Kawakami-Honda N, Goetsch L, Sawamura T, Bonnefoy J and Jeannin P. Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity*. 2002, 17 (3): 353-62
- Deng J, Miller SA, Wang HY, Xia W, Wen Y, Zhou BP, Li Y, Lin SY and Hung MC. beta-catenin interacts with and inhibits NF-kappa B in human colon and breast cancer. *Cancer Cell*. 2002, 2 (4): 323-34
- Deslee G, Charbonnier AS, Hammad H, Angyalosi G, Tillie-Leblond I, Mantovani A, Tonnel AB and Pestel J. Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2002, 110 (5): 763-70
- Diaz-Sanchez D. The role of diesel exhaust particles and their associated polyaromatic hydrocarbons in the induction of allergic airway disease. *Allergy*. 1997a, 52 (38 Suppl): 52-6; discussion 57-8
- Diaz-Sanchez D, Dotson AR, Takenaka H and Saxon A. Diesel exhaust particles induce local IgE production in vivo and alter the pattern of IgE messenger RNA isoforms. *J Clin Invest*. 1994, 94 (4): 1417-25
- Diaz-Sanchez D, Jyrala M, Ng D, Nel A and Saxon A. In vivo nasal challenge with diesel exhaust particles enhances expression of the CC chemokines rantes, MIP-1alpha, and MCP-3 in humans. *Clin Immunol*. 2000, 97 (2): 140-5
- Diaz-Sanchez D, Tsien A, Fleming J and Saxon A. Combined diesel exhaust particulate and ragweed allergen challenge markedly enhances human in vivo nasal ragweed-specific IgE and skews cytokine production to a T helper cell 2-type pattern. *J Immunol*. 1997b, 158 (5): 2406-13
- Dichmann S, Herouy Y, Purlis D, Rheinen H, Gebicke-Harter P and Norgauer J. Fractalkine induces chemotaxis and actin polymerization in human dendritic cells. *Inflamm Res*. 2001, 50 (11): 529-33
- Doornaert B, Leblond V, Galiacy S, Gras G, Planus E, Laurent V, Isabey D and Lafuma C. Negative impact of DEP exposure on human airway epithelial cell adhesion, stiffness, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003, 284 (1): L119-32
- Doucas H, Garcea G, Neal CP, Manson MM and Berry DP. Changes in the Wnt signalling pathway in gastrointestinal cancers and their prognostic significance. *Eur J Cancer*. 2005, 41 (3): 365-79
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P and Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*. 2005a, 6 1
- Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K and Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res*. 2005b, 6 68
- Dulon S, Cande C, Bunnett NW, Hollenberg MD, Chignard M and Pidard D. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003, 28 (3): 339-46
- Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y and Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*. 2002, 63 (12): 1133-48

E

- Ebner S, Nguyen VA, Forstner M, Wang YH, Wolfram D, Liu YJ and Romani N. Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2007, 119 (4): 982-90
- Ebnet K, Suzuki A, Horikoshi Y, Hirose T, Meyer Zu Brickwedde MK, Ohno S and Vestweber D. The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J*. 2001, 20 (14): 3738-48
- Ebnet K, Suzuki A, Ohno S and Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*. 2004, 117 (Pt 1): 19-29
- Eckhardt ER, Cai L, Sun B, Webb NR and van der Westhuyzen DR. High density lipoprotein uptake by scavenger receptor SR-BII. *J Biol Chem*. 2004, 279 (14): 14372-81
- Edwards L, Williams AE, Krieg AM, Rae AJ, Snelgrove RJ and Hussell T. Stimulation via Toll-like receptor 9 reduces *Cryptococcus neoformans*-induced pulmonary inflammation in an IL-12-dependent manner. *Eur J Immunol*. 2005, 35 (1): 273-81
- Eisenacher K, Steinberg C, Reindl W and Krug A. The role of viral nucleic acid recognition in dendritic cells for innate and adaptive antiviral immunity. *Immunobiology*. 2007, 212 (9-10): 701-14
- Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA and Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002, 196 (12): 1645-51
- Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G and Tryggvason K. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell*. 1995, 80 (4): 603-9
- Epelman S, Stack D, Bell C, Wong E, Neely GG, Krutzik S, Miyake K, Kubes P, Zbytniuk LD, Ma LL, Xie X, Woods DE and Mody CH. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol*. 2004, 173 (3): 2031-40
- Evans MJ, Cox RA, Shami SG and Plopper CG. Junctional adhesion mechanisms in airway basal cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990, 3 (4): 341-7
- Evans MJ and Plopper CG. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am Rev Respir Dis*. 1988, 138 (2): 481-3
- Evans SM, Blyth DI, Wong T, Sanjar S and West MR. Decreased distribution of lung epithelial junction proteins after intratracheal antigen or lipopolysaccharide challenge: correlation with neutrophil influx and levels of BALF sE-cadherin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002, 27 (4): 446-54

F

- Facchetti F, Vermi W, Mason D and Colonna M. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Arch*. 2003, 443 (6): 703-17
- Fahy O, Hammad H, Senechal S, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B and Tsicopoulos A. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000, 23 (2): 247-54
- Fahy O, Senechal S, Pene J, Scherpereel A, Lassalle P, Tonnel AB, Yssel H, Wallaert B and Tsicopoulos A. Diesel exposure favors Th2 cell recruitment by mononuclear cells and alveolar macrophages from allergic patients by differentially regulating macrophage-derived chemokine and IFN-gamma-induced protein-10 production. *J Immunol*. 2002, 168 (11): 5912-9
- Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE and Holgate ST. Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax*. 2005, 60 (5): 389-94
- Feldman GJ, Mullin JM and Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005, 57 (6): 883-917
- Ferguson JS, Voelker DR, McCormack FX and Schlesinger LS. Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages. *J Immunol*. 1999, 163 (1): 312-21

- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM and Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*. 2003, 198 (7): 1043-55
- Fraenkel DJ, Bardin PG, Sanderson G, Lampe F, Johnston SL and Holgate ST. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995, 151 (3 Pt 1): 879-86
- Freeman M, Ashkenas J, Rees DJ, Kingsley DM, Copeland NG, Jenkins NA and Krieger M. An ancient, highly conserved family of cysteine-rich protein domains revealed by cloning type I and type II murine macrophage scavenger receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990, 87 (22): 8810-4
- Fujieda S, Diaz-Sanchez D and Saxon A. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces In vivo IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998, 19 (3): 507-12
- Fujimaki H, Nohara O, Ichinose T, Watanabe N and Saito S. IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particulates and antigen. *Toxicology*. 1994, 92 (1-3): 261-8
- Fujimaki H, Saneyoshi K, Nohara O, Shiraishi F and Imai T. Intranasal instillation of diesel exhaust particulates and antigen in mice modulated cytokine productions in cervical lymph node cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995, 108 (3): 268-73
- Fujimaki H, Saneyoshi K, Shiraishi F, Imai T and Endo T. Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology*. 1997, 116 (1-3): 227-33
- Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, Yamada A, Katata T, Honda T, Sato T, Shimizu K, Ozaki H, Horiuchi H, Kita T and Takai Y. Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene*. 2002a, 21 (50): 7642-55
- Fukuhara A, Irie K, Yamada A, Katata T, Honda T, Shimizu K, Nakanishi H and Takai Y. Role of nectin in organization of tight junctions in epithelial cells. *Genes Cells*. 2002b, 7 (10): 1059-72
- Fukuhara A, Shimizu K, Kawakatsu T, Fukuhara T and Takai Y. Involvement of nectin-activated Cdc42 small G protein in organization of adherens and tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 2003, 278 (51): 51885-93
- Furmonaviciene R, Ghaemmaghami AM, Boyd SE, Jones NS, Bailey K, Willis AC, Sewell HF, Mitchell DA and Shakib F. The protease allergen Der p 1 cleaves cell surface DC-SIGN and DC-SIGNR: experimental analysis of in silico substrate identification and implications in allergic responses. *Clin Exp Allergy*. 2007, 37 (2): 231-42
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H and Tsukita S. Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol*. 2001, 153 (2): 263-72
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S and Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993, 123 (6 Pt 2): 1777-88
- Furuse M, Sasaki H and Tsukita S. Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol*. 1999, 147 (4): 891-903

G

- Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG and van Kooyk Y. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*. 2000a, 1 (4): 353-7
- Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y and Figdor CG. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000b, 100 (5): 575-85
- Gerson C, Sabater J, Scuri M, Torbati A, Coffey R, Abraham JW, Lauredo I, Forteza R, Wanner A, Salathe M, Abraham WM and Conner GE. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000, 22 (6): 665-71
- Geuijen CA, Willems RJ, Bongaerts M, Top J, Gielen H and Mooi FR. Role of the Bordetella pertussis minor fimbrial subunit, FimD, in colonization of the mouse respiratory tract. *Infect Immun*. 1997, 65 (10): 4222-8
- Gibson PG, Allen CJ, Yang JP, Wong BJ, Dolovich J, Denburg J and Hargreave FE. Intraepithelial mast cells in allergic and nonallergic asthma. Assessment using bronchial brushings. *Am Rev Respir Dis*. 1993, 148 (1): 80-6
- Giepmans BN and Moolenaar WH. The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Curr Biol*. 1998, 8 (16): 931-4
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS and Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103 (22): 8459-64
- Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000, 105 (4): 651-63
- Gomez S, del Mont Llosas M, Verdu J, Roura S, Lloreta J, Fabre M and Garcia de Herreros A. Independent regulation of adherens and tight junctions by tyrosine phosphorylation in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999, 1452 (2): 121-32
- Gon Y, Asai Y, Hashimoto S, Mizumura K, Jibiki I, Machino T, Ra C and Horie T. A20 inhibits toll-like receptor 2- and 4-mediated interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004, 31 (3): 330-6
- Gopalakrishnan S, Dunn KW and Marrs JA. Rac1, but not RhoA, signaling protects epithelial adherens junction assembly during ATP depletion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002, 283 (1): C261-72
- Gottardi CJ, Arpin M, Fanning AS and Louvard D. The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93 (20): 10779-84
- Gough PJ, Greaves DR and Gordon S. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res*. 1998, 39 (3): 531-43
- Goval JJ, Greimers R, Boniver J and de Leval L. Germinal center dendritic cells express more ICAM-1 than extrafollicular dendritic cells and ICAM-1/LFA-1 interactions are involved in the capacity of dendritic cells to induce PBMCs proliferation. *J Histochem Cytochem*. 2006, 54 (1): 75-84
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Daniais J, Bronstein JM, Kachar B and Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell*. 1999, 99 (6): 649-59
- Granucci F, Petralia F, Urbano M, Citterio S, Di Tota F, Santambrogio L and Ricciardi-Castagnoli P. The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood*. 2003, 102 (8): 2940-7
- Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'Neill S J and McElvaney NG. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol*. 2005, 174 (3): 1638-46
- Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN and Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood*. 1992, 80 (5): 1105-15
- Greve JM, Davis G, Meyer AM, Forte CP, Yost SC, Marlor CW, Kamarck ME and McClelland A. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*. 1989, 56 (5): 839-47
- Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J and Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med*. 1997, 185 (6): 1101-11

- Gruarin P, Sitia R and Alessio M. Formation of one or more intrachain disulphide bonds is required for the intracellular processing and transport of CD36. *Biochem J*. 1997, 328 (Pt 2): 635-42
- Gruenheid S and Finlay BB. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature*. 2003, 422 (6933): 775-81
- Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M and Si-Tahar M. Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. *J Biol Chem*. 2005, 280 (7): 5571-80
- Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, Balloy V, Danel C, Chignard M and Si-Tahar M. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem*. 2004, 279 (4): 2712-8
- Gumbiner B, Lowenkopf T and Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991, 88 (8): 3460-4
- Gumbiner B and Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol*. 1986, 102 (2): 457-68
- Gumbiner B, Stevenson B and Grimaldi A. The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*. 1988, 107 (4): 1575-87
- Guo J, Zhang M, Wang B, Yuan Z, Guo Z, Chen T, Yu Y, Qin Z and Cao X. Fractalkine transgene induces T-cell-dependent antitumor immunity through chemoattraction and activation of dendritic cells. *Int J Cancer*. 2003, 103 (2): 212-20
- Gurney KB, Colantonio AD, Blom B, Spits H and Uittenbogaart CH. Endogenous IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. *J Immunol*. 2004, 173 (12): 7269-76
- Gursel M, Gursel I, Mostowski HS and Klinman DM. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol*. 2006, 177 (3): 1575-80

H

- Halford MM, Armes J, Buchert M, Meskenaite V, Grail D, Hibbs ML, Wilks AF, Farlie PG, Newgreen DF, Hovens CM and Stacker SA. Ryk-deficient mice exhibit craniofacial defects associated with perturbed Eph receptor crosstalk. *Nat Genet*. 2000, 25 (4): 414-8
- Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M and Raetz CR. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature*. 1991, 352 (6333): 342-4
- Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A and Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol*. 2001, 166 (6): 3717-23
- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997, 90 (9): 3245-87
- Hase K, Murakami T, Takatsu H, Shimaoka T, Jimura M, Hamura K, Kawano K, Ohshima S, Chihara R, Itoh K, Yonehara S and Ohno H. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol*. 2006, 176 (1): 43-51
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J and Stevenson BR. ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol*. 1998, 141 (1): 199-208
- Hauber HP, Tulic MK, Tscipoulos A, Wallaert B, Olivenstein R, Daigneault P and Hamid Q. Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis. *Can Respir J*. 2005, 12 (1): 13-8
- Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD and Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med*. 2003, 198 (10): 1563-72
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM and Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 2001, 410 (6832): 1099-103
- Hazenbos WL, van den Berg BM, van't Wout JW, Mooi FR and van Furth R. Virulence factors determine attachment and ingestion of nonopsonized and opsonized Bordetella pertussis by human monocytes. *Infect Immun*. 1994, 62 (11): 4818-24
- 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. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol*. 2003, 33 (11): 2987-97
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H and Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004, 303 (5663): 1526-9
- Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Burgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W and Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005, 129 (2): 550-64
- Herrick CA and Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol*. 2003, 3 (5): 405-12
- Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismuller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH and Modlin RL. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol*. 2003, 171 (12): 6820-6
- Hewson CA, Jardine A, Edwards MR, Laza-Stanca V and Johnston SL. Toll-like receptor 3 is induced by and mediates antiviral activity against rhinovirus infection of human bronchial epithelial cells. *J Virol*. 2005, 79 (19): 12273-9
- Hochrein H, Schlatter B, O'Keefe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M and Wagner H. Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101 (31): 11416-21
- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U and Beutler B. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005, 433 (7025): 523-7
- Hoffmann JA. The immune response of Drosophila. *Nature*. 2003, 426 (6962): 33-8
- Holgate ST. The bronchial epithelial origins of asthma. *Chem Immunol*. 2000, 78 62-71
- Holt PG, Oliver J, Bilyk N, McMenamin C, McMenamin PG, Kraal G and Thepen T. Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J Exp Med*. 1993, 177 (2): 397-407
- Holt PG and Schon-Hegrad MA. Localization of T cells, macrophages and dendritic cells in rat respiratory tract tissue: implications for immune function studies. *Immunology*. 1987, 62 (3): 349-56
- Holt PG, Schon-Hegrad MA and McMenamin PG. Dendritic cells in the respiratory tract. *Int Rev Immunol*. 1990, 6 (2-3): 139-49
- Holt PG, Schon-Hegrad MA and Oliver J. MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med*. 1988, 167 (2): 262-74
- Holt PG and Stumbles PA. Characterization of dendritic cell populations in the respiratory tract. *J Aerosol Med*. 2000, 13 (4): 361-7
- Homey B and Zlotnik A. Chemokines in allergy. *Curr Opin Immunol*. 1999, 11 (6): 626-34

- Hommura F, Furuuchi K, Yamazaki K, Ogura S, Kinoshita I, Shimizu M, Moriuchi T, Katoh H, Nishimura M and Dosaka-Akita H. Increased expression of beta-catenin predicts better prognosis in nonsmall cell lung carcinomas. *Cancer*. 2002, 94 (3): 752-8
- Honda T, Shimizu K, Fukuhara A, Irie K and Takai Y. Regulation by nectin of the velocity of the formation of adherens junctions and tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003a, 306 (1): 104-9
- Honda T, Shimizu K, Kawakatsu T, Yasumi M, Shingai T, Fukuhara A, Ozaki-Kuroda K, Irie K, Nakanishi H and Takai Y. Antagonistic and agonistic effects of an extracellular fragment of nectin on formation of E-cadherin-based cell-cell adhesion. *Genes Cells*. 2003b, 8 (1): 51-63
- Hoogsteden HC, Verhoeven GT, Lambrecht BN and Prins JB. Airway inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease with special emphasis on the antigen-presenting dendritic cell: influence of treatment with fluticasone propionate. *Clin Exp Allergy*. 1999, 29 Suppl 2 116-24
- Hoover KB, Liao SY and Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol*. 1998, 153 (6): 1767-73
- Horng T, Barton GM and Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*. 2001, 2 (9): 835-41
- Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O and Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol*. 2002, 14 (10): 1225-31
- Hsu HY, Chiu SL, Wen MH, Chen KY and Hua KF. Ligands of macrophage scavenger receptor induce cytokine expression via differential modulation of protein kinase signaling pathways. *J Biol Chem*. 2001, 276 (31): 28719-30
- Hsu HY, Hajjar DP, Khan KM and Falcone DJ. Ligand binding to macrophage scavenger receptor-A induces urokinase-type plasminogen activator expression by a protein kinase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 1998, 273 (2): 1240-6
- Huber AH and Weis WI. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 2001, 105 (3): 391-402
- Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G and Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 2001, 105 (4): 533-45
- Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell costimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999, 397 (6716): 263-6

I

- Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, Togawa A, Takahashi K, Nishioka H, Yoshida H, Mizoguchi A, Nishikawa S and Takai Y. Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol*. 1999, 146 (5): 1117-32
- Ikemoto M, Arai H, Feng D, Tanaka K, Aoki J, Dohmae N, Takio K, Adachi H, Tsujimoto M and Inoue K. Identification of a PDZ-domain-containing protein that interacts with the scavenger receptor class B type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97 (12): 6538-43
- Imler JL and Hoffmann JA. Toll receptors in innate immunity. *Trends Cell Biol*. 2001, 11 (7): 304-11
- Imundo L, Barasch J, Prince A and Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, 92 (7): 3019-23
- Inai T, Kobayashi J and Shibata Y. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*. 1999, 78 (12): 849-55
- Irjala H, Elima K, Johansson EL, Merinen M, Kontula K, Alanen K, Grenman R, Salmi M and Jalkanen S. The same endothelial receptor controls lymphocyte traffic both in vascular and lymphatic vessels. *Eur J Immunol*. 2003, 33 (3): 815-24
- Ishii J, Adachi H, Aoki J, Koizumi H, Tomita S, Suzuki T, Tsujimoto M, Inoue K and Arai H. SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain. *J Biol Chem*. 2002, 277 (42): 39696-702
- Itoh M, Morita K and Tsukita S. Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. *J Biol Chem*. 1999, 274 (9): 5981-6
- Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T and Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*. 2001, 154 (3): 491-7
- Iwasaki A and Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004, 5 (10): 987-95

J

- Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R and Brandtzaeg P. Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123^{high}) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol*. 2000, 165 (7): 4062-8
- Jahnsen FL, Moloney ED, Hogan T, Upham JW, Burke CM and Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*. 2001, 56 (11): 823-6
- Jakob T, Brown MJ and Udey MC. Characterization of E-cadherin-containing junctions involving skin-derived dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 1999, 112 (1): 102-8
- Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*. 1992, 13 (1): 11-6
- Jeannin P, Bottazzi B, Sironi M, Doni A, Rusnati M, Presta M, Maina V, Magistrelli G, Haeuw JF, Hoeffel G, Thieblemont N, Corvaia N, Garlanda C, Delneste Y and Mantovani A. Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors. *Immunity*. 2005, 22 (5): 551-60
- Jeffery PK. Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands. *Am Rev Respir Dis*. 1983, 128 (2 Pt 2): S14-20
- Jeffery PK and Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J*. 1997, 10 (7): 1655-62
- Jenkins SJ, Perona-Wright G, Worsley AG, Ishii N and MacDonald AS. Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J Immunol*. 2007, 179 (6): 3515-23
- Jiang Z, Shih DM, Xia YR, Lusic AJ, de Beer FC, de Villiers WJ, van der Westhuyzen DR and de Beer MC. Structure, organization, and chromosomal mapping of the gene encoding macrosialin, a macrophage-restricted protein. *Genomics*. 1998, 50 (2): 199-205
- Joberty G, Petersen C, Gao L and Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol*. 2000, 2 (8): 531-9
- Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M and Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol*. 2003, 171 (6): 2960-9

K

- Kabashima K, Sakata D, Nagamachi M, Miyachi Y, Inaba K and Narumiya S. Prostaglandin E2-EP4 signaling initiates skin immune responses by promoting migration and maturation of Langerhans cells. *Nat Med.* 2003, 9 (6): 744-9
- Kabha K, Schmegner J, Keisari Y, Parolis H, Schlepper-Schaeffer J and Ofek I. SP-A enhances phagocytosis of Klebsiella by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol.* 1997, 272 (2 Pt 1): L344-52
- Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K and Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol.* 2001, 166 (9): 5688-94
- Kalinski P, Hilkens CM, Sniijders A, Sniidewint FG and Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* 1997, 159 (1): 28-35
- Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM and Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998, 161 (6): 2804-9
- Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T and Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. *Clin Cancer Res.* 2000, 6 (12): 4789-96
- Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Morimoto M, Hayashida K, Hashimoto N and Kita T. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001, 21 (6): 955-60
- Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Hashimoto N and Kita T. Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding. *J Biol Chem.* 2000, 275 (9): 6573-9
- Katata T, Irie K, Fukuhara A, Kawakatsu T, Yamada A, Shimizu K and Takai Y. Involvement of nectin in the localization of IQGAP1 at the cell-cell adhesion sites through the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Oncogene.* 2003, 22 (14): 2097-109
- Kato A, Favoreto S, Jr., Avila PC and Schleimer RP. TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol.* 2007, 179 (2): 1080-7
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T and Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006, 441 (7089): 101-5
- Katz SI, Tamaki K and Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature.* 1979, 282 (5736): 324-6
- Kauffman HF, Tomee JF, van de Riet MA, Timmerman AJ and Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, 105 (6 Pt 1): 1185-93
- Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K and Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999, 11 (1): 115-22
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K and Akira S. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol.* 2001, 167 (10): 5887-94
- Kawanami O, Basset F, Ferrans VJ, Soller P and Crystal RG. Pulmonary Langerhans' cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest.* 1981, 44 (3): 227-33
- Kevil CG, Okayama N, Trocha SD, Kalogeris TJ, Coe LL, Specian RD, Davis CP and Alexander JS. Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers. *Microcirculation.* 1998, 5 (2-3): 197-210
- Khair OA, Davies RJ and Devalia JL. Bacterial-induced release of inflammatory mediators by bronchial epithelial cells. *Eur Respir J.* 1996, 9 (9): 1913-22
- Kikuchi T, Andarini S, Xin H, Gomi K, Tokue Y, Saijo Y, Honjo T, Watanabe A and Nukiwa T. Involvement of fractalkine/CX3CL1 expression by dendritic cells in the enhancement of host immunity against Legionella pneumophila. *Infect Immun.* 2005, 73 (9): 5350-7
- Kilani MM, Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick JA, Kaplan MH, Tepper RS and Antony VB. Respiratory syncytial virus causes increased bronchial epithelial permeability. *Chest.* 2004, 126 (1): 186-91
- Kim WS, Ordija CM and Freeman MW. Activation of signaling pathways by putative scavenger receptor class A (SR-A) ligands requires CD14 but not SR-A. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 310 (2): 542-9
- King C, Brennan S, Thompson PJ and Stewart GA. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium. *J Immunol.* 1998, 161 (7): 3645-51
- Kirchberger S, Vetr H, Majdic O, Stockinger H and Stockl J. Engagement of ICAM-1 by major group rhinoviruses activates the LFA-1/ICAM-3 cell adhesion pathway in mononuclear phagocytes. *Immunobiology.* 2006, 211 (6-8): 537-47
- Knight DA, Lim S, Scaffidi AK, Roche N, Chung KF, Stewart GA and Thompson PJ. Protease-activated receptors in human airways: upregulation of PAR-2 in respiratory epithelium from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2001, 108 (5): 797-803
- Kobayashi J, Inai T and Shibata Y. Formation of tight junction strands by expression of claudin-1 mutants in their ZO-1 binding site in MDCK cells. *Histochem Cell Biol.* 2002, 117 (1): 29-39
- Kobayashi T, Ikeue T, Ito T, Ikeda A, Murakami M, Kato A, Maejima K, Nakajima T and Suzuki T. Short-term exposure to diesel exhaust induces nasal mucosal hyperresponsiveness to histamine in guinea pigs. *Fundam Appl Toxicol.* 1997, 38 (2): 166-72
- Kobayashi T and Ito T. Diesel exhaust particulates induce nasal mucosal hyperresponsiveness to inhaled histamine aerosol. *Fundam Appl Toxicol.* 1995, 27 (2): 195-202
- Kopf M, Coyle AJ, Schmitz N, Barner M, Oxenius A, Gallimore A, Gutierrez-Ramos JC and Bachmann MF. Inducible costimulator protein (ICOS) controls T helper cell subset polarization after virus and parasite infection. *J Exp Med.* 2000, 192 (1): 53-61
- Kowalczyk AP, Navarro P, Dejana E, Bornslaeger EA, Green KJ, Kopp DS and Borgwardt JE. VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions. *J Cell Sci.* 1998, 111 (Pt 20): 3045-57
- Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O and Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. *Microbes Infect.* 2000, 2 (3): 313-6
- Krivan HC, Roberts DD and Ginsburg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988, 85 (16): 6157-61
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S and Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood.* 2004, 103 (4): 1433-7

- Krummenacher C, Baribaud I, Eisenberg RJ and Cohen GH. Cellular localization of nectin-1 and glycoprotein D during herpes simplex virus infection. *J Virol.* 2003, 77 (16): 8985-99
- Krunkosky TM, Fischer BM, Akley NJ and Adler KB. Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha)-induced ICAM-1 surface expression in airway epithelial cells in vitro: possible signal transduction mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996, 796 30-7
- Kuhlmann CR, Schafer M, Li F, Sawamura T, Tillmanns H, Waldecker B and Wiecha J. Modulation of endothelial Ca(2+)-activated K(+) channels by oxidized LDL and its contribution to endothelial proliferation. *Cardiovasc Res.* 2003, 60 (3): 626-34
- Kuroda E, Sugiura T, Zeki K, Yoshida Y and Yamashita U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice. *J Immunol.* 2000, 164 (5): 2386-95
- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ and Finberg RW. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000, 1 (5): 398-401
- Kurts C, Cannarile M, Klebba I and Brocker T. Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol.* 2001, 166 (3): 1439-42
- Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger O and Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrofialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol.* 2000, 67 (1): 104-8
- Kzhyshkowska J, Gratchev A, Martens JH, Pervushina O, Mamidi S, Johansson S, Schledzewski K, Hansen B, He X, Tang J, Nakayama K and Goerdts S. Stabilin-1 localizes to endosomes and the trans-Golgi network in human macrophages and interacts with GGA adaptors. *J Leukoc Biol.* 2004, 76 (6): 1151-61

L

- Lagranderie M, Nahori MA, Balazuc AM, Kiefer-Biasizzo H, Lapa e Silva JR, Milon G, Marchal G and Vargaftig BB. Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of Mycobacterium bovis BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production. *Immunology.* 2003, 108 (3): 352-64
- Laitinen LA and Laitinen A. Inhaled corticosteroid treatment for asthma. *Allergy Proc.* 1995, 16 (2): 63-6
- Lamblin C, Gosset P, Tillie-Leblond I, Saulnier F, Marquette CH, Wallaert B and Tonnel AB. Bronchial neutrophilia in patients with noninfectious status asthmaticus. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998, 157 (2): 394-402
- Lambrecht BN, Carro-Muino I, Vermaelen K and Pauwels RA. Allergen-induced changes in bone-marrow progenitor and airway dendritic cells in sensitized rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999, 20 (6): 1165-74
- Lambrecht BN and Hammad H. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol.* 2003, 3 (12): 994-1003
- Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ and Matsushima K. The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science.* 1989, 243 (4897): 1464-6
- Larsson M, Fonteneau JF and Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol.* 2001, 22 (3): 141-8
- Lawrence TE, Millecchia LL and Fedan JS. Fluticasone propionate and pentamidine isethionate reduce airway hyperreactivity, pulmonary eosinophilia and pulmonary dendritic cell response in a guinea pig model of asthma. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, 284 (1): 222-7
- Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E and Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100 (11): 6646-51
- Lee KH, Choi EY, Hyun MS, Jang BI, Kim TN, Kim SW, Song SK, Kim JH and Kim JR. Association of extracellular cleavage of E-cadherin mediated by MMP-7 with HGF-induced in vitro invasion in human stomach cancer cells. *Eur Surg Res.* 2007, 39 (4): 208-15
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM and Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.* 1996, 86 (6): 973-83
- Leonard EJ and Yoshimura T. Neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1 [interleukin-8]). *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990, 2 (6): 479-86
- Leppert BJ, Mansfield JM and Paulnock DM. The soluble variant surface glycoprotein of African trypanosomes is recognized by a macrophage scavenger receptor and induces I kappa B alpha degradation independently of TRAF6-mediated TLR signaling. *J Immunol.* 2007, 179 (1): 548-56
- LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA and Korfhagen TR. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to Pseudomonas aeruginosa infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998, 19 (4): 700-8
- Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T and Mehta JL. LOX-1, an oxidized LDL endothelial receptor, induces CD40/CD40L signaling in human coronary artery endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003a, 23 (5): 816-21
- Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Ranganathan S and Mehta JL. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2003b, 107 (4): 612-7
- Li D and Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells. *Circulation.* 2000a, 101 (25): 2889-95
- Li D and Mehta JL. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000b, 20 (4): 1116-22
- Li D, Singh RM, Liu L, Chen H, Singh BM, Kazzaz N and Mehta JL. Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2003c, 57 (1): 238-43
- Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A and Basbaum CB. Transcriptional activation of mucin by Pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94 (3): 967-72
- Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD and Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2000, 2 (8): 540-7
- Lipscomb MF and Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002, 82 (1): 97-130
- Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W and Weiner HL. A potential pathway of Th2 development during primary immune response. IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Adv Exp Med Biol.* 1997, 417 375-81
- Liu YJ, Kanzler H, Soumleis V and Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2001, 2 (7): 585-9
- Lopez-Boado YS, Cobb LM and Deora R. Bordetella bronchiseptica flagellin is a proinflammatory determinant for airway epithelial cells. *Infect Immun.* 2005, 73 (11): 7525-34
- Lord KA, Hoffman-Liebermann B and Liebermann DA. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene.* 1990, 5 (7): 1095-7

Lundborg M, Dahlen SE, Johard U, Gerde P, Jarstrand C, Camner P and Lastbom L. Aggregates of ultrafine particles impair phagocytosis of microorganisms by human alveolar macrophages. *Environ Res.* 2006, 100 (2): 197-204

Lyczak JB, Cannon CL and Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002, 15 (2): 194-222

M

- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J and Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002, 100 (13): 4512-20
- MacKichan ML. Toll bridge to immunity. Immune molecules hold promise for vaccine adjuvant discovery. *IAVI Rep.* 2005, 9 (4): 1-5
- Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR and Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100 (4): 1966-71
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M, Bodmer WF, Moyer MP, Riecken EO, Buhr HJ and Hanski C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999, 96 (4): 1603-8
- Marambaud P, Shioi J, Serban G, Georgakopoulos A, Sarner S, Nagy V, Baki L, Wen P, Efthimiopoulos S, Shao Z, Wisniewski T and Robakis NK. A presenilin-1/gamma-secretase cleavage releases the E-cadherin intracellular domain and regulates disassembly of adherens junctions. *Embo J.* 2002, 21 (8): 1948-56
- Margulis A, Zhang W, Alt-Holland A, Crawford HC, Fusenig NE and Garlick JA. E-cadherin suppression accelerates squamous cell carcinoma progression in three-dimensional, human tissue constructs. *Cancer Res.* 2005, 65 (5): 1783-91
- Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D and Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol.* 1998, 142 (1): 117-27
- Masten BJ, Yates JL, Pollard Koga AM and Lipscomb MF. Characterization of accessory molecules in murine lung dendritic cell function: roles for CD80, CD86, CD54, and CD40L. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997, 16 (3): 335-42
- Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S and Matsuzawa Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000, 20 (4): 1027-32
- Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A and Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003, 171 (6): 3154-62
- Matsunaga T, Hokari S, Koyama I, Harada T and Komoda T. NF-kappa B activation in endothelial cells treated with oxidized high-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 303 (1): 313-9
- Mattoli S. Allergen-induced generation of mediators in the mucosa. *Environ Health Perspect.* 2001, 109 Suppl 4 553-7
- Mattoli S, Mattoso VL, Soloperto M, Allegra L and Fasoli A. Cellular and biochemical characteristics of bronchoalveolar lavage fluid in symptomatic nonallergic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1991, 87 (4): 794-802
- Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994, 12 991-1045
- Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzus K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R and Dalpke AH. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 2007, 178 (5): 3134-42
- McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ and Sharpe AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature.* 2001, 409 (6816): 102-5
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD and Schneeberger EE. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci.* 1996, 109 (Pt 9) 2287-98
- McWilliam AS, Marsh AM and Holt PG. Inflammatory infiltration of the upper airway epithelium during Sendai virus infection: involvement of epithelial dendritic cells. *J Virol.* 1997, 71 (1): 226-36
- McWilliam AS, Napoli S, Marsh AM, Pemper FL, Nelson DJ, Pimm CL, Stumbles PA, Wells TN and Holt PG. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J Exp Med.* 1996, 184 (6): 2429-32
- McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA and Holt PG. Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med.* 1994, 179 (4): 1331-6
- Medeiros LA, Khan T, El Khoury JB, Pham CL, Hatters DM, Howlett GJ, Lopez R, O'Brien KD and Moore KJ. Fibrillar amyloid protein present in atheroma activates CD36 signal transduction. *J Biol Chem.* 2004, 279 (11): 10643-8
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S and Janeway CA, Jr. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell.* 1998, 2 (2): 253-8
- Mellman I, Turley SJ and Steinman RM. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends Cell Biol.* 1998, 8 (6): 231-7
- Mercer JA. Intercellular junctions: downstream and upstream of Ras? *Semin Cell Dev Biol.* 2000, 11 (4): 309-14
- Message SD and Johnston SL. Host defense function of the airway epithelium in health and disease: clinical background. *J Leukoc Biol.* 2004, 75 (1): 5-17
- Mineo C and Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel mechanism of HDL action. *Trends Cardiovasc Med.* 2003, 13 (6): 226-31
- Mitic LL and Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 1998, 60 121-42
- Miyahara M, Nakanishi H, Takahashi K, Satoh-Horikawa K, Tachibana K and Takai Y. Interaction of nectin with afadin is necessary for its clustering at cell-cell contact sites but not for its cis dimerization or trans interaction. *J Biol Chem.* 2000, 275 (1): 613-8
- Miyoshi J and Takai Y. Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005, 57 (6): 815-55
- Moller GM, Overbeek SE, Van Helden-Meeuwse CG, Van Haarst JM, Prens EP, Mulder PG, Postma DS and Hoogsteden HC. Increased numbers of dendritic cells in the bronchial mucosa of atopic asthmatic patients: downregulation by inhaled corticosteroids. *Clin Exp Allergy.* 1996, 26 (5): 517-24
- Mommaas AM, Mulder AA, Jordens R, Out C, Tan MC, Cresswell P, Kluin PM and Koning F. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptors and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur J Immunol.* 1999, 29 (2): 571-80
- Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, Bonnet N, Dupuit F, Puchelle E and de Bentzmann S. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun.* 2002, 70 (2): 620-30
- Mongodin E, Bajolet O, Hinrasky J, Puchelle E and de Bentzmann S. Cell wall-associated protein A as a tool for immunolocalization of *Staphylococcus aureus* in infected human airway epithelium. *J Histochem Cytochem.* 2000, 48 (4): 523-34

- Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Carter AB, Gudmundsson G and Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem.* 2003, 278 (52): 53035-44
- Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD and Freeman MW. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem.* 2002, 277 (49): 47373-9
- Morgan AJ, Guillen C, Symon FA, Huynh TT, Berry MA, Entwisle JJ, Briskin M, Pavord ID and Wardlaw AJ. Expression of CXCR6 and its ligand CXCL16 in the lung in health and disease. *Clin Exp Allergy.* 2005, 35 (12): 1572-80
- Mori T, Takahashi K, Naito M, Kodama T, Hakamata H, Sakai M, Miyazaki A, Horiuchi S and Ando M. Endocytic pathway of scavenger receptors via trans-Golgi system in bovine alveolar macrophages. *Lab Invest.* 1994, 71 (3): 409-16
- Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Oishi K and Nagatake T. Alveolar macrophages that phagocytose apoptotic neutrophils produce hepatocyte growth factor during bacterial pneumonia in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001, 24 (5): 608-15
- Mostov K, Su T and ter Beest M. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol.* 2003, 5 (4): 287-93
- Mueller-Ortiz SL, Drouin SM and Wetsel RA. The alternative activation pathway and complement component C3 are critical for a protective immune response against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of pneumonia. *Infect Immun.* 2004, 72 (5): 2899-906
- Muir A, Soong G, Sokol S, Reddy B, Gomez MI, Van Heeckeren A and Prince A. Toll-like receptors in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004, 30 (6): 777-83
- Mukhopadhyay S and Gordon S. The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology.* 2004, 209 (1-2): 39-49
- Mulcahy JV, Riddell DR and Owen JS. Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux. *Biochem J.* 2004, 377 (Pt 3): 741-7
- Muller HA. Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev Dyn.* 2000a, 218 (1): 52-67
- Muller J, Tvrdek D, Dvorak R, Djaborckhel R, Mandys V, Bednar B, Raska I and Lojda Z. Expression of beta-catenins and cadherins by follicular dendritic cells in human lymph nodes. *Acta Histochem.* 2000b, 102 (4): 369-80
- Munro CS, Campbell DA, Du Bois RM, Mitchell DN, Cole PJ and Poulter LW. Dendritic cells in cutaneous, lymph node and pulmonary lesions of sarcoidosis. *Scand J Immunol.* 1987, 25 (5): 461-7
- Murakami S, Iwaki D, Mitsuzawa H, Sano H, Takahashi H, Voelker DR, Akino T and Kuroki Y. Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* 2002, 277 (9): 6830-7
- Muranaka M, Suzuki S, Koizumi K, Takafuji S, Miyamoto T, Ikemori R and Tokiwa H. Adjuvant activity of diesel-exhaust particulates for the production of IgE antibody in mice. *J Allergy Clin Immunol.* 1986, 77 (4): 616-23
- Murphy JE, Tedbury PR, Homer-Vanniasinkam S, Walker JH and Ponnambalam S. Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis.* 2005, 182 (1): 1-15
- Muzio M, Ni J, Feng P and Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science.* 1997, 278 (5343): 1612-5

N

- Nakamura K, Funakoshi H, Miyamoto K, Tokunaga F and Nakamura T. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 280 (4): 1028-35
- Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F and Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005, 6 (8): 769-76
- Nel AE, Diaz-Sanchez D, Ng D, Hiura T and Saxon A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 1998, 102 (4 Pt 1): 539-54
- Nelson DJ, McWilliam AS, Haining S and Holt PG. Modulation of airway intraepithelial dendritic cells following exposure to steroids. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995, 151 (2 Pt 1): 475-81
- Nihlberg K, Larsen K, Hultgardh-Nilsson A, Malmstrom A, Bjermer L and Westergren-Thorsson G. Tissue fibrocytes in patients with mild asthma: a possible link to thickness of reticular basement membrane? *Respir Res.* 2006, 7 50
- Nishimura S, Akagi M, Yoshida K, Hayakawa S, Sawamura T, Munakata H and Hamanishi C. Oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) binding to lectin-like ox-LDL receptor-1 (LOX-1) in cultured bovine articular chondrocytes increases production of intracellular reactive oxygen species (ROS) resulting in the activation of NF-kappaB. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004, 12 (7): 568-76
- Nukiwa M, Andarini S, Zaini J, Xin H, Kanehira M, Suzuki T, Fukuhara T, Mizuguchi H, Hayakawa T, Saijo Y, Nukiwa T and Kikuchi T. Dendritic cells modified to express fractalkine/CX3CL1 in the treatment of preexisting tumors. *Eur J Immunol.* 2006, 36 (4): 1019-27

O-P

- Ohtani T, Nakagawa S, Kurosawa M, Mizuashi M, Ozawa M and Aiba S. Cellular basis of the role of diesel exhaust particles in inducing Th2-dominant response. *J Immunol.* 2005, 174 (4): 2412-9
- Paget C, Malleveay T, Speak AO, Torres D, Fontaine J, Sheehan KC, Capron M, Ryffel B, Faveeuw C, Leite de Moraes M, Platt F and Trottein F. Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity.* 2007, 27 (4): 597-609
- Palacios F, Price L, Schweitzer J, Collard JG and D'Souza-Schorey C. An essential role for ARF6-regulated membrane traffic in adherens junction turnover and epithelial cell migration. *Embo J.* 2001, 20 (17): 4973-86
- Palliser D, Guillen E, Ju M and Eisen HN. Multiple intracellular routes in the cross-presentation of a soluble protein by murine dendritic cells. *J Immunol.* 2005, 174 (4): 1879-87
- Pamer E and Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 1998, 16 323-58
- Papadopoulos EJ, Sasseti C, Saeki H, Yamada N, Kawamura T, Fitzhugh DJ, Saraf MA, Schall T, Blauvelt A, Rosen SD and Hwang ST. Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1999, 29 (8): 2551-9
- Papi A, Stanciu LA, Papadopoulos NG, Teran LM, Holgate ST and Johnston SL. Rhinovirus infection induces major histocompatibility complex class I and costimulatory molecule upregulation on respiratory epithelial cells. *J Infect Dis.* 2000, 181 (5): 1780-4
- Pasdar M and Nelson WJ. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. I. Biochemical analysis. *J Cell Biol.* 1988a, 106 (3): 677-85

- Pasdar M and Nelson WJ. Kinetics of desmosome assembly in Madin-Darby canine kidney epithelial cells: temporal and spatial regulation of desmoplakin organization and stabilization upon cell-cell contact. II. Morphological analysis. *J Cell Biol.* 1988b, 106 (3): 687-95
- Patterson S. Flexibility and cooperation among dendritic cells. *Nat Immunol.* 2000, 1 (4): 273-4
- Pavord ID and Tattersfield AE. Bronchoprotective role for endogenous prostaglandin E₂. *Lancet.* 1995, 345 (8947): 436-8
- Pearson A, Lux A and Krieger M. Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995, 92 (9): 4056-60
- Peguet-Navarro J, Moulon C, Caux C, Dalbiez-Gauthier C, Banchereau J and Schmitt D. Inhibitory effect of IL-10 on human Langerhans cell antigen presenting function. *Adv Exp Med Biol.* 1995, 378 359-61
- Peiser L, Gough PJ, Kodama T and Gordon S. Macrophage class A scavenger receptor-mediated phagocytosis of *Escherichia coli*: role of cell heterogeneity, microbial strain, and culture conditions in vitro. *Infect Immun.* 2000, 68 (4): 1953-63
- Peiser L, Mukhopadhyay S and Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002, 14 (1): 123-8
- Peng Y, Akmentin W, Connelly MA, Lund-Katz S, Phillips MC and Williams DL. Scavenger receptor BI (SR-BI) clustered on microvillar extensions suggests that this plasma membrane domain is a way station for cholesterol trafficking between cells and high-density lipoprotein. *Mol Biol Cell.* 2004, 15 (1): 384-96
- Pepe C, Foley S, Shannon J, Lemiere C, Olivenstein R, Ernst P, Ludwig MS, Martin JG and Hamid Q. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 116 (3): 544-9
- Pfeifer JD, Wick MJ, Roberts RL, Findlay K, Normark SJ and Harding CV. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature.* 1993, 361 (6410): 359-62
- Pfistershammer K, Klausner C, Leitner J, Stockl J, Majdic O, Weichhart T, Sobanov Y, Bochkov V, Saemann M, Zlabinger G and Steinberger P. Identification of the scavenger receptors SREC-I, Cla-1 (SR-BI), and SR-AI as cellular receptors for Tamm-Horsfall protein. *J Leukoc Biol.* 2008, 83 (1): 131-8
- Pichavant M, Charbonnier AS, Taront S, Brichet A, Wallaert B, Pestel J, Tonnel AB and Gosset P. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol.* 2005, 115 (4): 771-8
- Pichavant M, Delneste Y, Jeannin P, Fourneau C, Brichet A, Tonnel AB and Gosset P. Outer membrane protein A from *Klebsiella pneumoniae* activates bronchial epithelial cells: implication in neutrophil recruitment. *J Immunol.* 2003, 171 (12): 6697-705
- Pikkarainen T, Brannstrom A and Tryggvason K. Expression of macrophage MARCO receptor induces formation of dendritic plasma membrane processes. *J Biol Chem.* 1999, 274 (16): 10975-82
- Pini L, Hamid Q, Shannon J, Lemelin L, Olivenstein R, Ernst P, Lemiere C, Martin JG and Ludwig MS. Differences in proteoglycan deposition in the airways of moderate and severe asthmatics. *Eur Respir J.* 2007, 29 (1): 71-7
- Pizzichini E, Pizzichini MM, Kidney JC, Efthimiadis A, Hussack P, Popov T, Cox G, Dolovich J, O'Byrne P and Hargreave FE. Induced sputum, bronchoalveolar lavage and blood from mild asthmatics: inflammatory cells, lymphocyte subsets and soluble markers compared. *Eur Respir J.* 1998, 11 (4): 828-34
- Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S and Pawson T. A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol.* 2003, 5 (4): 301-8
- Pokutta S, Drees F, Takai Y, Nelson WJ and Weis WI. Biochemical and structural definition of the 1-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem.* 2002, 277 (21): 18868-74
- Politz O, Gratchev A, McCourt PA, Schledzewski K, Guillot P, Johansson S, Svineng G, Franke P, Kannicht C, Kzhyskowska J, Longati P, Veltin FW, Johansson S and Goerdts S. Stabilin-1 and -2 constitute a novel family of fasciclin-like hyaluronan receptor homologues. *Biochem J.* 2002, 362 (Pt 1): 155-64
- Potempa S and Ridley AJ. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell.* 1998, 9 (8): 2185-200
- Prevo R, Banerji S, Ni J and Jackson DG. Rapid plasma membrane-endosomal trafficking of the lymph node sinus and high endothelial venule scavenger receptor/homing receptor stabilin-1 (FEEL-1/CLEVER-1). *J Biol Chem.* 2004, 279 (50): 52580-92
- Puddicombe SM, Torres-Lozano C, Richter A, Bucchieri F, Lordan JL, Howarth PH, Vrugt B, Albers R, Djukanovic R, Holgate ST, Wilson SJ and Davies DE. Increased expression of p21(waf) cyclin-dependent kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003, 28 (1): 61-8
- Puig-Kroger A, Dominguez-Soto A, Martinez-Munoz L, Serrano-Gomez D, Lopez-Bravo M, Sierra-Filardi E, Fernandez-Ruiz E, Ruiz-Velasco N, Ardavin C, Groner Y, Tandon N, Corbi AL and Vega MA. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. *J Immunol.* 2006, 177 (4): 2107-14
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J and Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol.* 2000, 165 (1): 566-72

R

- Ramos HC, Rumbo M and Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol.* 2004, 12 (11): 509-17
- Ratner AJ, Bryan R, Weber A, Nguyen S, Barnes D, Pitt A, Gelber S, Cheung A and Prince A. Cystic fibrosis pathogens activate Ca²⁺-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001, 276 (22): 19267-75
- Re F and Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem.* 2001, 276 (40): 37692-9
- Re F and Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 2004, 173 (12): 7548-55
- Reaven E, Cortez Y, Leers-Sucheta S, Nomoto A and Azhar S. Dimerization of the scavenger receptor class B type I: formation, function, and localization in diverse cells and tissues. *J Lipid Res.* 2004, 45 (3): 513-28
- Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B and Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003, 28 (6): 648-54
- Reichert M, Muller T and Hunziker W. The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem.* 2000, 275 (13): 9492-500
- Reid CD, Fryer PR, Clifford C, Kirk A, Tikerpa J and Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood.* 1990, 76 (6): 1139-49

- Reid CD, Stackpoole A, Meager A and Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol.* 1992, 149 (8): 2681-8
- Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SM, Khazen S, Dijkstra CD and de Vries HE. Diapedesis of monocytes is associated with MMP-mediated occludin disappearance in brain endothelial cells. *Faseb J.* 2006, 20 (14): 2550-2
- Reis e Sousa C and Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med.* 1995, 182 (3): 841-51
- Relman D, Tuomanen E, Falkow S, Golenbock DT, Saukkonen K and Wright SD. Recognition of a bacterial adhesion by an integrin: macrophage CR3 (alpha M beta 2, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell.* 1990, 61 (7): 1375-82
- Renn CN, Sanchez DJ, Ochoa MT, Legaspi AJ, Oh CK, Liu PT, Krutzik SR, Sieling PA, Cheng G and Modlin RL. TLR activation of Langerhans cell-like dendritic cells triggers an antiviral immune response. *J Immunol.* 2006, 177 (1): 298-305
- Rescigno M, Granucci F and Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol.* 1999, 77 (5): 404-10
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP and Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001, 2 (4): 361-7
- Retera JM, Leers MP, Sulzer MA and Theunissen PH. The expression of beta-catenin in non-small-cell lung cancer: a clinicopathological study. *J Clin Pathol.* 1998, 51 (12): 891-4
- Reymond N, Borg JP, Lecocq E, Adelaide J, Campadelli-Fiume G, Dubreuil P and Lopez M. Human nectin3/PRR3: a novel member of the PVR/PRR/nectin family that interacts with afadin. *Gene.* 2000, 255 (2): 347-55
- Rhainds D, Bourgeois P, Bourret G, Huard K, Falstraull L and Brissette L. Localization and regulation of SR-BI in membrane rafts of HepG2 cells. *J Cell Sci.* 2004, 117 (Pt 15): 3095-105
- Ricciardolo FL, Di Stefano A, van Krieken JH, Sont JK, van Schadewijk A, Rabe KF, Donner CF, Hiemstra PS, Sterk PJ and Mauad T. Proliferation and inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy.* 2003, 33 (7): 905-11
- Riedl E, Stockl J, Majdic O, Scheinecker C, Knapp W and Strobl H. Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. *Blood.* 2000, 96 (13): 4276-84
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P and Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005, 6 (5): 507-14
- Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R and Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999, 283 (5405): 1183-6
- Ritter M, Mennerich D, Weith A and Seither P. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond).* 2005, 2 16
- Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC and Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 1999, 29 (9): 2769-78
- Roche WR, Montefort S, Baker J and Holgate ST. Cell adhesion molecules and the bronchial epithelium. *Am Rev Respir Dis.* 1993, 148 (6 Pt 2): S79-82
- Rossi GA, Sacco O, Balbi B, Oddera S, Mattioni T, Corte G, Ravazzoni C and Allegra L. Human ciliated bronchial epithelial cells: expression of the HLA-DR antigens and of the HLA-DR alpha gene, modulation of the HLA-DR antigens by gamma-interferon and antigen-presenting function in the mixed leukocyte reaction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1990, 3 (5): 431-9
- Rossi M and Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005, 175 (3): 1373-81
- Rudd BD, Smit JJ, Flavell RA, Alexopoulou L, Schaller MA, Gruber A, Berlin AA and Lukacs NW. Deletion of TLR3 alters the pulmonary immune environment and mucus production during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2006, 176 (3): 1937-42
- Rudell B, Blomberg A, Helleday R, Ledin MC, Lundback B, Stjernberg N, Horstedt P and Sandstrom T. Bronchoalveolar inflammation after exposure to diesel exhaust: comparison of unfiltered and particle trap filtered exhaust. *Occup Environ Med.* 1999, 56 (8): 527-34

S

- Saalbach A, Klein C, Sleeman J, Sack U, Kauer F, Gebhardt C, Averbeck M, Anderegg U and Simon JC. Dermal fibroblasts induce maturation of dendritic cells. *J Immunol.* 2007, 178 (8): 4966-74
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW and Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, 171 (11): 1209-23
- Saito T, Yamamoto T, Kazawa T, Gejyo H and Naito M. Expression of toll-like receptor 2 and 4 in lipopolysaccharide-induced lung injury in mouse. *Cell Tissue Res.* 2005, 321 (1): 75-88
- Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T and Tsukita S. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol.* 1998, 141 (2): 397-408
- Sallusto F and Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994, 179 (4): 1109-18
- Salomon B and Bluestone JA. LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol.* 1998a, 161 (10): 5138-42
- Salomon B, Cohen JL, Masurier C and Klatzmann D. Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J Immunol.* 1998b, 160 (2): 708-17
- Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR and Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol.* 1999, 163 (1): 387-95
- Santiago-Garcia J, Kodama T and Pitas RE. The class A scavenger receptor binds to proteoglycans and mediates adhesion of macrophages to the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 2003, 278 (9): 6942-6
- Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Muhlradt PF, Takeda K and Akira S. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol.* 2000, 165 (12): 7096-101

- Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, Opitz B, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Kracht M, Rosseau S, Suttrop N and Hippenstiel S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006, 290 (4): L730-L737
- Schmidlin F, Amadesi S, Dabbagh K, Lewis DE, Knott P, Bunnett NW, Gater PR, Geppetti P, Bertrand C and Stevens ME. Protease-activated receptor 2 mediates eosinophil infiltration and hyperreactivity in allergic inflammation of the airway. *J Immunol*. 2002, 169 (9): 5315-21
- Schmidt M, Sun G, Stacey MA, Mori L and Mattoli S. Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma. *J Immunol*. 2003, 171 (1): 380-9
- Schneeberger EE, DeFerrari M, Skoskiewicz MJ, Russell PS and Colvin RB. Induction of MHC-determined antigens in the lung by interferon-gamma. *Lab Invest*. 1986, 55 (2): 138-44
- Schon-Hegrad MA, Oliver J, McMenamin PG and Holt PG. Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cells (DC) in the conducting airways. *J Exp Med*. 1991, 173 (6): 1345-56
- Schuler G and Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med*. 1985, 161 (3): 526-46
- Schwartz RH. Immunology. It takes more than two to tango. *Nature*. 2001, 409 (6816): 31-2
- Senechal S, de Nadai P, Ralainirina N, Scherpereel A, Vorng H, Lassalle P, Tonnel AB, Tscopoulos A and Wallaert B. Effect of diesel on chemokines and chemokine receptors involved in helper T cell type 1/type 2 recruitment in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003, 168 (2): 215-21
- Serfl K, Takemura T, Tschachler E, Ferrans VJ, Kaliner MA and Shevach EM. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. *J Exp Med*. 1986, 163 (2): 436-51
- Sexton DW, Blaylock MG and Walsh GM. Human alveolar epithelial cells engulf apoptotic eosinophils by means of integrin- and phosphatidylserine receptor-dependent mechanisms: a process upregulated by dexamethasone. *J Allergy Clin Immunol*. 2001, 108 (6): 962-9
- Sha Q, Truong-Tran AQ, Plitt JR, Beck LA and Schleimer RP. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004, 31 (3): 358-64
- Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T and Yonehara S. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*. 2000, 275 (52): 40663-6
- Shimaoka T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O and Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol*. 2004, 75 (2): 267-74
- Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O and Yonehara S. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol*. 2003, 171 (4): 1647-51
- Shinkai K and Locksley RM. CD1, tuberculosis, and the evolution of major histocompatibility complex molecules. *J Exp Med*. 2000, 191 (6): 907-14
- Shortman K and Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002, 2 (3): 151-61
- Sidobre S, Nigou J, Puzo G and Riviere M. Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem*. 2000, 275 (4): 2415-22
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S and Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*. 1999, 284 (5421): 1835-7
- Sleigh MA, Blake JR and Liron N. The propulsion of mucus by cilia. *Am Rev Respir Dis*. 1988, 137 (3): 726-41
- Solanas G, Porta-de-la-Riva M, Agusti C, Casagolda D, Sanchez-Aguilera F, Larriba MJ, Pons F, Peiro S, Escriva M, Munoz A, Dunach M, de Herreros AG and Baulida J. E-cadherin controls {beta}-catenin and NF-{kappa}B transcriptional activity in mesenchymal gene expression. *J Cell Sci*. 2008, 121 (Pt 13): 2224-34
- Soler P, Chollet S, Jacque C, Fukuda Y, Ferrans VJ and Basset F. Immunocytochemical characterization of pulmonary histiocytosis X cells in lung biopsies. *Am J Pathol*. 1985, 118 (3): 439-51
- Soong G, Reddy B, Sokol S, Adamo R and Prince A. TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J Clin Invest*. 2004, 113 (10): 1482-9
- Soumelis V and Liu YJ. From plasmacytoid to dendritic cell: morphological and functional switches during plasmacytoid pre-dendritic cell differentiation. *Eur J Immunol*. 2006, 36 (9): 2286-92
- Sousa AR, Poston RN, Lane SJ, Nakhosteen JA and Lee TH. Detection of GM-CSF in asthmatic bronchial epithelium and decrease by inhaled corticosteroids. *Am Rev Respir Dis*. 1993, 147 (6 Pt 1): 1557-61
- Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A and Mantovani A. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol*. 1995, 155 (7): 3292-5
- Spina D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998, 158 (5 Pt 3): S141-5
- Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD and Springer TA. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*. 1989, 56 (5): 849-53
- Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991, 9 271-96
- Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell*. 2000, 100 (5): 491-4
- Steinman RM, Adams JC and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*. 1975, 141 (4): 804-20
- Steinman RM and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973, 137 (5): 1142-62
- Steinman RM and Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974, 139 (2): 380-97
- Steinman RM and Swanson J. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med*. 1995, 182 (2): 283-8
- Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS and Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*. 1986, 103 (3): 755-66
- Striz I, Mio T, Adachi Y, Heires P, Robbins RA, Spurzem JR, Illig MJ, Romberger DJ and Rennard SI. IL-4 induces ICAM-1 expression in human bronchial epithelial cells and potentiates TNF-alpha. *Am J Physiol*. 1999, 277 (1 Pt 1): L58-64
- Strunk D, Rappersberger K, Egger C, Strobl H, Kromer E, Elbe A, Maurer D and Stingl G. Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1996, 87 (4): 1292-302

- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA and Moore KJ. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* 2005, 170 (3): 477-85
- Sugita M, Grant EP, van Donselaar E, Hsu VW, Rogers RA, Peters PJ and Brenner MB. Separate pathways for antigen presentation by CD1 molecules. *Immunity.* 1999, 11 (6): 743-52
- Sun J, Hobert ME, Duan Y, Rao AS, He TC, Chang EB and Madara JL. Crosstalk between NF-kappaB and beta-catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005, 289 (1): G129-37
- Sung SS, Fu SM, Rose CE, Jr., Gaskin F, Ju ST and Beaty SR. A major lung CD103 (alphaE)-beta7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J Immunol.* 2006, 176 (4): 2161-72
- Suzuki T, Kanoh T, Kanbayashi M, Todome Y and Ohkuni H. The adjuvant activity of pyrene in diesel exhaust on IgE antibody production in mice. *Alerugi.* 1993, 42 (8): 963-8
- Swallow MM, Wallin JJ and Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity.* 1999, 11 (4): 423-32
- Symowicz J, Adley BP, Gleason KJ, Johnson JJ, Ghosh S, Fishman DA, Hudson LG and Stack MS. Engagement of collagen-binding integrins promotes matrix metalloproteinase-9-dependent E-cadherin ectodomain shedding in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007, 67 (5): 2030-9

T

- Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O and Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol.* 2005, 77 (5): 777-86
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA and Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101 (10): 3516-21
- Takafuji S, Suzuki S, Koizumi K, Tadokoro K, Ohashi H, Muranaka M and Miyamoto T. Enhancing effect of suspended particulate matter on the IgE antibody production in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1989, 90 (1): 1-7
- Takai Y and Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci.* 2003, 116 (Pt 1): 17-27
- Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K and Sagai M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997, 156 (1): 36-42
- Takeda K, Kaisho T and Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003, 21 335-76
- Takekuni K, Ikeda W, Fujito T, Morimoto K, Takeuchi M, Monden M and Takai Y. Direct binding of cell polarity protein PAR-3 to cell-cell adhesion molecule nectin at neuroepithelial cells of developing mouse. *J Biol Chem.* 2003, 278 (8): 5497-500
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001, 13 (7): 933-40
- Takizawa H. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation (Review). *Int J Mol Med.* 1998, 1 (2): 367-78
- Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Desaki M, Kasama T, Kobayashi K, Nakahara K, Yamamoto K, Matsushima K and Kudoh S. Diesel exhaust particles induce NF-kappa B activation in human bronchial epithelial cells in vitro: importance in cytokine transcription. *J Immunol.* 1999, 162 (8): 4705-11
- Takizawa H, Ohtoshi T, Kikutani T, Okazaki H, Akiyama N, Sato M, Shoji S and Ito K. Histamine activates bronchial epithelial cells to release inflammatory cytokines in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 1995, 108 (3): 260-7
- 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. Association between common Toll-like receptor 4 mutations and severe respiratory syncytial virus disease. *J Infect Dis.* 2004, 189 (11): 2057-63
- Tang A, Amagai M, Granger LG, Stanley JR and Udey MC. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature.* 1993, 361 (6407): 82-5
- Taniguchi T and Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol.* 2002, 14 (1): 111-6
- Tesfaigzi Y. Processes involved in the repair of injured airway epithelia. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003, 51 (5): 283-8
- Thomas CA, Li Y, Kodama T, Suzuki H, Silverstein SC and El Khoury J. Protection from lethal gram-positive infection by macrophage scavenger receptor-dependent phagocytosis. *J Exp Med.* 2000, 191 (1): 147-56
- Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Plozza TM, Dilworth RJ, Nisbet A and Turner KJ. Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der p 1 in *Escherichia coli*. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1988, 85 (1): 127-9
- Thorne RF, Meldrum CJ, Harris SJ, Dorahy DJ, Shafren DR, Berndt MC, Burns GF and Gibson PG. CD36 forms covalently associated dimers and multimers in platelets and transfected COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 240 (3): 812-8
- Tomee JF, van Weissenbruch R, de Monchy JG and Kauffman HF. Interactions between inhaled allergen extracts and airway epithelial cells: effect on cytokine production and cell detachment. *J Allergy Clin Immunol.* 1998, 102 (1): 75-85
- Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H and Kurimoto M. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem.* 1997, 272 (41): 25737-42
- Travis SM, Conway BA, Zabner J, Smith JJ, Anderson NN, Singh PK, Greenberg EP and Welsh MJ. Activity of abundant antimicrobials of the human airway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999, 20 (5): 872-9
- Traweger A, Fang D, Liu YC, Stelzhammer W, Krizbai IA, Fresser F, Bauer HC and Bauer H. The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J Biol Chem.* 2002, 277 (12): 10201-8
- Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T and Triantafilou K. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem.* 2006, 281 (41): 31002-11
- Tuomanen E and Weiss A. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis.* 1985, 152 (1): 118-25
- Turley SJ, Inaba K, Garrett WS, Ebersold M, Unternaehrer J, Steinman RM and Mellman I. Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science.* 2000, 288 (5465): 522-7

U-V

- Urban BC, Willcox N and Roberts DJ. A role for CD36 in the regulation of dendritic cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001, 98 (15): 8750-5

- van Alphen L, Jansen HM and Dankert J. Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995, 151 (6): 2094-9; discussion 2099-100
- van den Berg BM, Beekhuizen H, Willems RJ, Mooi FR and van Furth R. Role of Bordetella pertussis virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun.* 1999, 67 (3): 1056-62
- van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielen AG and Yazdanbakhsh M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem.* 2002, 277 (50): 48122-9
- van der Pouw Kraan TC, Slijders A, Boeijs LC, de Groot ER, Alewijnse AE, Leurs R and Aarden LA. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J Clin Invest.* 1998, 102 (10): 1866-73
- van Haarst JM, de Wit HJ, Drexhage HA and Hoogsteden HC. Distribution and immunophenotype of mononuclear phagocytes and dendritic cells in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994, 10 (5): 487-92
- Van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, van Golde LM and van Strijp JA. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J.* 1994, 303 (Pt 2) 407-11
- Vanhoutte F, Paget C, Breuilh L, Fontaine J, Vendeville C, Goriely S, Ryffel B, Faveeuw C and Trottein F. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 synergy and cross-inhibition in murine myeloid dendritic cells. *Immunol Lett.* 2008, 116 (1): 86-94
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M and Fuchs E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell.* 2000, 100 (2): 209-19
- Vermaelen K and Pauwels R. Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003, 29 (3 Pt 1): 405-9
- Vermaelen K and Pauwels R. Pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, 172 (5): 530-51
- Verstraelen S, Van Den Heuvel R, Nelissen I, Witters H, Verheyen G and Schoeters G. Flow cytometric characterisation of antigen presenting dendritic cells after in vitro exposure to diesel exhaust particles. *Toxicol In Vitro.* 2005, 19 (7): 903-7
- Vieira PL, de Jong EC, Wierenga EA, Kapsenberg ML and Kalinski P. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J Immunol.* 2000, 164 (9): 4507-12
- Vishnyakova TG, Bocharov AV, Baranova IN, Chen Z, Remaley AT, Csako G, Eggerman TL and Patterson AP. Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2003, 278 (25): 22771-80

W

- Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB and Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994, 1 (5): 405-13
- Wan H, Winton HL, Soeller C, Tovey ER, Gruenert DC, Thompson PJ, Stewart GA, Taylor GW, Garrod DR, Cannell MB and Robinson C. Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J Clin Invest.* 1999, 104 (1): 123-33
- Wang B, Chun T, Rulifson IC, Exley M, Balk SP and Wang CR. Human CD1d functions as a transplantation antigen and a restriction element in mice. *J Immunol.* 2001, 166 (6): 3829-36
- Wang X, Moser C, Louboutin JP, Lysenko ES, Weiner DJ, Weiser JN and Wilson JM. Toll-like receptor 4 mediates innate immune responses to Haemophilus influenzae infection in mouse lung. *J Immunol.* 2002, 168 (2): 810-5
- Wang XY, Facciponte J, Chen X, Subjeck JR and Repasky EA. Scavenger receptor-A negatively regulates antitumor immunity. *Cancer Res.* 2007, 67 (10): 4996-5002
- Watabe-Uchida M, Uchida N, Imamura Y, Nagafuchi A, Fujimoto K, Uemura T, Vermeulen S, van Roy F, Adamson ED and Takeichi M. alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells. *J Cell Biol.* 1998, 142 (3): 847-57
- Webb NR, Connell PM, Graf GA, Smart EJ, de Villiers WJ, de Beer FC and van der Westhuyzen DR. SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells. *J Biol Chem.* 1998, 273 (24): 15241-8
- Weinberg AD, Vella AT and Croft M. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin Immunol.* 1998, 10 (6): 471-80
- Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S and Zychlinsky A. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol.* 2004, 172 (7): 4463-9
- Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S and Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 1997, 7 (6): 837-47
- Whitman SC, Daugherty A and Post SR. Regulation of acetylated low density lipoprotein uptake in macrophages by pertussis toxin-sensitive G proteins. *J Lipid Res.* 2000, 41 (5): 807-13
- Whitsett JA. Intrinsic and innate defenses in the lung: intersection of pathways regulating lung morphogenesis, host defense, and repair. *J Clin Invest.* 2002, 109 (5): 565-9
- Willis BC and Borok Z. TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007, 293 (3): L525-34
- Wittchen ES, Haskins J and Stevenson BR. Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. *J Biol Chem.* 1999, 274 (49): 35179-85
- Wyatt TA, Kharbanda KK, Tuma DJ, Sisson JH and Spurzem JR. Malondialdehyde-acetaldehyde adducts decrease bronchial epithelial wound repair. *Alcohol.* 2005, 36 (1): 31-40

X

- Xia X, Mariner DJ and Reynolds AB. Adhesion-associated and PKC-modulated changes in serine/threonine phosphorylation of p120-catenin. *Biochemistry.* 2003, 42 (30): 9195-204
- Xie Q, Matsunaga S, Niimi S, Ogawa S, Tokuyasu K, Sakakibara Y and Machida S. Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells. *DNA Cell Biol.* 2004, 23 (2): 111-7
- Xu WY, Wang L, Wang HM, Wang YQ, Liang YF, Zhao TT and Wu YZ. TLR2 and TLR4 agonists synergistically up-regulate SR-A in RAW264.7 through p38. *Mol Immunol.* 2007, 44 (9): 2315-23

Y

- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K and Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003a, 301 (5633): 640-3
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K and Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003b, 4 (11): 1144-50

- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K and Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002, 169 (12): 6668-72
- Yamamoto N, Suzuki S, Shirai A, Suzuki M, Nakazawa M, Nagashima Y and Okubo T. Dendritic cells are associated with augmentation of antigen sensitization by influenza A virus infection in mice. *Eur J Immunol.* 2000, 30 (1): 316-26
- Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A and Ohno S. Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol.* 2003, 13 (9): 734-43
- Yamauchi R, Tanaka M, Kume N, Minami M, Kawamoto T, Togi K, Shimaoka T, Takahashi S, Yamaguchi J, Nishina T, Kitaichi M, Komeda M, Manabe T, Yonehara S and Kita T. Upregulation of SR-PSOX/CXCL16 and recruitment of CD8+ T cells in cardiac valves during inflammatory valvular heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004, 24 (2): 282-7
- Yang OO, Racke FK, Nguyen PT, Gausling R, Severino ME, Horton HF, Byrne MC, Strominger JL and Wilson SB. CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation. *J Immunol.* 2000, 165 (7): 3756-62
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W and Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007, 27 (4): 697-709
- Yasumi M, Shimizu K, Honda T, Takeuchi M and Takai Y. Role of each immunoglobulin-like loop of nectin for its cell-cell adhesion activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, 302 (1): 61-6
- Yin XJ, Dong CC, Ma JY, Roberts JR, Antonini JM and Ma JK. Suppression of phagocytic and bactericidal functions of rat alveolar macrophages by the organic component of diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A.* 2007, 70 (10): 820-8
- Yin XJ, Ma JY, Antonini JM, Castranova V and Ma JK. Roles of reactive oxygen species and heme oxygenase-1 in modulation of alveolar macrophage-mediated pulmonary immune responses to *Listeria monocytogenes* by diesel exhaust particles. *Toxicol Sci.* 2004, 82 (1): 143-53
- Yokoyama S, Tachibana K, Nakanishi H, Yamamoto Y, Irie K, Mandai K, Nagafuchi A, Monden M and Takai Y. alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Mol Biol Cell.* 2001, 12 (6): 1595-609
- Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW and Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature.* 1999, 402 (6763): 827-32

Z

- Zahm JM, Chevillard M and Puchelle E. Wound repair of human surface respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1991, 5 (3): 242-8
- Zeng Y, Tao N, Chung KN, Heuser JE and Lublin DM. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem.* 2003, 278 (46): 45931-6
- Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA and Wilson IA. Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science.* 1997, 277 (5324): 339-45
- Zeuthen LH, Fink LN and Frokiaer H. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. *Immunology.* 2008, 123 (2): 197-208
- Zhang J, Raper A, Sugita N, Hingorani R, Salio M, Palmowski MJ, Cerundolo V and Crocker PR. Characterization of Siglec-H as a novel endocytic receptor expressed on murine plasmacytoid dendritic cell precursors. *Blood.* 2006, 107 (9): 3600-8
- Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB and Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infect Immun.* 2005, 73 (11): 7151-60
- Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, Liggitt HD, Dahl ME, Lewis DB, Gyarmati D, Aye T, Campbell DJ and Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat Immunol.* 2005, 6 (10): 1047-53
- Zlotnik A and Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000, 12 (2): 121-7
- Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M and Fabry Z. Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 2007, 178 (1): 520-9